

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**PAPEL DE LA GLICINA-BETAÍNA EN LOS
DESÓRDENES FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS
CAUSADOS POR FRÍO EN BANANO (*Musa sp*)**

**TESIS QUE PRESENTA PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

SUSANA CRUZ-MARTÍNEZ

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C
MÉRIDA YUCATÁN MÉXICO
2006**

Dedicatoria

Con todo mi amor y respeto a la memoria de Juan Martínez, por su amor, paciencia y sabiduría. A mis abuelos Aurora, Isabel y Juan Cruz, por ellos son la raíz de mi existir.

A mis Padres Casiano Cruz y María Antonia Martínez por su amor, comprensión y apoyo que me han brindado en toda mi vida. De igual manera a mis hermanos Yeni, César Juan y Anabella por su cariño y fuerza que nos une y sobre todo por sus consejos y aliento que me dieron para seguir adelante.

No son las pérdidas ni las caídas
las que pueden hacer fracasar nuestra vida,
si no la falta de coraje para levantarnos
y seguir adelante.

Solo hay un bien: el conocimiento,
solo hay un mal: la ignorancia
(Confucio)

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, y la Coasesoría del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, a quienes agradezco sus enseñanzas, su confianza y apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Agradezco al grupo de Fisiología Vegetal Molecular, integrado por M.C. Carlos Talavera May, Miguel Tzec, y especialmente al M.C Francisco Espadas por su apoyo y su asesoría brindada en el manejo de equipos de laboratorio. A mis amigos y compañeros de laboratorio Yolanda Nava, Neyi Estrella, Fulgencio Alatorre, Felipe Santamaría, David Uh, Gabriela Fuentes, José Manuel de los Santos, Guadalupe Cruz y Luis Jorge Monsreal por hacer un ambiente agradable y su amistad brindada durante la realización de esta tesis.

Mi agradecimiento especial al Dr. Enrique Sauri por las facilidades otorgadas para la utilización de equipos del laboratorio de instrumentación en el Instituto Tecnológico de Mérida y por sus comentarios que enriquecieron este trabajo. De igual manera un especial agradecimiento al Dr. Felipe Barahona, M.C. Lourdes Vargas y M.C. Marilú Maldonado por su apoyo brindado en el manejo y uso del cromatógrafo de gases.

Agradezco al comité revisor integrado por los Drs.: Enrique Sauri, Edmundo Mercado-Silva e Ignacio Islas por las sugerencias y comentarios realizados a este trabajo. Al CONACYT por la beca 176807 otorgada para la realización de esta maestría. Al Programa de Fortalecimiento para el Postgrado (PIFOP C-II), convenio PFPNP3-01-4 por el apoyo económico para la realización de este trabajo. Al CICY por permitirme hacer este sueño realidad.

A mis amigos Delia, Laura, Neyi, Fulgencio, Yolanda, Gabriel, Fernando, Manuela, Miguel, Guadalupe y Gilberto por su amistad brindada y ayuda desinteresada. A todas las personas que de alguna manera participaron en el desarrollo de este trabajo.

Lista de abreviaturas

A.A.	Actividad absoluta
A.E.	Actividad específica
AOS	Especies activas de oxígeno
APX	Ascorbato peroxidasa
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasas
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
CMO	Colina monooxigenasa
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
EGTA	Etilenglicol-bis (β aminoetil éter) N, N, N', N'-ácido tetra acético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fv/Fm	Relación fluorescencia de clorofila variable y fluorescencia de clorofila máxima
GB	Glicina-betaína
GR	Glutación reductasa
MDAR	Monodehidroascorbato reductasa
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PEA	Analizador de eficiencia vegetal (por sus siglas en inglés)
PF	Peso fresco
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPO	Polifenol oxidasa
PVPP	Polivinil polipirrolidona
PS II	Fotosistema II (por sus siglas en inglés)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
SD	Desviación estándar
UAE	Unidad de actividad enzimática

Contenido

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Lista de abreviaturas	III
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	X
Resumen	XI
Abstract	XIII
Introducción	1
Literatura citada	3
Capítulo I. Antecedentes	5
1.1. Generalidades del banano	5
1.1.1. Origen y distribución	5
1.1.2. Clasificación taxonómica	6
1.1.3. Descripción de la planta	6
1.1.4. Proceso de maduración	10
1.1.4.1. Cambios fisiológicos y bioquímicos durante la maduración	11
1.1.4.2. Grados de maduración	15
1.1.5. Importancia económica	15
1.1.6. Importancia nutricional	18
1.1.7. Problemática del cultivo	19
1.2. Daños por frío	20
1.2.1. Estrés por baja temperatura	21
1.2.2. Síntomas fisiológicos del daño por frío	23
1.2.3. Mecanismo de daño por frío	24
1.3. Fenómeno de pardeamiento	26

1.3.1. La polifenol oxidasa	27
1.3.2. Compuestos fenólicos	30
1.4. Mecanismos de resistencia y tolerancia al estrés por baja temperatura	31
1.4.1. Sistema de detoxificación de especies activas de oxígeno (AOS)	32
1.4.2. Lípidos de membrana	33
1.4.3. Compuestos orgánicos solubles de bajo peso molecular (Solutos compatibles)	33
1.5. Solutos compatibles	34
1.5.1. Glicina-betaína (GB)	35
1.5.2. Síntesis de GB	35
1.5.3. Funciones de GB	36
1.6. Justificación	38
1.7. Hipótesis	40
1.8. Objetivos	40
1.8.1. General	40
1.8.2. Particulares	40
1.9. Literatura citada	41
Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efecto en fenoles, proteínas, actividad de polifenol oxidasa (PPO), clorofilas y carotenoides	49
2.1. Introducción	49
2.2. Materiales y métodos	50
2.2.1. Material vegetal	50
2.2.2. Estrategia experimental y obtención de muestras	51
2.2.3. Evaluación de parámetros	54
2.2.3.1. Contenido de fenoles solubles	54
2.2.3.2. Contenido de proteínas solubles	54
2.2.3.3. Actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO)	55

2.2.3.4. Contenido de clorofilas y carotenoides totales	57
2.2.4. Análisis estadístico	58
2.3. Resultados	59
2.3.1. Síntomas visuales del daño por frío y efecto de GB	59
2.3.2. Cambios bioquímicos en frutos de banano expuestos a frío	63
2.3.2.1. Contenido de fenoles solubles	63
2.3.2.2. Contenido de proteínas solubles	63
2.3.2.3. Actividad específica de la polifenol oxidasa	65
2.3.2.4. Contenido de clorofilas	65
2.3.2.5. Contenido de carotenoides	67
2.3.3. Efecto de GB en el desarrollo del daño por frío	67
2.3.3.1. Contenido de fenoles solubles	67
2.3.3.2. Contenido de proteínas solubles	69
2.3.3.3. Actividad enzimática de PPO	71
2.3.3.4. Contenido de clorofilas	73
2.3.3.5. Cantidad de carotenoides	73
2.4. Discusión	76
2.5. Conclusiones	79
2.6. Literatura citada	79
Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío; efectos en respiración, etileno, eficiencia del fotosistema II y fuga de electrolitos	83
3.1. Introducción	83
3.2. Materiales y métodos	85
3.2.1. Material vegetal	85
3.2.2. Tratamientos	85
3.2.3. Evaluación de parámetros	85
3.2.3.1. Producción de etileno y tasa respiratoria	85
3.2.3.2. Fuga de electrolitos	88
3.2.3.3. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm)	89
3.2.4. Análisis estadístico	90
3.3. Resultados	91

3.3.1. Síntomas visuales del efecto de frío y de la aplicación de GB	91
3.3.2. Cambios fisiológicos durante la maduración del banano	91
3.3.2.1. Respiración y Producción de Etileno	91
3.3.2.2. Fuga de electrolitos y eficiencia fotoquímica del fotosistema II	94
3.3.3. Cambios fisiológicos durante el desarrollo del daño por frío en banano	95
3.3.3.1. Respiración	95
3.3.3.2. Producción de etileno	95
3.3.3.3. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II	97
3.3.3.4. Fuga de electrolitos	97
3.3.4. Efecto de GB en los desórdenes fisiológicos ocasionados por frío en frutos de banano.	97
3.3.4.1. Respiración	97
3.3.4.2. Producción de etileno	99
3.3.4.3. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II	99
3.3.4.4. Fuga de electrolitos	100
3.4. Discusión	101
3.5. Conclusiones	104
3.6. Literatura citada	104
Capítulo IV. Discusión general	109
4.1. Cambios bioquímicos y fisiológicos ocasionados por frío en banano.	109
4.2. Efecto de la aplicación foliar de GB, en los frutos de banano	113
4.3. Efecto de GB en los desórdenes desarrollados por frío	115
4.4. Literatura citada	118
Capítulo V. Conclusiones generales	125
Capítulo VI. Perspectivas	127
Anexos	129

Índice de figuras

Figura 1.1. Clasificación taxonómica del cultivar “Enano Gigante”.	7
Figura 1.2. Partes de la planta de banano.	8
Figura 1.3. Diferencias en el patrón de la tasa respiratoria y producción de etileno de un fruto climatérico (A) y uno no-climatérico (B) durante el desarrollo, maduración y senescencia.	12
Figura 1.4. Patrón de la tasa respiratoria del banano.	13
Figura 1.5. Grados de madurez de acuerdo a los cambios de color de los frutos de banano durante su maduración.	16
Figura 1.6. Producción de banano y plátanos a nivel mundial (A) y nacional (B).	18
Figura 1.7. Relación de la temperatura en el crecimiento y desarrollo en plantas de banano.	22
Figura 1.8. Mecanismo de daño por frío en plantas.	24
Figura 1.9. Daño por frío, en el proceso respiratorio.	26
Figura 1.10. Fenómeno de pardeamiento en banano.	27
Figura 1.11. Reacciones catalizadas por la polifenol oxidasa.	29
Figura 1.12. Mecanismos posibles para la resistencia a la baja temperatura.	32
Figura 1.13. Estructura molecular de la glicina-betaína.	35
Figura 1.14. Ruta de síntesis de GB.	36
Figura 1.15. Temperaturas mínimas registradas en los estados productores de banano.	39
Figura 2.1. Plantación de banano variedad enano gigante en el invernadero del CICY.	50
Figura 2.2. Diagrama de flujo del trabajo experimental.	52
Figura 2.3. Aspersión, corte y exposición a frío de frutos de banano tratados con GB.	53
Figura 2.4. Obtención de muestras de tejido fresco de frutos de banano bajo tratamiento con GB y frío.	53
Figura 2.5. Frutos de banano bajo tratamiento con GB y frío, doce días después del corte.	59
Figura 2.6. Epidermis de bananos tratados con GB y frío, dos días después de cada tratamiento.	60

Figura 2.7. Epidermis de bananos tratados con GB y frío, cuatro días después de la aplicación de cada tratamiento.	61
Figura 2.8. Epidermis de bananos tratados con GB y frío, ocho días después de la aplicación de cada tratamiento.	62
Figura 2.9. Efecto del frío sobre algunos parámetros bioquímicos de la epidermis del banano variedad enano gigante, durante ocho días de seguimiento.	64
Figura 2.10. Efecto del frío en el contenido de clorofilas y carotenoides presentes en la epidermis del banano variedad enano gigante durante ocho días de seguimiento.	66
Figura 2.11. Contenido de fenoles solubles presentes en la epidermis de banano bajo tratamiento con GB y expuestos a frío.	68
Figura 2.12. Contenido de proteínas solubles presentes en la epidermis de bananos tratados con GB y expuestos a frío.	70
Figura 2.13. Comportamiento de la actividad específica de la PPO en la epidermis de bananos tratados con GB y frío.	72
Figura 2.14. Comportamiento del contenido de clorofilas totales presentes en la epidermis de bananos tratados con GB y frío.	74
Figura 2.15. Comportamiento del contenido de carotenoides totales presentes en la epidermis de bananos tratados con GB y frío.	75
Figura 3.1. Diagrama de flujo del trabajo experimental.	86
Figura 3.2. Determinación por cromatografía de gases de la producción de etileno y la respiración de frutos de banano tratados con GB y frío.	87
Figura 3.3. Medición de fuga de electrolitos en frutos de banano tratados con GB y frío.	88
Figura 3.4. Medición de la fluorescencia de clorofilas con un analizador de fluorescencia vegetal (PEA), en frutos de banano tratados con GB y frío.	89
Figura 3.5. Seguimiento de la maduración de frutos de banano bajo tratamiento con GB y frío.	92
Figura 3.6. Seguimiento subepidérmico del efecto de GB y frío en frutos de banano durante trece días después del corte.	93
Figura 3.7. Cambios fisiológicos en la epidermis durante la maduración del fruto de banano, variedad enano gigante.	94
Figura 3.8. Efecto del frío en los parámetros fisiológicos de la parte epidérmica del banano.	96

Figura 3.9. Efecto de GB en algunos parámetros fisiológicos de la epidermis de banano variedad enano gigante durante su maduración y exposición a frío.	98
Figura 3.10. Efecto de GB en el desarrollo del daño por frío con respecto a la eficiencia del fotosistema II y la fuga de electrolitos en la epidermis de banano.	100

Índice de tablas

Tabla 1.1. Valor nutricional del banano por cada 100 g de la fruta.	19
Tabla 1.2. Clasificación de los compuestos fenólicos.	30
Tabla 1.3. Estudios de los efectos de la GB aplicada exógenamente ante estrés por baja temperatura y otros tipos de estrés.	37
Tabla 2.1. Número de frutos expuestos a 10 °C durante diferentes tiempos de exposición por cada tratamiento con GB.	58
Tabla 3.1. Número de frutos expuestos a 10 °C durante 6 horas por cada tratamiento con GB y su respectivo control.	90

Resumen

El cultivo de banano no solo enfrenta problemas de plagas y enfermedades además presenta desórdenes fisiológicos. Estos desórdenes son causados por cambios ambientales como el daño por frío que disminuye la calidad de los frutos, ocasionando pérdidas de hasta un 50% en el rendimiento del cultivo. Adicionalmente por manejo postcosecha, principalmente durante el transporte y almacenamiento, se tienen pérdidas de hasta un 20% ya que esta fruta es muy sensible a las bajas temperaturas. Ante esta situación es necesario buscar alternativas viables que puedan dar solución a este problema.

En la presente tesis, se analizó el efecto de la aplicación foliar de soluciones (50 y 100 mM) de glicina-betaína (GB) en el desarrollo del daño por frío en frutos de banano. Después de tres días de la aplicación de GB asperjada en hojas de banano a razón de 0.250 l/planta, los frutos se cosecharon, se almacenaron a 10°C durante 2, 4 o 6 horas y después se transfirieron a 23±1°C hasta su maduración. A intervalos de 24 horas se cuantificaron los contenidos de proteínas solubles, fenoles solubles, actividad de la enzima polifenol oxidasa, contenido de clorofilas y carotenoides totales, eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm), fuga de electrolitos, producción de etileno y respiración.

Los resultados mostraron que los frutos de banano sufren cambios bioquímicos cuando son expuestos a frío (10°C) en etapas postcosecha. Dichos cambios comprendieron un aumento en la actividad de la polifenol oxidasa de hasta diez veces con respecto al control y disminución del contenido de fenoles en un 42.2%, lo cual se vio reflejado en un mayor pardeamiento epidérmico de los frutos. La exposición al frío también causó una reducción del 70% en el contenido de proteínas solubles, mientras que la degradación de clorofilas se redujo en un 11.2% y el contenido de carotenoides fue 31.5% menor con respecto al control.

En el aspecto fisiológico, el frío causó daño en el mecanismo fotosintético afectando al fotosistema II; esto se reflejó en una caída rápida en la eficiencia del transporte electrónico de este fotosistema (Fm/Fv) de 0.84 a 0.14, la respiración disminuyó en un 48.43 % con respecto al control, la

producción de etileno se adelantó provocando la maduración temprana del fruto, la fuga de electrolitos se incrementó en un 33.51% lo que sugiere daños a nivel de membrana.

Por otra parte, la aplicación foliar de GB (50 y 100 mM) a las plantas de banano en precosecha, redujo las alteraciones bioquímicas y fisiológicas provocadas al exponer los frutos a bajas temperaturas en postcosecha. El pardeamiento se atenuó y se retardó el proceso de maduración presentando mayor estabilidad las clorofilas totales de 23.9% y los carotenoides (27.4%). Este tratamiento permitió que los fenoles se mantuvieran sin cambios significativos cuando los frutos se sometieron a frío. El contenido de proteínas aumentó casi tres veces con respecto al control cuando los frutos se trataron con GB y se expusieron al frío. La aplicación de GB quizá tuvo acción a nivel de ajuste osmótico, factor que permitió estabilizar membranas disminuyendo con ello la fuga de electrolitos hasta un 42.4%. Además, la GB pareció proteger al fotosistema II y con ello mantuvo la eficiencia fotoquímica de este complejo proteico.

En conjunto, los resultados del presente trabajo sugieren que la aplicación foliar de GB podría usarse como tratamiento agronómico en cultivares de banano con el fin de prevenir los daños que ocasiona el frío en esta especie. Este tratamiento sería útil tanto para contrarrestar los efectos que induce el frío en los cultivares a cielo abierto como en los frutos que al ser comercializados tienen que ser almacenados a bajas temperaturas.

Abstract

Banana plantations are affected not only by various diseases but also by many physiological disorders. These disorders are caused by environmental changes such as chilling injury, which reduces the quality of fruits and causes losses of up to 50% in the yield of bananas. Chilling injury of the fruits can also occur during the transport and storage and losses of up to 20% can occur during post-harvest handling. Given this situation it is necessary to explore alternatives that might provide solutions to this problem.

In the present work, the effect of foliar application of solutions (50 and 100 mM) of glycine-betaine (GB) to prevent the subsequent development of chilling injury on banana fruits was analyzed. After three days of the application of GB over banana leaves (0,250 l/plants), the fruits were harvested and stored at 10°C during 2, 4 or 6 hours and they were later transferred to 23±1°C until they reached maturity. At 24 hours intervals banana fruits were sampled and various parameters, such as soluble proteins content, soluble phenols, polyphenol oxidase activity, totals chlorophylls and carotenoids content, photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm), electrolyte leakage, ethylene production and respiratory rate were quantified.

The results showed that banana fruits undergo biochemical changes when they are exposed to low temperatures (10°C) during post-harvest stages. Changes included an increase in polyphenol oxidase activity of up to ten times with respect to control and a decrease of phenolics content to 42.2%, which reflected in a greater epidermic browning in the fruits. The exposure to low temperature caused a reduction of 70% in the soluble proteins content, while the chlorophyll degradation decreased to 11.2% and the total carotenoids content was reduced to 31.5% with respect to control.

With respect to the physiological changes, the photosynthetic machinery was affected by low temperature causing a fast decrease in the efficiency of photosystem II (Fm/Fv) from 0.84 to 0.14, the respiratory rate decreased to 48.43% with respect to control, the ethylene production was accelerated

causing the early maturation of the fruit and the electrolyte leakage increased 33.51%, which indicated damages to the membrane.

In addition, the foliar application of GB (50 and 100 mM) to banana plants prior to harvest reduced the biochemical and physiological alterations on harvested fruits caused by chilling injury. The browning was attenuated and the maturation process was retarded, the chlorophyll stability increased to 23.9% and the carotenoids to 27.4%. While no significant changes occurred in the phenolics content exposed to cold. The proteins content in banana fruits increased three times with respect to control. The application of GB perhaps allowed osmotic adjustment, causing membrane stabilization and low electrolyte leakage to 42.4%. GB protected the photosystem II maintaining the photosynthetic efficiency of this protein complex.

The results of the present work suggest that foliar application of GB could be used agronomically to reduce the damage caused by cold in banana fruits. This treatment could be used in banana plantations to reduce the damage caused by low temperature on the fruits during their post-harvest stage as well as the fruit stored to low temperature.

Introducción

Uno de los cultivos más importantes en la agricultura es el banano; el cual ocupa el primer lugar de producción de las frutas tropicales, no sólo en México sino también en el mundo. El banano es considerado como una de las frutas básicas en la alimentación humana, debido a su bajo precio, su elevado valor nutritivo, así como su alta disponibilidad durante todo el año.

En México se cultivan bananos en 17 entidades, pero sólo cinco destacan como las abastecedoras del mercado nacional y de exportación, estas son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima y Nayarit (Sagarpa, 2006a). El cultivo de banano a nivel mundial, representa una importante fuente de ingresos para los productores. Se estima que en el 2005 México tuvo un ingreso anual de 25,341 miles de dólares como producto de la exportación de esta fruta, esto hace evidente la rentabilidad que tiene esta fruta en el comercio exterior. (Sagarpa, 2006b).

Los problemas que frecuentemente se presentan en los cultivos de banano, son las plagas y enfermedades debido al ataque de bacterias, hongos y virus, así como las alteraciones fisiológicas ocasionados por cambios ambientales y las condiciones físicas del suelo (Jones, 2000), aunque también se generan problemas durante el manejo, cosecha y postcosecha (Dadzie & Orchard, 1997). Uno de los factores que limitan el establecimiento de las plantaciones de banano a ciertas latitudes, es el daño fisiológico debido a cambios ambientales tales como son los daños ocasionados por el frío.

Parecería incongruente que en regiones tropicales y subtropicales se hable de daños por frío. Sin embargo, en la región sureste de nuestro país, durante la temporada de noviembre a marzo, la temperatura disminuye por debajo de 15°C en un período de al menos 2 horas durante la noche, e inclusive llega a temperaturas de 4°C por unos cuantos minutos (Espinosa, 2005). Estos drásticos cambios de temperatura pueden producir daño en las plantas tropicales, como es el banano; un ejemplo de esto ocurrió en Ecuador, donde una disminución drástica de la temperatura (menos de 10°C) durante la temporada invernal 2003-2004, repercutió en la producción de banano bajando su rendimiento entre un 40 y 50% (Sánchez, 2004).

Aunado a esto, se suman las pérdidas por manejo postcosecha, el banco mundial ha estimado que por manejo postcosecha se llega a perder entre un 15 y un 25% en los productos hortofrutícolas en los países desarrollados, en tanto en los países en vías de desarrollo estas pérdidas alcanzan entre un 20% y un 50% (Pólit, 2005).

Los daños ocasionados por frío, son desórdenes fisiológicos que ocurren en la mayoría de las plantas de origen tropical o subtropical, cuando estas se someten a temperaturas por debajo de los 10-12 °C (Lyons, 1973; Jones, 2000). Los cultivos de banano, son plantas sensibles al frío y sufren daños fisiológicos a temperaturas por debajo del punto crítico ($\leq 11^{\circ}\text{C}$), independientemente del tipo de cultivar (Salunkhe & Desai, 1984; Jones, 2000). Aún cuando la exposición al frío sea breve, este tiempo puede ser suficiente para inducir daños permanentes e irreversibles en la planta, así como en frutos maduros e inmaduros, y puede ser más severa si después de la exposición al frío ocurre una exposición a calor intenso. La exposición en ambas condiciones causa el pardeamiento del fruto, lo que disminuye la calidad de venta (Dadzie & Orchard, 1997).

El fenómeno de pardeamiento ocurre como consecuencia de la acumulación de compuestos fenólicos oxidados en el área epidérmica y subepidérmica del fruto, causando que la coloración varíe desde un amarillo pálido hasta un amarillo grisáceo o quede completamente negro, dependiendo de la intensidad del daño. Esta alteración es causada por la actividad de las enzimas polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) respectivamente (Gooding *et al.*, 2001).

Se considera que la causa primaria de las lesiones por frío es consecuencia de los cambios en las propiedades de la membrana celular (Levitt, 1980), esto ocasiona una cascada de reacciones secundarias, entre las cuales se incluyen el incremento en la producción de etileno, incremento de la respiración anaerobia, reducción de la fotosíntesis, interferencia en la producción de energía y la acumulación de compuestos tóxicos tales como el acetaldehído y el etanol que ocasionan alteraciones en el metabolismo celular (Levitt, 1980; Fitter & Hay, 1987; Taiz & Zeiger, 1998)

Las plantas tolerantes al frío usan mecanismos de evasión y tolerancia: la evasión consiste en el alejamiento en el tiempo o en el espacio de algún

órgano fundamental para la sobrevivencia. La tolerancia es la capacidad de resistir las alteraciones que ocasiona el frío (Iba, 2002), lo habitual es que utilicen simultáneamente ambos mecanismos. Entre las estrategias de evasión que se observan en muchas especies está la muerte de las partes más sensibles de la planta antes del invierno. Las plantas sobreviven al período frío por la persistencia de órganos que no son afectados por las bajas temperaturas, como son semillas y yemas en dormancia, bulbos o tubérculos, o bien la síntesis de ciertos compuestos de bajo peso molecular, llamados solutos compatibles (Levitt, 1980; Hällgren & Örquist, 1990; Iba, 2002).

Los solutos compatibles pueden ser de diferente naturaleza, tal es el caso de azúcares como la trehalosa y manitol, aminoácidos como la prolina, y derivados de aminoácidos como la glicina-betaína (GB) entre otros (Sakamoto & Murata, 2000). Plantas con la capacidad para acumular estos osmolitos, tal es el caso del trigo (Craig, 2004), pueden sobrevivir ante condiciones de estrés por sequía, baja temperatura y salinidad. Se ha reportado que la aplicación foliar de GB en plantas sensibles al frío puede proteger a las plantas contra el estrés causado por la baja temperatura (Gusta *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2000; Sakamoto y Murata, 2002). Además el consumo de este osmolito no tiene efectos secundarios en el cuerpo humano (Craig, 2004).

En este trabajo se decidió probar si la aplicación foliar de la GB puede tener un efecto protector ante el estrés por frío en los frutos de banano. Por esta razón, en el presente estudio se pretendió determinar el efecto de la aplicación foliar de soluciones de GB (50 y 100 mM) con el fin de reducir los desórdenes fisiológicos y bioquímicos provocados por la exposición al frío de frutos de banano variedad Enano Gigante. Además en este estudio se planeó generar información que nos permita comprender mejor el mecanismo de daño por frío y el papel que tiene GB ante el desarrollo de estos daños.

LITERATURA CITADA

- Chang M. Y., Chen S. L., Lee C. F., and Chen Y. M. (2000). Cold-acclimatization and root temperature protection from chilling injury in chilling-sensitive mungbean (*Vigna radiata* L) seedling. *Bot. Academic.* **42**: 53-59.
- Craig S A.S. (2004). Betaine in human nutrition. *Am J. Clin. Nutr.* **80**: 539-549

- Dadzie B.K., y Orchard J.E. (1997). Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. *Guías Técnicas Inibap*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. 63 p.
- Espinosa C.J. (2005). Datos de temperaturas mínimas registradas durante 2000 al 2005 en Yucatán. Sistema Meteorológico Nacional de la Comisión Nacional del Agua. Documento interno.
- Fitter A.H., and Hay R.K. M. (1987). *Environmental physiology of plants*. Second Edition. Ed. Academic Press. San Diego California. 197-221 pp.
- Gooding P.S., Bird C., y Robinson S.P. (2001). Actividad de la polifenol oxidasa y expresión génica en la fruta de los bananos Goldfinger (AAAB, FHIA-01). *Infomusa*. **10** (2): 17-22.
- Gusta V.L., Wilen R.W., and Fu P. (1996). Low-temperature stress tolerance: the role of abscisic acid, sugars and heat stable proteins. *Hort Sci*. **31** (1): 39-46.
- Hällgren J-E. and Örquist G. (1990). Adaptations to low temperatures. In: Alscher R. G., and Cumming J.R. (Eds). *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanism*. Wiley-Liss, Inc. Umeå, Sweden. 265-293 pp.
- Iba K. (2002). Acclimatative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* **53**:225-245.
- Jones D.R. (2000). *Disease of banana*. Abacá and Emset (Eds). CAB Publishing. 352-379 pp.
- Levitt, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stresses*. I. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Second Edition. Academic Press, New York. **1**: 497 p.
- Lyons J.M. (1973). Chilling Injury in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**:445-466.
- Pólit C., P. (2005). http://www.sica.gov.ec/agronegocios/sistema%20valor/postcosecha_hortifuticolas.htm. (Consultado: 2 de octubre de 2005).
- Sagarpa. (2006a). http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comagr2c.html. (Consultado: 9 mayo del 2006).
- Sagarpa. 2006b. http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_combalcomer.html. (Consultado: 9 mayo del 2006).
- Sakamoto A., and Murata N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environ.* **25**:163-171.
- Salunkhe D.K., and Desai B.B. (1984). *Postharvest Biotechnology of fruits*. Library of Congress. Florida, United State. I: 43-58pp.
- Sanchez B. (2004). Bajas temperaturas afectan al banano. Sica/Mag. www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Ing%20Rizzo/banano/bajas_temperaturas.htm. (Consultado: 13 de Febrero de 2005).
- Taiz L. and Zeiger E. (1998). *Plant Physiology*. Sinaver Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 725-757 pp.

Capítulo I. Antecedentes

1.1. GENERALIDADES DEL BANANO

1.1.1. Origen y distribución

La mayoría de los cultivares comerciales de banano descienden de las especies *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B) (Stover & Simmonds, 1987), cuyo centro de origen es el Sureste de Asia y el centro de origen secundario es el Oeste y Este de África. Los cultivares pueden ser diploides (AA, AB y BB), triploides (AAA, AAB, ABB, y BBB) o tetraploides (AAAA, AAAB, AABB y ABBB) siendo la mayoría de ellos triploides con un número cromosómico de 33 (Crouch *et al.*, 1998). Se piensa que el origen de los cultivares triploides fue el resultado de la cruce de un parental cuyo gameto era diploide con otro cuyo genoma era haploide. En cuanto a los tetraploides se cree que se originaron de gametos triploides y otro haploide o bien de la fusión de dos gametos diploides (Swennen & Rosales, 1995).

Durante muchos años subespecies diploides no comestibles de *Musa acuminata* Colla se cruzaron dando híbridos intraespecíficos. Algunos de estos híbridos fueron partenocárpicos, triploides con esterilidad femenina y frutos comestibles con capacidad de propagarse por hijuelos. El traslado de *Musa acuminata* a áreas donde crecían plantas silvestres diploides con semillas de *Musa balbisiana* produjo híbridos inter-específicos diploides y triploides de *M. acuminata* con *M. balbisiana*. Posteriormente el banano fue llevado de Indonesia a Madagascar, luego a África Oriental y África Occidental. Los portugueses llevaron los bananos a las Islas Canarias y en el siglo XVI fueron llevados a Haití, desde donde se diversificaron a diferentes partes de América (Robinson, 1996).

El banano es una planta de zonas húmedas y cálidas que se desarrolla en condiciones óptimas en las regiones tropicales y subtropicales. La luz, temperatura y reserva de agua, así como un buen contenido de nutrientes, son determinantes para el buen desarrollo del cultivo (Salunkhe & Desai, 1984; Robinson, 1996). La ubicación geográfica para el cultivo de banano se sitúa entre los 30 grados de latitud sur y 30 grados de latitud norte; las

mejores condiciones para el cultivo se presentan entre los 0 y 15 grados de ambas latitudes.

La planta de banano es muy sensible a las variaciones de temperatura, humedad, luminosidad y suelos. No se desarrolla en lugares en que la temperatura es menor a 15 grados, tampoco donde la lluvia anual es inferior a 2000 mm. Las bajas temperaturas le ocasionan quemaduras que afectan el crecimiento de la planta, y causa un lento desarrollo del fruto y daño en el mismo (Salunkhe & Desai, 1984).

1.1.2. Clasificación taxonómica

El término *Musa acuminata* se emplea para las formas puras diploides (AA) y triploides AAA, como es el caso de la variedad Enano Gigante: mientras *M. balbisiana* se aplica a las formas puras triploides BBB y diploides BB. Los híbridos de estas dos especies deben su nombre a la composición intermedia y su ploidia. La clasificación actual se basa en las características de estas dos especies y a la ploidia de los nuevos cultivares generados por la relación inter-específica. Internacionalmente se acepta que los cultivares sean referidos por el género *Musa*, seguido por el código que denote su grupo genómico, su nombre de subgrupo y nombre popular del cultivar (figura 1.1).

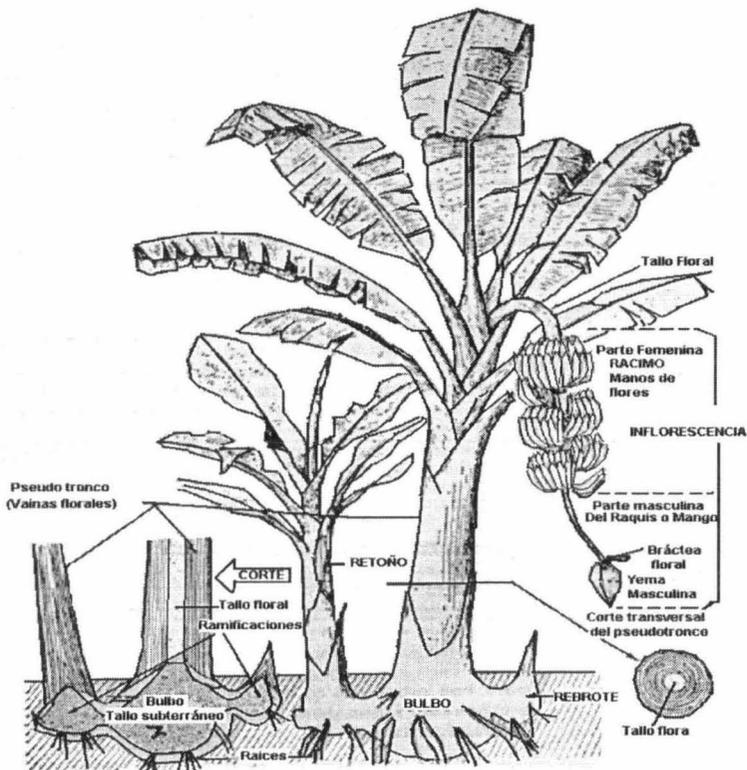
El cultivar "Enano Gigante", se designa correctamente como: *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) "Enano Gigante" (Robinson, 1996). El género *Musa* se divide en cuatro secciones (figura 1.1), la sección Eumusa es la más grande y ampliamente distribuida.

1.1.3. Descripción de la planta

En México el nombre de plátano se ha generalizado en toda la población, sin embargo de acuerdo a los especialistas la mayoría de las variedades comerciales son bananos, con excepción del plátano macho. Así las distintas especies y variedades de banano se diferencian por su tamaño, la disposición y dimensiones de las hojas, la forma y tamaño de los frutos, pero principalmente por la conformación del racimo (Cronquist, 1981).

El banano *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) "Enano Gigante", es una planta herbácea caracterizada por su baja altura (figura 1.2), es muy resistente a los vientos. La planta consiste en un corno con hijuelos,

miden de 5 a 8 mm de grosor y 1-2 m de largo, son de color blanco en estadios juveniles y grises a cafés cuando envejecen. Las raíces secundarias se originan de las primarias, mientras las terciarias de las secundarias y son las responsables de la captación de minerales y agua. La vida funcional de las raíces primarias es de 4 a 6 meses y las raíces secundarias y terciarias de 8 y 5 semanas respectivamente (Robinson, 1996).



Fuente: Stover & Simmonds (1997)

Figura 1.2. Partes de la planta de banano.

Las hojas en plantas triploides son más grandes y gruesas que en las diploides, alcanzan dimensiones de 1.5 a 2.8 metros de largo por 40 a 90 cm de ancho con pseudopetiolos de 30 a 90 cm según la variedad, se distribuyen en forma de espiral, tardan en abrirse de 6 a 8 días y tienen inicialmente una orientación vertical, las primeras hojas viven 50 días y las

demás 150 días, las hojas que salen antes de la floración son reducidas y viven entre 25 y 50 días (Stover & Simmonds, 1987).

La hoja adulta consta de cuatro partes bien diferenciadas y una quinta temporal: a) la vaina, que es la parte basal y envolvente de la hoja que forma parte del pseudotallo; b) el pecíolo, de forma de media luna y acanalado; c) la nervadura central, que es la prolongación del pecíolo y se adelgaza hacia el ápice de la hoja; d) la lámina o limbo, de forma de óvalo-oblonga con su ápice obtuso; y, e) el apéndice, que es una prolongación del nervio central y le permite a la hoja nueva abrirse paso por el pseudotallo al ir emergiendo. Una vez que la hoja ha emergido, el apéndice se marchita rápidamente y cae. Cada vaina es más larga que la anterior, por lo que los pecíolos están regularmente escalonados. Las estomas se presentan en ambas superficies de la lámina, pero son de tres a cinco veces más numerosos en el envés que en el haz de la hoja, se puede decir que son menos numerosas hacia la base de la lámina que en la parte media o en el ápice (De Large, 1987).

La inflorescencia, se desarrolla en el meristemo apical del pseudotallo, durante 4 a 6 semanas antes de emerger, el inicio del crecimiento no es visible, la inflorescencia se desarrolla cuando el meristemo apical tiene actividad mitótica intensa dando lugar a un domo. Las brácteas florales aparecen en lugar de las foliares, siendo las brácteas femeninas las primeras en formarse y posteriormente las masculinas. La inflorescencia es una espiga compleja y consiste en un pedúnculo robusto en el cual las flores se arreglan en un cúmulo nodal. Los nodos son filas dobles de flores femeninas que dan origen a las llamadas "manos" de banano, cada mano se compone de frutos llamados "dedos" (Salunkhe & Desai, 1984; Robinson, 1996).

La inflorescencia consiste de un grupo de flores, cada grupo posee entre 12-20 flores perfectas en dos filas, cubiertas por una bráctea roja, florece una sola vez y mueren después de haber tenido frutos. Las flores poseen un pistilo y estambres y pueden ser de 3 tipos: femeninas, neutras y masculinas, las primeras son largas y poseen un ovario bien desarrollado y estambres reducidos (estaminoides); las flores masculinas, poseen un ovario abortivo y se desprenden por completo después de haber sido expuestas (Stover & Simmonds, 1987).

Los racimos, están formados por los frutos y su tamaño se establece por el tamaño del meristemo en el momento de la fecundación, los frutos individuales se desarrollan de las flores femeninas y son llamados dedos, el número de manos por racimo y dedos por mano se determina al inicio de la floración por el número de flores femeninas, por mano se tiene entre 10 y 30 dedos (Salunkhe & Desai, 1984), en el caso de la variedad Enano Gigante, esta posee entre 12 y 16 dedos por mano. El tamaño de los dedos depende de la variedad, número de hojas, fertilidad del suelo, irrigación y temperatura, los bananos AAA Cavendish producen de 5-6 manos en los subtrópicos y en los trópicos hasta 16, cuyo peso va de 15 a 70 kg (Robinson, 1996).

Los frutos son bayas con pericarpo, poseen una masa de semillas negras que no son viables, se desarrollan por partenocarpia, esto es que desarrollan la pulpa comestible sin polinización lo cual ocurre en las flores femeninas (Crouch *et al.*, 1998), el crecimiento de los dedos es acelerado en los primeros 30 días y este se completa entre los 40 y 80 días dependiendo del clima (Swennen & Vulylsteke, 1993).

Los hijuelos, pueden ser de dos tipos: los espadas y los acuosos, los primeros se originan de brotes axilares y la parte inferior del rizoma madre, poseen fuerte conexión materna, con bases anchas y hojas angostas. Mientras los hijuelos acuosos, se originan de brotes cercanos a la superficie del suelo o de rizomas viejos, tiene una débil conexión con el rizoma madre, poseen bases angostas y hojas gruesas, no se desarrollan en plantas fuertes y vigorosas (Soto-Ballesteros, 1985). Es por eso que los cultivares de banano son completamente estériles y por dicha razón se propagan vegetativamente mediante la generación de hijuelos.

1.1.4. Proceso de maduración

La vida de los frutos puede dividirse en tres etapas fisiológicas fundamentales: el crecimiento, la maduración y la senescencia (Wills *et al.*, 1984), es difícil hacer una distinción clara entre ellas. El crecimiento, implica la división celular y desarrollo de las células, que en conjunto dan cuenta al tamaño final de los frutos de la planta.

La maduración se inicia antes que termine el crecimiento; es el periodo en el cual los procesos anabólicos dan lugar a los catabólicos lo que conduce al envejecimiento y muerte del fruto. La maduración de consumo es el

proceso en el cual las frutas adquieren las características de color, olor, textura y sabor entre otros factores que las identifican como comestibles, esta etapa comienza en la parte final de la madurez fisiológica y constituye el inicio de la senescencia (Baur & Woarkman, 1964; Wills *et al.*, 1984). Tanto el crecimiento como la maduración fisiológica de las frutas exigen que permanezcan en la planta, pero la maduración de consumo y la senescencia pueden tener lugar durante postcosecha.

1.1.4.1. Cambios fisiológicos y bioquímicos durante la maduración

Durante la maduración del fruto ocurren cambios fisiológicos y bioquímicos que le dan las propiedades y características a los frutos. Los cambios fisiológicos más importantes son los de la actividad respiratoria y los ritmos de producción de etileno que se incrementan durante la maduración (Salunkhe & Desai, 1984). Otros cambios observables son la maduración de las semillas, cambios en el color del fruto, abscisión de los frutos, desarrollo de cera en la epidermis del fruto entre otros cambios (Pratt, 1975).

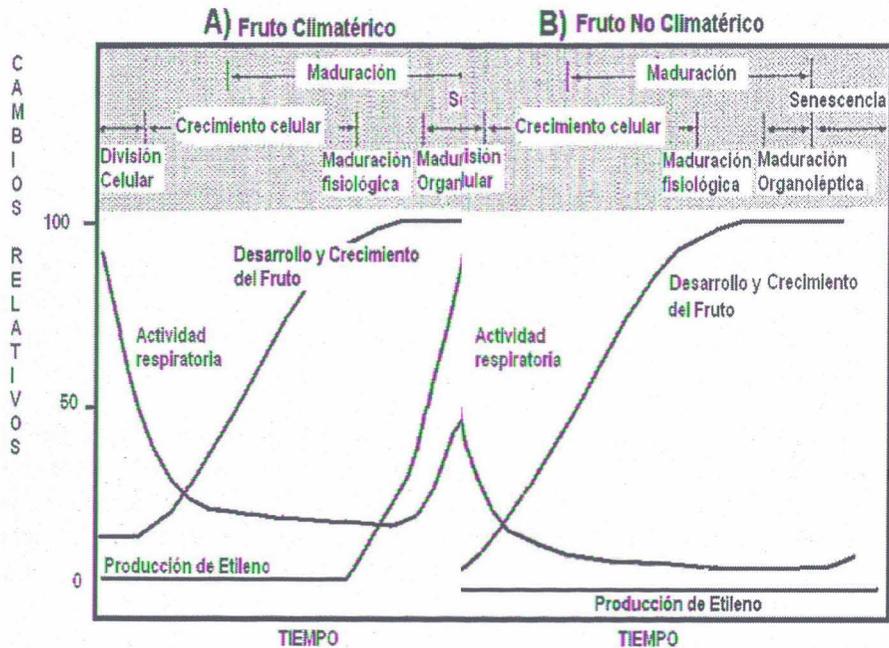
Estos cambios en la actividad respiratoria, son debidos a que durante la maduración de consumo del fruto se requiere de síntesis de proteínas así como nuevos pigmentos y componentes del sabor que son sintetizados a través del metabolismo, estos procesos requieren de energía y son suministrados en el fruto por la respiración (Biale & Young, 1981; Nelson & Cox, 2000).

Existen importantes diferencias en los patrones respiratorios de los frutos (figura 1.3), dependiendo de las condiciones ambientales, así como de las características de la especie y el estado de desarrollo, factores que en conjunto determinan la actividad respiratoria.

El climaterio de los frutos corresponde a un período donde se registra un aumento significativo de la actividad respiratoria asociada al final del proceso de maduración. Este período de respiración climatérica, es una fase de transición entre la maduración y la senescencia (Biale & Young, 1981).

Con base en esto, los frutos se clasifican como climatéricos y no climatéricos (figura 1.3); los primeros presentan un pico característico de la

actividad respiratoria antes de la ón, también llamado climaterio respiratorio, el banano es un fructotipo (figura 1.4). Los frutos no climatéricos, por el contrario non un incremento de la tasa respiratoria durante el proceso de ón, sino que muestran una tasa respiratoria lenta durante la senescatt, 1975; Biale & Young, 1981; Wills *et al.*, 1984; Wan & Gemma,



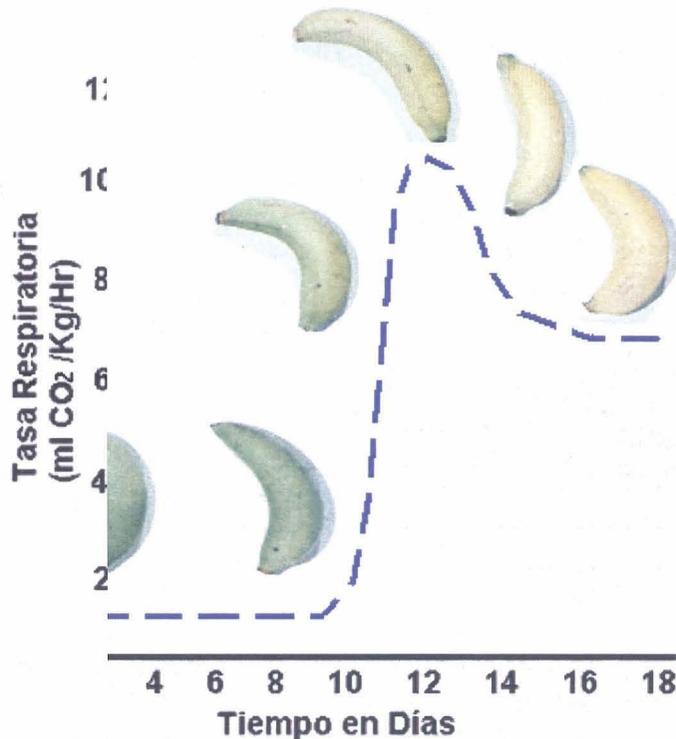
Fuente: Pratt (1975)

Figura 1.3. Diferencias en el patrón respiratorio y producción de etileno de un fruto climatérico (A) y uno no climatérico (B) durante el desarrollo, maduración y senescencia.

El incremento respiratorio está asociado con el patrón de síntesis de etileno, el cual puede darse antes o después de la actividad respiratoria, a veces en forma simultánea como el caso del banano (Salunkhe & Desai, 1984).

El etileno dispara los procesos enzimáticos de la mayor parte de los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante la maduración,

los cuáles afeopiedades organolépticas y físicas y marcan el inicio de la ser (Yang, 1981; Beyer, 1981; Biale & Young, 1981; Gómez-Lim, 1981). En los frutos climatéricos una vez que se produce cierta cantidad de etileno se vuelve irreversible, se producen cambios fisiológicos como en la permeabilidad de la membrana, síntesis de ácidos nucleicos, aumento en la actividad enzimática y otros compuestos (Baur & Woarkman, 1964; Pratt, 1975; Beyer, 1981; Hobson, 1981; *et al.*, 1984; Hubbar *et al.*, 1990; Wang & Gemma, 1994).



Fuente: Sáenz

Patrón de la tasa respiratoria del banano.

Se han postulado sistemas para la producción de etileno en frutos: El Sistema I produce etileno basal y por heridas y el Sistema II es responsable de la autocatalisis. Los frutos climatéricos poseen ambos sistemas, mientras que en los frutos no climatéricos solo está presente el sistema I (Pratt, 1975; Yang, 1981; Ye).

Simultáneamente, durante el proceso de maduración hay transformación de cloroplastos a cromoplastos ricos en carotenoides, producción de antocianinas y compuestos aromáticos (Seymour *et al.*, 1993; Cayón *et al.*, 2000). Según Smith (1981) y Knee y Bartley (1981), la degradación de la pared celular y la pérdida de almidón son los procesos que generan un mayor cambio en la textura de los bananos durante la maduración, disminuyendo la firmeza del fruto. El contenido de sólidos solubles se incrementa conforme avanza el proceso de maduración, y estos son principalmente azúcares. Los cambios de la acidez en los frutos se deben a los ácidos ascórbico y málico que se incrementan durante la maduración y descienden en el estado sobremaduro o muy amarillo (Harris & Poland, 1957).

Los principales carbohidratos son los polisacáridos y disacáridos, cuya cantidad está relacionada directamente con los procesos de llenado y madurez fisiológica (Knee & Bartley, 1981). En relación con los polisacáridos, el almidón representa entre el 20 y 25% del peso fresco de la pulpa (Belalcázar *et al.*, 1991; Seymour *et al.*, 1993), y el 80% de los carbohidratos en ese estado de madurez (Belalcázar *et al.*, 1991).

Los bananos se cosechan en madurez fisiológica (verdes) y durante la maduración los carbohidratos se degradan en azúcares, presentando una disminución del almidón (Knee & Bartley, 1981; Seymour *et al.*, 1993). Hubbard *et al.* (1990) y Seymour *et al.* (1993) manifiestan que durante la maduración el almidón es degradado rápidamente a azúcares más sencillos, acumulándose principalmente glucosa, fructosa y sacarosa. Según Linaza (1976), este patrón característico del metabolismo de los carbohidratos puede ser alterado bajo ciertas condiciones ambientales, como la exposición a temperaturas extremas durante el proceso de maduración (Wang & Gemma, 1994; Knee & Bartley, 1981). La mayoría de los azúcares totales de los frutos de banano son azúcares reductores que aumentan durante la maduración (Seymour *et al.*, 1993; Sáenz, 1999).

Según Sáenz (1999) y Cayón y colaboradores (2000), después de la cosecha la cantidad total de compuestos nitrogenados permanece constante, pero presenta un ligero incremento en el contenido de proteína durante el inicio del climaterio. La concentración de proteína total en la pulpa de los frutos de plátanos y bananos es baja (Cayón *et al.*, 2000; Maldonado & Pacheco, 2000).

1.1.4.2. Grados de maduración

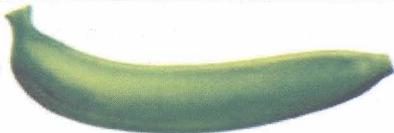
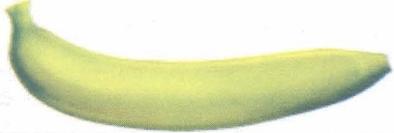
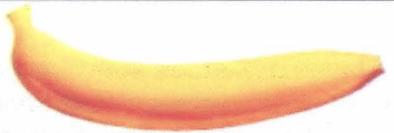
El banano es un fruto climatérico, durante su maduración y hasta alcanzar la madurez de consumo se observan cambios en el color, la firmeza del fruto, y pérdida de peso, entre otras características (Dadzie & Orchard, 1997). Químicamente hay cambios de acidez, sólidos solubles, azúcares totales y reductores, humedad, etc., debido al proceso de degradación del almidón (Knee & Bartley, 1981; Seymour *et al.*, 1993; Cayón *et al.*, 2000). Para el caso del banano, los cambios en el color de la epidermis son muy evidentes y guardan una estrecha correlación con otros cambios químicos que ocurren durante la maduración: esta situación ha permitido crear cartas visuales de color que permiten diferenciar siete estados de maduración del banano (figura 1.5) (Banacol, 2004).

1.1.5. Importancia económica

El banano constituye una fuente de divisas importante a nivel mundial, se estima que su producción en el 2003 fue de 69.82 millones de toneladas, lo que lo hace el cuarto producto comestible más importante después del arroz, trigo y leche (FAO, 2005). Su importancia se incrementa en los trópicos, donde representa un recurso alimenticio estable para más de 400 millones de personas.

El 23.2% de la producción mundial de esta fruta fue exportada durante el 2003, generando un ingreso económico de 4.3 millones de dólares. Cinco países concentran más del 50% de la producción mundial de las variedades "Roatán", "Dominico", "Manzano" y "Burros", de los cuales dos se encuentran en América (Brasil y Ecuador) y tres en Asia (India, China y Filipinas) (ver inciso A de la figura 1.6).

En México la producción de bananos es una de las actividades agrícolas de mayor impacto económico en las regiones donde se desarrolla, en el 2005 ocupó una superficie de 72,645 hectáreas cosechadas, de las cuales se obtuvieron 2.026610 millones de toneladas de fruta (ver inciso B de la figura 1.6.), con un rendimiento de 27.89 ton/ha, destinándose casi el 95% de la producción para el consumo nacional (Sagarpa, 2006). Las expectativas de producción de banano para el 2006, son aumentar la superficie sembrada a 77,948 ha con una producción de 2.088 millones de toneladas y un rendimiento de 26.792 ton/ha.

IMAGEN	CARACTERÍSTICAS	GRADO DE MADUREZ
	<p>Totalmente Verde Este es el color del banano, ya esta maduro fisiológicamente, esto es que alcanzó la talla y grosor máximo, en este grado se reciben en las bodegas o centros de distribución.</p>	<p>1</p>
	<p>Verde Claro Indica que el proceso de maduración ha comenzado.</p>	<p>2</p>
	<p>Mitad Verde-Mitad Amarillo Indica que gran parte de los almidones se han convertido en azúcares. En este punto el banano está listo para ser enviado al punto de venta.</p>	<p>3</p>
	<p>Más Amarillo que Verde El banano está listo para ser exhibido en el punto de venta. El consumidor se ve atraído por una fruta de "larga duración".</p>	<p>4</p>
	<p>Amarillo con Puntas Verdes En esta etapa los almidones han sido transformados en glucosa, fructosa y sacarosa que le da el sabor característico al banano. Esta es la fruta que debe ser exhibida.</p>	<p>5</p>
	<p>Completamente Amarillo Buen sabor y excelente presentación.</p>	<p>6</p>
	<p>Amarillo con Puntos Café Este el punto del mejor sabor debido a su alto contenido de azúcar y buena consistencia.</p>	<p>7</p>

Fuente: Banacol, 2004

Figura 1.5. Grados de madurez de acuerdo a los cambios de color de los frutos de banano durante su maduración.

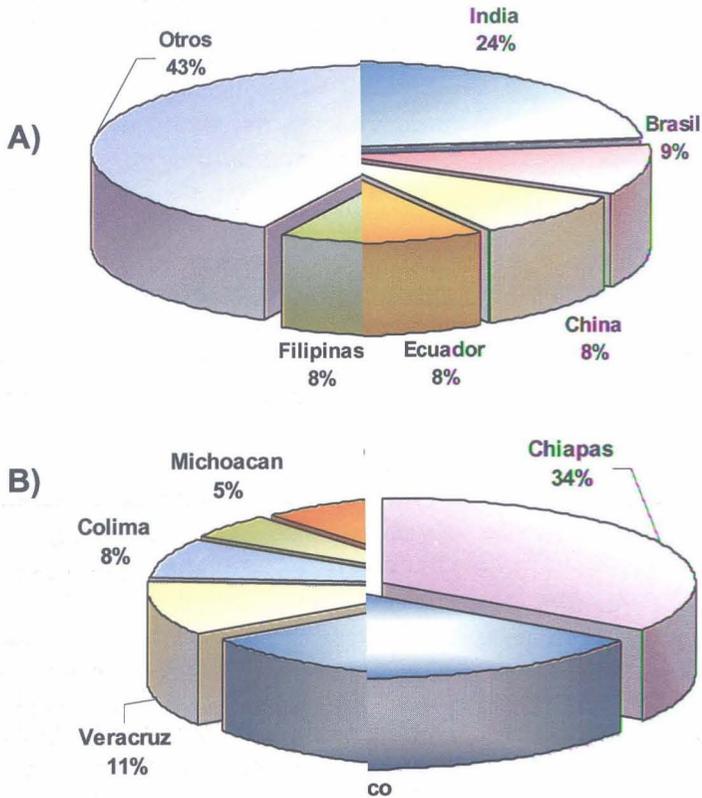
En nuestro país tienen una amplia gama de variedades, entre las que destacan el Tajo Roatán (Enano-Gigante), Valery (subgrupo Cavendish, AAA)zano (AAB), Dominico y Macho (subgrupo Plantain, AAB), Blanco y lo; Pera (ABB) y Dátil (AA) (Orozco-Santos *et al.*, 2001), aunque si Tabasco en mayor medida así como el dominico y macho en menor se destinan a cubrir el mercado externo, mientras que las variedades antes se destinan al consumo interno.

En la década por el cultivo de banano se realizó en 18 entidades; no obstante, a pesar de número de entidades que cultivaron bananos, sólo cinco (Chiapas, Veracruz, Michoacán y Colima) concentraron más del 70% de superficie sembrada y cosechada, así como de la producción total (a *et al.* 1999a; Sagarpa, 2006).

El valor generadas exportaciones en el 2005 representó 25,341 miles de dólares, divisas resultaron ser importantes en una economía en la que la falta de divisas es constante, pero que además evidencia el carácter de renta que tiene esta fruta en el comercio exterior (Olvera *et al.* 1999b; Sagarpa 2006).

En el caso de las importaciones de banano estas han sido insignificantes, de hecho se observa que desde 1927 y hasta 1987, no hubo importaciones de bananos a nuestro país. No fue sino hasta el año de 1988, cuando se inician, aunque a niveles muy reducidos. Durante el periodo 1990 a 1997, se importaron un total de 1,017 toneladas (Olvera, 1999b).

A partir de la entrada en vigor el Tratado de Libre Comercio de Norteamérica, el banano quedó libre de arancel, en los tres países integrantes de este tratado; este hecho sugiere mejores condiciones y mayor facilidad de flujo del banano mexicano hacia Estados Unidos y Canadá, sobre lo se considera que ambos países no son productores de esta fruta.



Fuente: FAO (2005) y Sagarpa

Figura 1.6. Producción de banano; a nivel mundial (A) y nacional (B).

1.1.6. Importancia nutricior

Además de la importancia ec que tiene el banano, este fruto también representa una fuente e de nutrimentos, ya que es rico en vitamina A, B y C además des como fósforo, calcio y potasio (tabla 1.1).

Los bananos se pueden como procesados, ya sea cocidos al vapor, fritos o asados, en forminas, en postres como galletas y pasteles, en forma de licores pueden ser usados como plantas medicinales. El banano por stdades curativas se utiliza para el

tratamiento de la tos, asma y bronquitis: la cáscara machacada de los frutos de banano puede ser utilizada para hacer cataplasmas para las heridas, que el interior de la cáscara tiene propiedades antisépticas (101).

Tabla 1.1. *Valores nutricionales del banano por cada 100 g de la fruta.*

ENTE	CONTENIDO	UNIDAD
Valor Energético	104	Kcal
Humedad	70	%
Carbohidratos	27.0	g
Proteínas	1.2	g
Grasa	0.3	g
Fibra	0.5	g
Ceniza	0.9	g
Calcio	80	ppm
Fósforo	290	ppm
Hierro	6	ppm
Potasio	19.20	ppm
β- caroteno (a A)	2.4	ppm
Tiamina (Vit B1)	0.5	ppm
Riboflavina (a B2)	0.5	ppm
Piridoxina (VB3)	3.2	ppm
Niacina	7	ppm
Ácido ascórbico (Vit C)	120	ppm

Fuente: Stovebonds (1987)

Los bananos son una fuente de fibra que se usa extensamente en la manufactura de papeles, especialmente cuando se requiere una extraordinaria. El papel se utiliza, entre otras cosas, para hacer bolsas de té y onedra. La fibra también puede ser utilizada en la manufactura de sogas, cuerdas e hilos, y en la producción de artesanías (111).

1.1.7. Problemas de cultivo

La producción no se enfrenta a la amenaza de enfermedades y plagas como los casos de la especie *Rodopholus simili* y el barrenillo del

plátano, los pulgones y el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*). Así como también de otras enfermedades, entre las que destacan la Sigatoka negra y el Mal de Panamá, causado por los hongos *Mycosphaerella fijiensis* y por *Fusarium oxysporum* l. sp *cubense* respectivamente: la primera produce manchas en las hojas y la segunda causa la necrosis de los tejidos al taponar los vasos conductores de savia. Entre las enfermedades causadas por bacterias se encuentra la enfermedad del moko, ocasionada por *Pseudomonas solanacearum*. Las enfermedades virales como el “bunchy top” y el virus del mosaico del pepino impactan de manera importante al banano (Thomas, 2000; Hirimburegama *et al.*, 2004).

Además de las enfermedades ocasionadas por patógenos, también existen desórdenes fisiológicos causados por ciertos tipos de estrés ambiental. Los desórdenes fisiológicos simplemente se refieren al colapso del tejido de la planta o de la fruta que no es causado por la invasión de patógenos ó por daños mecánicos. Estos pueden desarrollarse en gran medida como respuesta a un ambiente adverso, especialmente la temperatura o a la deficiencia nutricional durante el crecimiento y desarrollo (Wills *et al.* 1984; Dadzie & Orchard, 1997) y por manejo postcosecha inadecuado (Pólit, 2005).

La mayoría de los desórdenes fisiológicos afectan ciertas áreas del tejido como la epidermis del fruto, la pulpa o la región cortical (Dadzie & Orchard, 1997). Los principales desórdenes fisiológicos que pueden ocurrir en los cultivos de banano son: la caída de los dedos, debido a una maduración rápida por temperatura alta, la partición de la cáscara cuando hay deficiencias hídricas y los daños por frío debido a una disminución en la temperatura. El banco mundial ha estimado pérdidas desde un 25 hasta un 50% por manejo postcosecha, pérdidas ocasionadas principalmente por daños por frío después de que las cámaras de enfriamiento bajan la temperatura por debajo de los 13°C. Estos desórdenes fisiológicos disminuyen la calidad de la fruta y por lo tanto su valor en el mercado (Dadzie & Orchard, 1997; Pólit, 2005).

1.2. DAÑOS POR FRÍO

Todas las etapas del ciclo de vida de una planta como son germinación, crecimiento, floración y fructificación, pueden ser afectadas por las bajas temperaturas; en cada una de ellas existe una temperatura crítica misma que marca el límite inferior en que cada etapa puede llevarse a cabo. Como

cada proceso fisiológico tiene una temperatura óptima particular, se puede definir un intervalo óptimo de temperatura, por debajo del cual se produce una disminución generalizada de la tasa metabólica (Nilsen & Orcutt, 1996).

Una manera de medir el efecto de la temperatura sobre la velocidad de un proceso fisiológico es mediante el uso del índice Q_{10} , (cociente entre la velocidad del proceso en cuestión a una temperatura t_i y su velocidad a una temperatura diez grados superior ($t_i + 10^\circ\text{C}$)).

En general, los procesos en que hay transformaciones químicas, como los catalizados por enzimas, tienen valores más elevados de Q_{10} (alrededor de 2). Mientras que en los procesos meramente físicos, como es la difusión del agua o de sustancias disueltas en ella los valores oscilan entre 1 y 1.3. La caída de la temperatura por debajo del punto óptimo, afecta más al primer tipo de proceso que al segundo. Cuanto más baja sea la temperatura, mayor es su efecto en el proceso metabólico y más días necesitará la planta para completar el ciclo fisiológico (Fitter & Hay, 1987).

La susceptibilidad de las plantas a la baja temperatura es variable, depende de la especie, del estado fisiológico y las condiciones ambientales a las cuales están expuestas. Las plántulas, semillas en germinación, las flores y las raíces son muy sensibles a la baja temperatura (Levitt, 1980; Hällgren & Örquist, 1990).

1.2.1. Estrés por baja temperatura

El estrés por baja temperatura que experimentan las plantas puede ser clasificado en dos tipos de acuerdo a la intensidad de factor (Iba, 2002):

- Daños que ocurren a temperatura por debajo del congelamiento.
- Daños por frío que ocurren a temperatura por arriba del congelamiento.

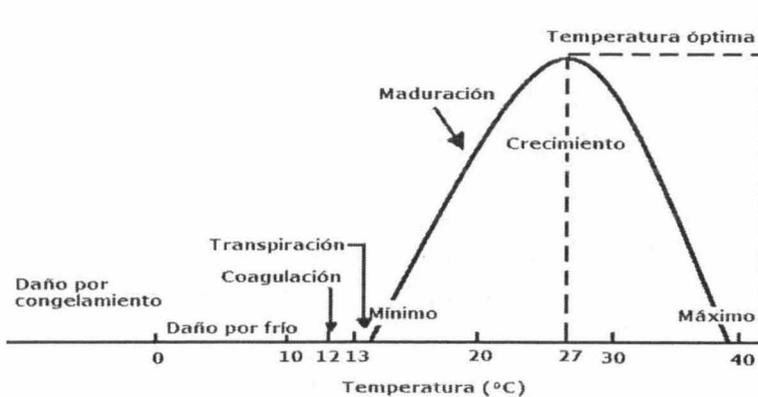
La diferencia entre estos dos tipos de estrés; es que el daño por frío comprende un rango de temperatura entre los 0 y 10°C , ocasionando cambios en la tasa de reacción de actividades enzimáticas y cambios de fase de los lípidos de la membrana, lo que conduce a una serie de alteraciones fisiológicas y desbalance metabólico. El daño por congelamiento abarca una temperatura menor de 0°C con la formación del hielo intercelular (Larcher; 1995; Takle, 1997; Taiz & Zeiger, 1998).

Daños por congelamiento

Cuando la temperatura es inferior de los 0°C, se produce el daño por congelamiento en las plantas sensibles, se forma hielo intracelular, los cristales de hielo lesionan las membranas internas de las células incrementando la porosidad de la membrana y la pared celular, hay concentración de sales lo que provoca la transferencia de agua desde las células al medio extracelular causando la deshidratación celular y estrés iónico. Todos estos cambios alteran el metabolismo y ocasionan desórdenes fisiológicos en la planta. La velocidad de descongelamiento, también contribuye al daño, ya que la célula no logra reparar a tiempo las fisuras ocasionadas por el congelamiento.

Daños por frío

Se originan cuando la temperatura no es tan baja como para que se forme hielo en los tejidos; en el caso de las plantas tropicales, subtropicales y algunas plantas de clima templado, presentan los daños por frío cuando la temperatura es más baja de 10 y 12°C, el cual es considerado el punto crítico (Lyons, 1973; Salunkhe & Desai, 1984; Dadzie & Orchard, 1997). En el caso del banano, esta planta sufre daños por frío cuando la temperatura baja de los 12°C (figura 1.7) debido a la coagulación del látex (Salunkhe & Desai, 1984).



Fuente: Salunkhe & Desai (1984)

Figura 1.7. Relación de la temperatura en el crecimiento y desarrollo en plantas de banano.

Los daños por frío son desórdenes fisiológicos que ocurren debido a lesiones generalizadas en las membranas celulares. Estos desórdenes se

producen porque los lípidos que componen la membrana sufren una transición de fase y pasan del estado de líquido al estado sólido cristalino o gel. Las alteraciones en las membranas van acompañadas por considerables cambios en su permeabilidad; también se dañan las mitocondrias, compartimientos intracelulares en los que ocurre la respiración. El grado de los daños ocasionados por el frío depende de la intensidad y duración de la baja temperatura, si son breves estos trastornos en el metabolismo pueden ser reparados y el daño no ocurre. Los daños ocasionados por el frío se caracterizan por:

- Cambios celulares.
- Alteración del metabolismo.
- Reducción del crecimiento.
- Frutos inmaduros pierden la habilidad de madurar.
- Pérdida de vigor.
- Pardeamiento de la epidermis y degradación de la pulpa, en frutos.

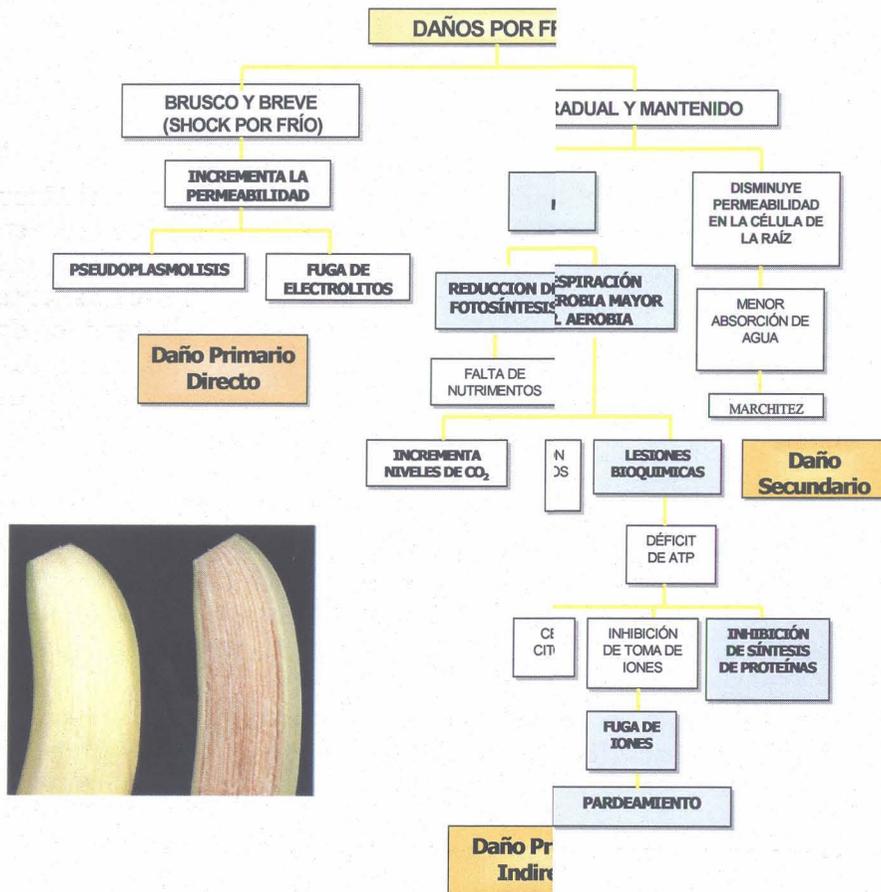
1.2.2. Síntomas fisiológicos del daño por frío

Cuando una planta ha sufrido daño por frío se observan los siguientes síntomas (Lyons, 1973; Nielsen & Orcutt, 1996; Ayora *et al.*, 2002 y Artés & Artés-Hernández, 2003):

- Lesiones superficiales: hundimientos de epidermis, decoloración por degradación de clorofilas.
- Pérdida de agua: desecación y arrugamiento.
- Oscurecimiento interno y tejido dañado.
- Incapacidad para madurar.
- Senescencia acelerada.
- Cambios en la composición, sabor y textura del fruto.
- Disminución del crecimiento y pérdida de la capacidad para brotar.
- Reducción de la capacidad de toma de agua de la raíz ocasionando la Marchites.
- Incremento en la permeabilidad de la membrana.
- Mayor susceptibilidad al ataque de patógenos.
- Pardeamiento en frutos.
- Clorosis.
- Inhibición del crecimiento de la raíz.
- Aumento de la tasa respiratoria anaerobia.

1.2.3. Mecanismo de daño por frío

De acuerdo con Raison y Orr (1990) el curre en dos etapas; una respuesta primaria cuya naturaleza es fisiica y se refiere al cambio de fase de los lípidos de la membranasar de un estado líquido cristalino a un sólido gel. Este cambia la conformación de las membranas, alteran las funciones de las , lo cual lleva a una serie de respuestas secundarias que son la ión de la alteración del metabolismo y que finalmente se hace evirn los síntomas visibles del daño por frío (figura 1.8).



Fuente: Lyons (1973), Levitt (1980) y Raiscr (1990).

Figura 1.8. Mecanismo de daño en plantas.

Tanto las respuestas primarias como las secundarias pueden ser reversibles si la temperatura no es tan drástica y el tiempo de exposición es breve (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Taiz & Zeiger, 1991).

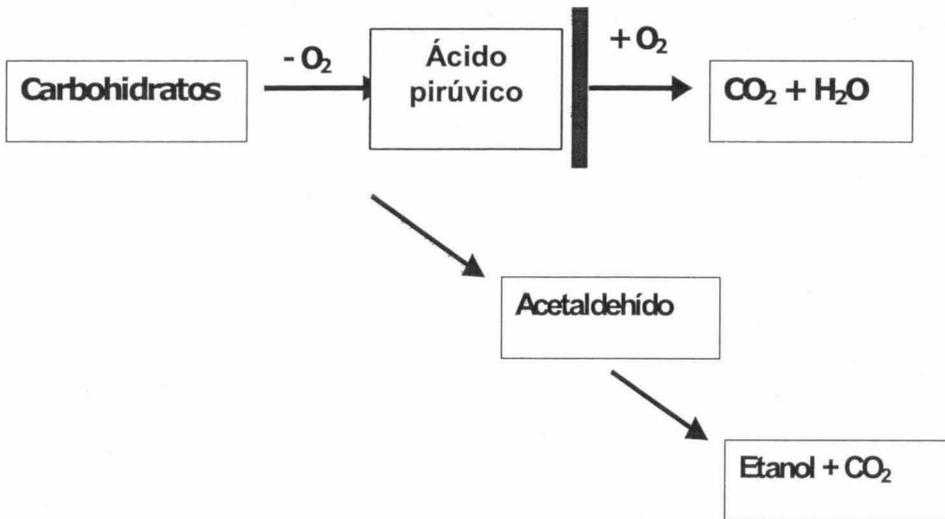
Durante la primera etapa del mecanismo de daño por frío (figura 1.8) se propone que las membranas celulares pasan de un estado líquido cristalino a un estado sólido de tipo gel (Raison *et al.*, 1979; Raison & Orr, 1990). Esta solidificación resulta en la formación de canales que provocan el incremento de la permeabilidad de la membrana y en consecuencia la fuga de electrolitos; la liberación de solutos como el K⁺ provocan el cese del movimiento protoplasmático y pseudoplasrólisis. Otras lesiones que se presentan por el cambio de las propiedades de la membrana, son en el funcionamiento de proteínas asociadas a ésta, causando un desbalance metabólico y acumulación de compuestos que pueden ser tóxicos para la planta.

Dentro de las respuestas secundarias se encuentran los disturbios respiratorios que ocasionan que la toma de oxígeno disminuya, se reduzca la síntesis de ATP, se detenga el transporte activo y la absorción de iones K⁺ (Lyons, 1973; Levitt, 1980). Se ha reportado que la respiración durante el estrés por frío se modifica, aumenta la respiración anaerobia y la tasa de producción de CO₂ (Levitt, 1980). Parte de estos cambios se deben a que disminuye la fosforilación oxidativa por el daño que sufren las proteínas que se encuentran involucradas en este proceso (Larcher, 1995).

Otro proceso de la planta que se ve afectado es la fotosíntesis, debido al daño de la membrana de los cloroplastos que son más sensibles al frío. La parte más afectada es el fotosistema II, principalmente en la proteína D1, que conforma el centro activo, y pierde su estructura cuaternaria (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Makela *et al.*, 1999). Estos disturbios en el metabolismo ocasionan que la tasa respiratoria exceda al de la fotosíntesis, lo cual reduce la síntesis de glucosa (Lyons, 1973; Levitt, 1980). Debido a la escasez de ATP, la traslocación de azúcares (almidón) fuera de los cloroplastos se bloquea, la síntesis de proteínas disminuye provocando que la planta no sea capaz de reponer su pérdida; todas estas alteraciones se reflejan en la reducción del crecimiento (Raison *et al.*, 1979; Lyons, 1973)

Además el desbalance de estos procesos bioquímicos, provocan la acumulación de compuestos tóxicos para la planta; compuestos como acetaldehído y etanol. En la figura 1.9 se ilustra el cambio en la respiración

y en la misma se observa que la respiración aerobia queda inhibida. Este hecho conduce a un incremento en los niveles de O_2 , moléculas disponibles a las peroxidasas y polifenol oxidasas. Esta acumulación de O_2 produce la formación de peróxidos y especies activas de oxígeno provocando un estrés oxidativo; esto afecta a los fotosistemas I y II e induce a la peroxidación de la membrana (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Shewfelt & Erickson, 1991; Ni-Nong Xu *et al.*, 2003).



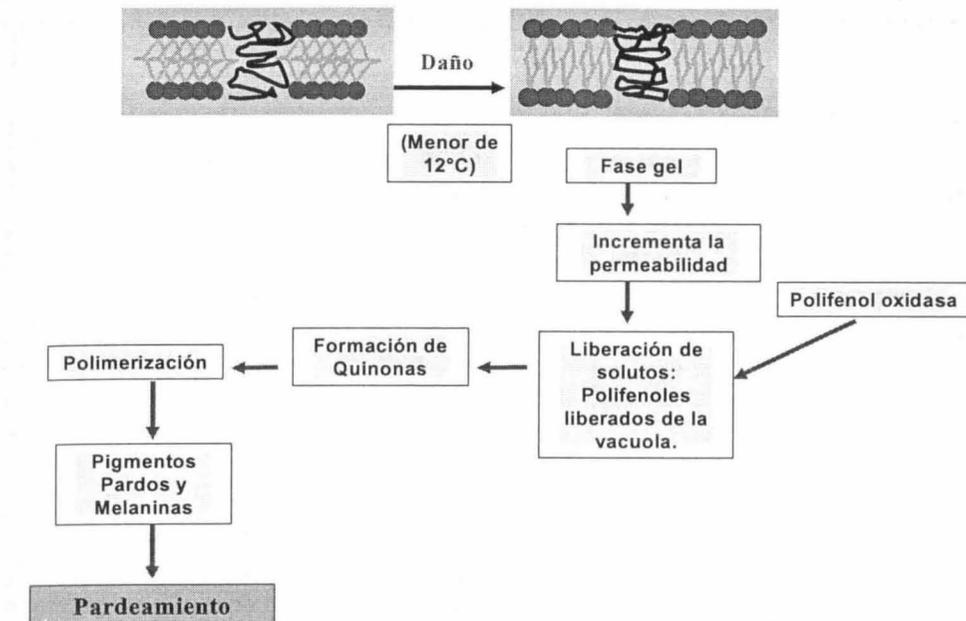
Fuente: Levitt (1980)

Figura 1.9. Daño por frío, en el proceso respiratorio.

Cuando las plantas han estado expuestas a frío y muestran lesiones unas horas o un día después de la exposición, se menciona que el daño es directo, estas lesiones ocurren rápidamente y se le llama choque por frío. Pero cuando las lesiones requieren de días o semanas para que aparezca el daño, se les denomina como lesiones secundarias.

1.3. FENÓMENO DE PARDEAMIENTO

Uno de los síntomas visuales que ocurre comúnmente y que es característico del daño ocasionado por frío en los frutos de banano es el pardeamiento de la epidermis (figura 1.10). Este síntoma surge como consecuencia de la acumulación de sustancias fenólicas oxidadas en las áreas epidérmicas y subepidérmicas, evento causado por la acción de la polifenol oxidasa sobre los fenoles (Gooding, 2001a).



Fuente: Gooding (2001a)

Figura 1.10. Fenómeno de pardeamiento en banana.

1.3.1. La polifenol oxidasa

La polifenol oxidasa (PPO: Ec 1.10.3.2) es la enzima responsable del pardeamiento en la fruta del banana, esta enzima presenta varias isoformas que son codificadas por 4 genes nucleares, los cuales son *bp01*, *bp011*, *bp034* y *bp035* (Gooding *et al.*, 2001b). La polifenol oxidasa (PPO) y sus isoformas, tienen un peso molecular comprendido entre 40 y 70 KDa (Gooding *et al.*, 2001a; Tamayo, 2002).

Estas enzimas, en su secuencia de aminoácidos, revelan la presencia de regiones capaces de unir cobre y que son altamente conservadas; el cobre es necesario para la actividad de la PPO. La PPO se encuentra localizada en plastidios asociado a la membrana interna del cloroplasto, en mitocondrias o bien en forma soluble (Meyer & Harel, 1981; Tamayo, 2002; Yang *et al.*, 2004) quedando físicamente separado de sus sustratos fenólicos localizados en la vacuola (Meyer, 1987; Gooding *et al.*, 2001a). Algunas características de esta enzima son; tiene un punto isoeléctrico de

6.2, el pH óptimo es de 5.5 y una constante (K_m) de 0.5 mM en presencia de dopamina, un sustrato natural de la PPO en banano (Palmer, 1971; Yang *et al.*, 2004).

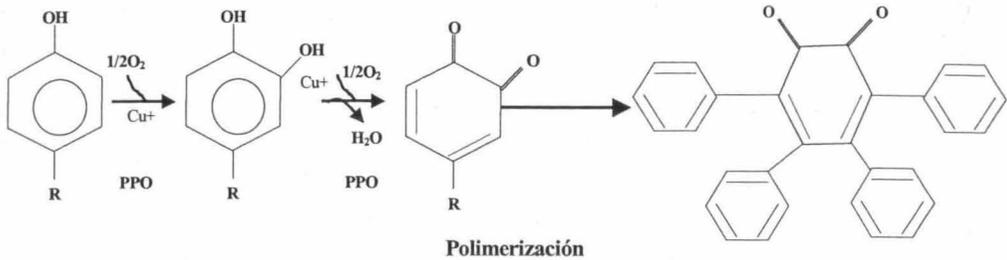
La oxidación de compuestos fenólicos por la polifenol oxidasa es la causa principal de la coloración café en muchas frutas y vegetales durante su manejo, almacenaje y procesamiento (Meyer & Harel, 1981). Este fenómeno es de importancia considerable por el efecto que tiene en la calidad nutricional y apariencia que produce, reduciendo la aceptabilidad lo cual impacta económicamente (Salunkhe & Desai, 1984). La reacción del pardeamiento ocasionada por la PPO, inicia solamente en tejidos dañados, cuando existe una pérdida en la compartimentalización celular provocando la liberación de los fenoles y por lo tanto permite ponerse en contacto con la PPO (Gooding *et al.*, 2001b; Nguyen *et al.*, 2003).

Existen evidencias de que la actividad de la PPO es elevada en tejidos jóvenes y regiones meristemáticas, la expresión de genes decrece durante el desarrollo y maduración del tejido de la planta (Meyer & Harel, 1981; Yang *et al.*, 2004). En el caso del banano existen diferentes isoformas en tejido meristemático (3 isoformas), en la pulpa (9-14 isoformas) y cáscara de la fruta (10 isoformas) (Gooding *et al.*, 2001a).

La polifenol oxidasa cataliza dos reacciones en presencia de oxígeno: primero, tiene lugar la hidroxilación de monofenoles a difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa) y posteriormente, los difenoles formados se transforman en quinonas (actividad o-difenolasa o catecolasa) (Meyer & Harel., 1981; Tamayo, 2002). El primer producto de la oxidación enzimática son las o-quinonas (figura 1.11), estas moléculas tienen diferentes propiedades espectrales y su color depende básicamente del pH y del fenol que lo origina (Nicolás *et al.*, 1994). Para que la enzima actúe, es necesario la presencia de cobre (Cu^{+2}) en su centro activo, estado en el que la enzima puede ligar oxígeno (Robb, 1981; Meyer & Harel, 1981). La formación de complejos de cobre da lugar a una inhibición de su actividad.

Las reacciones de pardeamiento progresan a una segunda fase, en la cual a partir de las quinonas formadas, que son moléculas muy reactivas, se condensan rápidamente combinándose con grupos amino ó sulfhídrido de las proteínas y con azúcares reductores, dando lugar a polímeros de alto peso molecular como las melaninas y ligninas. Estas presentan diversas coloraciones dependiendo de los sustratos fenólicos que los originaron y

del pH (McEvily *et al.*, 1992). En el caso de los bananos tomarán una coloración rosada, que después pasara a marrón y posteriormente a negro (Rivas, 1977; Robards *et al.*, 1999).



Fuente: Palmer (1971) y Tamayo (2002).

Figura 1.11. Reacciones catalizadas por la polifenol oxidasa.

La formación de o-quinonas es una reacción reversible en presencia de agentes reductores, como el ácido ascórbico, dando lugar a o-difenoles incoloros, mientras que la polimerización posterior es irreversible. El pardeamiento enzimático requiere de la disponibilidad de cuatro componentes esenciales: oxígeno, enzima, cobre y sustratos apropiados. Estos factores determinan la velocidad de pardeamiento, que puede ocurrir rápidamente, incluso en pocos minutos. Esta velocidad dependerá de factores como la concentración y actividad de la PPO, de la cantidad y naturaleza de los compuestos fenólicos, pH, temperatura, agua y la cantidad de oxígeno disponible en el entorno del tejido vegetal (Vámos-Vigyázó, 1981; Mayer, 1987). Otros factores intrínsecos que influyen en la intensidad del pardeamiento son: la especie, la variedad y el estado fisiológico de los frutos (Amiot, *et al.*, 1995).

Las funciones fisiológicas que se le han atribuido a la PPO son: en los frutos interviene en la distribución de las semillas, se encuentra involucrada en mecanismos de defensa y reparación de tejidos, también en la formación de pigmentos y depuración de oxígeno en el cloroplasto (Meyer & Harel, 1981; Gooding *et al.*, 2001a; Tamayo, 2002).

1.3.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se derivan del ácido shiquímico y del metabolismo del ácido fenilpropanoico (Robards *et al.*, 1999), y actúan como poderosos antioxidantes en tejidos de plantas (Fletcher & Kott, 1999).

De acuerdo a Valls y colaboradores (2000), con base a su estructura química existen dos grandes grupos de compuestos fenólicos: los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos), también llamados compuestos no flavonoides, y los flavonoides (tabla 1.2). La diferencia de estructura entre ambos grupos consiste principalmente en que los ácidos fenólicos tienen un anillo aromático, mientras los flavonoides están formados por dos anillos (Rhodes *et al.*, 1981; Valls *et al.*, 2000).

Tabla 1.2. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Compuestos no flavonoides

Ácidos fenólicos

- Ácidos benzoicos
- Ácidos cinámicos

Estilbenos

- Resveratrol

Compuestos flavonoides

Flavonoles

Flavanoles

- Taninos o proantocianidinas
- Antocianidinas y antocianos

Fuente: Valls *et al.* (2000)

La fenilalanina amonio liasa (PAL) es considerada la principal enzima en la ruta de los fenilpropanoides, ya que cataliza la transformación por

deaminación de la fenilalanina a ácido trans-cinámico, el cual es el primer intermediario en la biosíntesis de los fenoles. Se ha visto que PAL incrementa su actividad en respuesta a estrés térmico y es considerada por varios autores como una línea de estudio que podría proporcionar las condiciones que permitan adaptar a las plantas contra diferentes tipos de estrés (Rivero *et al.*, 2000).

En respuesta al estrés o daño mecánico, el metabolismo de fenoles presenta tres tipos de reacciones de acuerdo a Rhodes *et al.* (1981):

- La síntesis de compuestos fenólicos monoméricos (fitoalexinas)
- La síntesis de derivados polifenólicos.
- La oxidación de componentes fenólicos preformados, que van a dar lugar a quinonas y a material polimerizado.

Los compuestos fenólicos se localizan en vacuolas de las células de semillas, epidermis y endocarpo de los frutos; estos compuestos sirven como precursores para suberinas y ligninas las cuales actúan como protectores ante efectos de estrés abiótico como la baja temperatura. Además algunos fenoles protegen a las auxinas por su efecto antioxidante (Morais *et al.*, 1999; Fletcher & Kott, 1999). Las funciones atribuidas a los fenoles son las siguientes (Rhodes *et al.*, 1981; Fletcher & Kott, 1999):

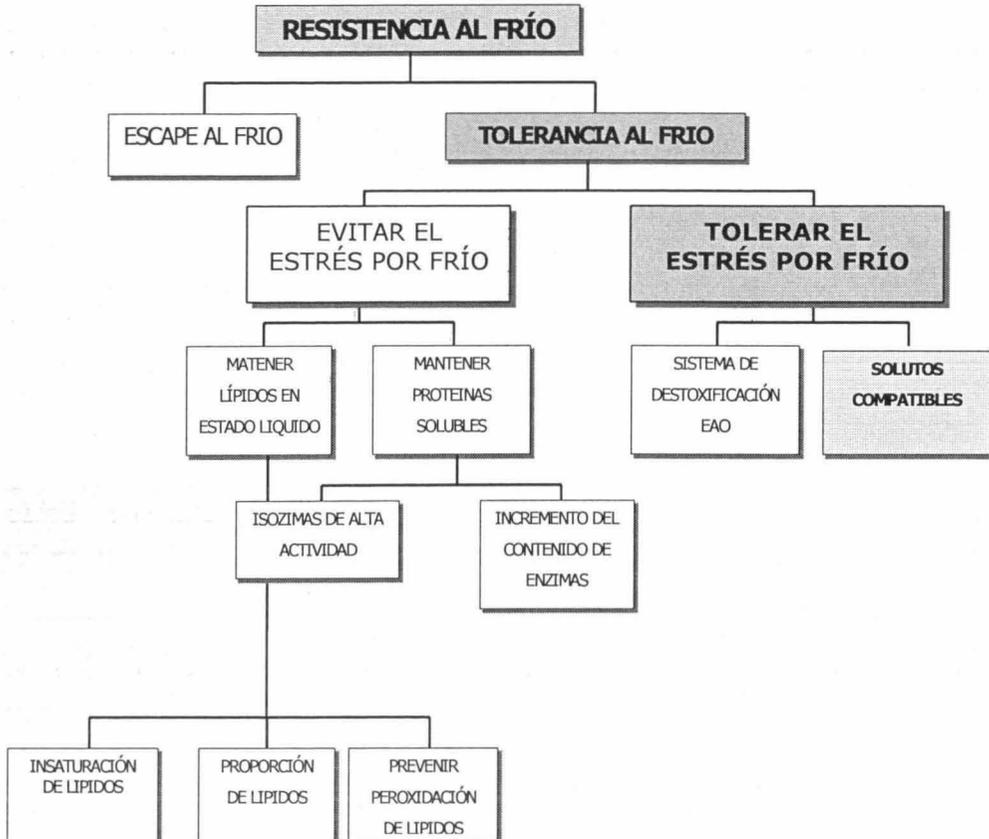
- Sirven como reconocimiento para insectos polinizadores.
- Protección contra la agresión de herbívoros, insectos, hongos, bacterias y virus.
- Reducen la competencia entre plantas.

Los compuestos fenólicos encontrados en banano variedad Enano Gigante son dopamina, vainillina, catequina y taninos (Mendoza *et al.*, 1996, citado en Sala, 2003).

1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA Y TOLERANCIA AL ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA

De acuerdo a Hällgren y Örqvist (1990) e Iba (2002), muchas plantas tienen la capacidad de modificar su metabolismo, sintetizando compuestos que les permitan sobrevivir ante el estrés por frío (figura 1.12): algunas plantas por ejemplo producen compuestos de bajo peso molecular denominados solutos compatibles u osmoprotectores, otras plantas modifican la estructura de las membranas con lípidos insaturados, o bien producen ciertas proteínas que actúan en el sistema de detoxificación de las

especies activas de oxígeno (AOS) (Levitt, 1980; Hällgren & Örquist, 1990; Iba, 2002).



Fuente: Levitt (1980)

Figura 1.12. Mecanismos posibles para la resistencia a la baja temperatura.

1.4.1. Sistema de destoxificación de especies activas de oxígeno (AOS)

Las especies activas de oxígeno incluyen aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generados por la reducción de oxígeno molecular. También incluyen a los radicales hidroxilos (OH^\cdot), producidos en reacciones involucrados con peróxidos y reducción de O_2 . Las especies activas de oxígeno se incrementan en las plantas que se encuentran bajo

estrés como bajas temperaturas, sequía y salinidad entre otros. Seis enzimas están involucradas en el proceso de destoxicación de estas moléculas en plantas superiores: la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasas (CAT), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR), dichas enzimas se localizan en cloroplastos, citoplasma, mitocondria y microcuerpos y permiten mantener el balance iónico en la planta ante el estrés por baja temperatura (Iba, 2000).

Estudios realizados por Okane y colaboradores (1996) mostraron que plantas de *Arabidopsis* sujetas a bajas temperaturas acumularon peróxido en las células e incrementaron la actividad de APX y GR. En contraste, en arroz los niveles de APX y SOD aumentaron cuando las plantas fueron transferidas de frío a temperatura normal (Saruyama & Tanida, 1995).

1.4.2. Lípidos de membrana

Se ha visto también la relación de tolerancia a las bajas temperaturas en membranas cuya estructura presenta mayor cantidad de lípidos insaturados, estos lípidos aumentan la fluidez de la membrana cuando son sometidas a estrés por baja temperatura (Iba, 2000).

Las características fisicoquímicas de los lípidos de la membrana a diferentes temperaturas difieren con los tipos de las cabezas polares de los lípidos o sus ácidos grasos esterificados y sus constituyentes (Smolenska & Kuiper, 1977).

Esto sugiere que los niveles de estos fosfolípidos quizá determinen la capacidad de la planta de tolerar la baja temperatura, aunque también existen otros factores involucrados como es la participación de proteínas desaturasas (Iba, 2002).

1.4.3. Compuestos orgánicos solubles de bajo peso molecular (Solutos compatibles)

Cuando las plantas experimentan condiciones ambientales desfavorables como la baja temperatura, muchas de ellas tienen la capacidad de generar compuestos orgánicos de bajo peso molecular llamados solutos compatibles (Bohnert *et al.*, 1995). Los solutos compatibles representativos incluyen ciertos polioles como el manitol, sorbitol, arabinitol, eritritol y glicerol; azúcares como trehalosa y sacarosa; aminoácidos como prolina,

glutamina, lisina y derivados de aminoácidos como glicina-betaína y compuestos relacionados (Thomashow, 1999; Iba, 2002). La prolina se acumula en prácticamente todas las plantas, sin embargo la glicina-betaína esta distribuida solamente en aquellas con alta tolerancia a la salinidad y al frío (Robinson & Jones, 1986).

1.5. SOLUTOS COMPATIBLES

La productividad y distribución espacial de muchos cultivos de plantas agronómicas y hortícolas de importancia comercial, como el banano, están restringidas por factores ambientales tales como son la sequía, salinidad y temperaturas extremas las cuales desempeñan un papel muy importante en la producción agrícola mundial (Boyer, 1982).

Entre las propiedades de los solutos compatibles, se puede resaltar que son altamente solubles en agua y uniformemente neutrales, no son tóxicos en altas concentraciones, permiten mantener la presión de turgencia durante el estrés hídrico, la cual es una característica intrínseca de las formas principales de estrés abiótico como el estrés por salinidad y frío. Además, algunos solutos compatibles pueden servir como eficientes agentes protectores, para estabilizar la estructura y función de ciertas macromoléculas (Santoro *et al.*, 1992; Papageorgiou & Murata, 1995). Así que la acumulación de estos compuestos en las plantas, contribuye de manera importante a la aclimatación de las células al estrés ambiental (Sakamoto & Murata, 2002).

Hasta la fecha, las propiedades de varios solutos compatibles han sido analizadas en plantas modelo como son *Arabidopsis thaliana* y tabaco (*Nicotiana tabacum*). Particular atención se ha prestado a la ingeniería genética en la síntesis de Glicina-Betaína (Sakamoto & Murata 2000 y Sakamoto & Murata, 2002), un derivado de aminoácido y un soluto compatible muy eficiente (Le Rudulier *et al.*, 1984), y cuya acumulación comprende solamente a especies con alta tolerancia a la salinidad y al frío. En estudios en donde se ha realizado transformación de plantas con genes que sintetizan la glicina-betaína, se ha reportado que la acumulación de 1µmol de Glicina-betaína/g PF aumenta de 10 a 100 veces la tolerancia a estrés por temperatura y salinidad (Xing & Rajashekar, 2001; Sakamoto & Murata, 2000).

1.5.1. Glicina-betaína (GB)

El grupo de las betaínas está ampliamente distribuido en las plantas, aunque solo algunas pueden acumularla. Esta familia la integran la glicina-betaína (N, N, N trimetil glicina), β -alanina betaína, prolina betaína y 2-hidroxiprolina betaína (Nishimura *et al.*, 2001).

La GB es una amina cuaternaria, constituida completamente de grupos metilo, con carga neta nula y bipolar (figura 1.13), se encuentra en algunos microorganismos, plantas superiores y animales (Rhodes & Hanson, 1993). Es sintetizada por un gran número de plantas incluyendo miembros de las familias Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Poaceae, Asteraceae y Malvaceae (Rhodes & Hanson, 1993; Gorham, 1996; Blunden *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2006). En altas concentraciones, la glicina-betaína no interfiere con funciones citoplasmáticas y estabiliza la estructura y función de muchas macromoléculas, por esta razón se coloca dentro del grupo conocido colectivamente como solutos compatibles (Sakamoto & Murata, 2002).

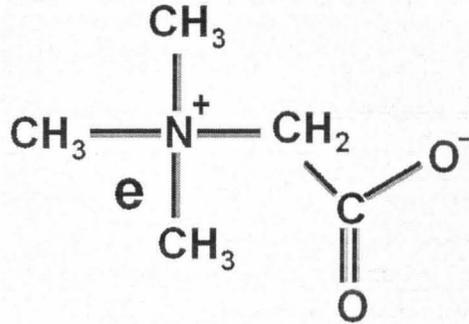


Figura 1.13. Estructura molecular de la glicina-betaína.

1.5.2. Síntesis de GB

La síntesis de GB en plantas que tienen la capacidad de acumularla, se realiza a través de dos pasos de oxidación de la colina (figura 1.14); el primer paso consiste en una oxidación catalizada por la enzima colina monooxigenasa (CMO) la cual forma la betaína aldehído. El segundo paso es una deshidrogenación de la betaína aldehído por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) la cual origina la GB. Este proceso de síntesis ocurre en los cloroplastos (Weigel *et al.*, 1986; Brouquisse *et al.*,

1989; Rhodes & Hanson, 1993; Papageorgio & Murata, 1995; Burnet *et al.*, 1995). Estudios recientes sugieren que en monocotiledóneas la BADH se localiza en peroxisomas (Nakamura *et al.*, 1997), todas las BADHs de monocotiledóneas tienen un tripéptido C-terminal (SKL) que se conoce como péptido señal (Nakamura *et al.*, 1997) para localizarse en ese organelo.

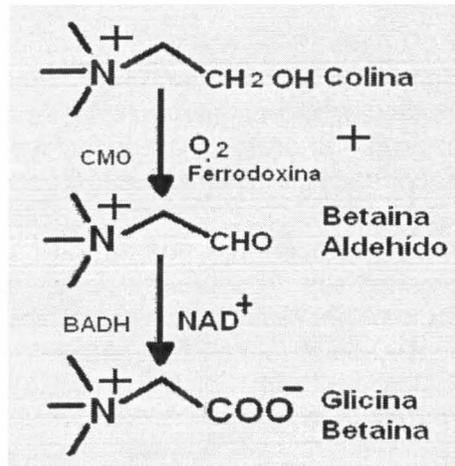


Figura 1.14. Ruta de síntesis de GB.

1.5.3. Funciones de GB

Dentro de las múltiples funciones en las que se ha reportado que interviene la GB, bajo algún estrés ambiental es que previene daños por deshidratación celular debido al balance osmótico, sostiene la fotosíntesis, mantiene el volumen de cloroplastos y protege a las enzimas que actúan en la cadena respiratoria (Zheng *et al.*, 1991; Makela *et al.*, 1999).

El principal papel fisiológico de la glicina-betaína es como osmolito y donador de grupos metilo (transmetilaciones). Como osmolito la betaína protege células, proteínas y enzimas del estrés ambiental tales como el estrés hídrico, salinidad, temperaturas extremas entre otros factores. Como donador de grupos metilo participa en el ciclo de la metionina (Craig, 2004). Diversos autores han estudiado el efecto de GB contra los efectos de la baja temperatura tanto en frío como congelamiento (tabla 1.3). En dicha tabla se muestra el papel que juega la GB contra los efectos ocasionados por las bajas temperatura y su papel en la tolerancia al frío.

Tabla 1.3. Estudios de los efectos de la GB aplicada exógenamente ante estrés por baja temperatura y otros tipos de estrés.

Autor	Año	Concentración	Especie	Conclusiones
Allard, Houde, Krol, Ivanov, Hiner y Sarhan.	1998	100, 250 y 500 mM GB aplicados exógenamente durante 4 días	Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L. cv. glenlea y <i>T. aestivum</i> L. cv Fredrick)	GB confirió mayor estabilidad a la membrana tilacoide. El tratamiento con GB exógeno puede ser usado como una medida preventiva durante el crecimiento y bajo estrés por baja temperatura.
Makela, Kontturi, Pehu y Somersalo	1999	50 y 100 mM de GB aplicada en hojas	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) y nabo (<i>Brassica rapa</i> L.)	La aplicación de GB mejoró la eficiencia fotosintética del tomate y nabo y redujo la respiración de plantas crecidas bajo estrés (sequía y salinidad). La conductancia estomática se incrementó y condujo a una mayor eficiencia en el intercambio de gases e incrementó relativamente el crecimiento.
Chen, Li y Chen	2000	2.5, 5.0, 10.0, 25.0 y 50.0 mM GB (en medio Hoagland)	Células en suspensión y plántulas de maíz (<i>Zea mays</i> L.)	La toma de GB a través de la raíz proporcionó mayor tolerancia contra el frío y evitó el daño de la membrana por deshidratación.
Xing y Rajashekar	2001	10 mM GB asperjadas dos veces al día durante tres días consecutivos	<i>Arabidopsis thaliana</i>	La aplicación de GB fue parte integral para el proceso de aclimatación, probablemente estimuló en parte la tolerancia al congelamiento.
Naidu, Stevenson, Page y Munford	2003	1, 2 y 4 kg/ha GB en 200l/h de agua	Pasto invernal y de primavera	La aplicación foliar de GB incrementó el crecimiento de la planta aumentando su producción. La GB puede ser usada agrónomicamente para producir cultivares tolerantes al frío.

1.6. JUSTIFICACIÓN

La producción de banano a nivel mundial alcanzó los 2.026 millones de toneladas en el 2005 y generó un total de 25,341 millones de dólares debido a la exportación de esta fruta (FAO, 2005) lo que nos habla de la rentabilidad de este cultivo.

Uno de los problemas que presentan los cultivos de banano, es el desorden fisiológico ocasionado por cambios bruscos de la temperatura, el cual ocasiona el pardeamiento de los frutos, fenómeno conocido localmente como acanelamiento. Este desorden incrementa gran medida los costos de producción de este fruto y por consiguiente ocasiona una pérdida económica al productor, al vender a bajo costo, ya que no cumple con las exigencias de calidad establecidas a nivel nacional como internacional (Rodríguez *et al.*, 2002).

Debido al cambio climático, en los últimos años la temperatura mínima registrada ha sido más marcada en donde se cultiva el banano, lo cual ha ocasionado disminución de la producción de esta fruta. En los estados productores de banano, la temperatura mínima que han registrado esta entre los 0-15 grados (figura 1.1).

En Yucatán por ejemplo, durante el invierno 2004-2005, se registró una temperatura mínima de apenas cuantas horas; a pesar que la duración fue corta, afectó de manera significativa la producción de banano, ya que los frutos se expusieron a un incremento en la temperatura, lo cual ocasionó un proceso de frío-calentamiento intensificado más los daños producidos. Aunado a esto también se tiene pérdidas de la fruta por cosecha, principalmente por problemas de almacenamiento (Pólit *et al.*, 2005).

Una posible forma de solucionar esta puede ser a través de la aplicación exógena de GB, pues la aplicación en la célula podría proteger contra los efectos del estrés ocasionados por el descenso de la temperatura, como se ha señalado en algunas especies como el arroz (Naidu y Williams, 2004), *Arabidopsis* (Rajashekar, 2001), tabaco (Yang *et al.*, 2005), maíz (Chen *et al.*, 2004), tomate (Park *et al.*, 2004) entre otras especies.

También se ha observado que la aplicación foliar de GB en especies de importancia comercial que no son capaces de acumular este osmolito, registra una mayor productividad y cuando estas son sometidas a estrés por temperatura tienen mayor capacidad de tolerarlo (Makela *et al.*, 1999).

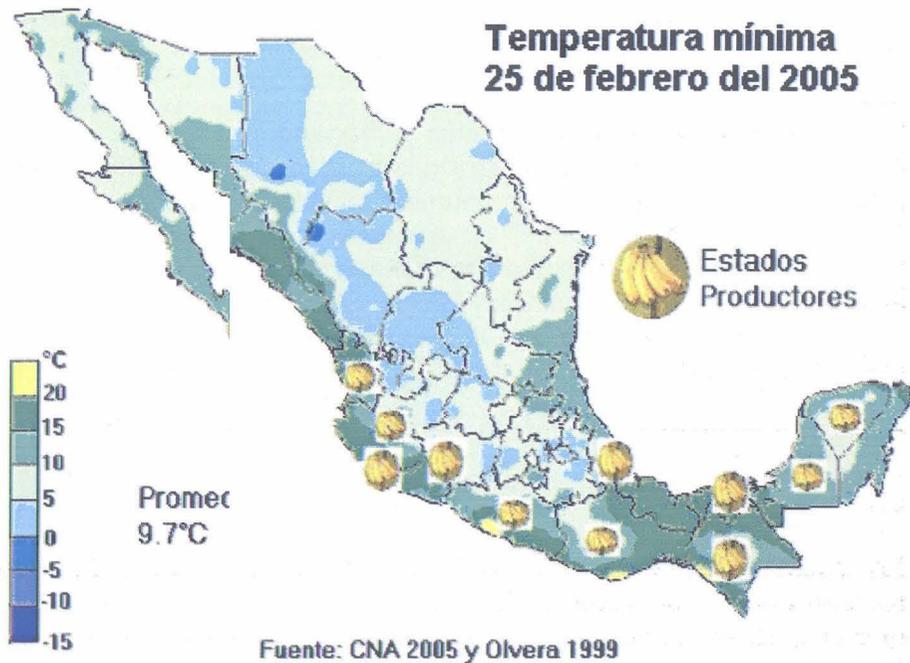


Figura 1.15. Temperaturas mínimas registradas en los estados productores de banano.

La ventaja de usar este osmolito es que penetra rápidamente y es trasladado a otros órganos en menos de 24 horas (Makela *et al.*, 1996). El consumo de GB no es nocivo para el hombre, es un importante nutriente obtenido de una variedad de alimentos tales como germen y salvado de trigo, espinacas, remolacha entre otros alimentos, la función primordial es como osmolito orgánico y fuente de grupos metilo ayudando a mantener la salud del hígado, corazón y riñón (Craig, 2004). Además el precio de GB en el mercado es relativamente bajo por lo que es factible su utilización con fines agrícolas.

El hecho de seleccionar el cultivar banano Enano Gigante como modelo de estudio, es debido a que se siembra ampliamente en diversos estados de la Republica Mexicana, presenta mejor precio en el mercado nacional e internacional y es aceptable para exportación a diferentes países como Estados Unidos y Canadá, de igual manera puede ser aceptado en el mercado europeo.

1.7. HIPÓTESIS

La aplicación foliar de GB en plantas de banano podría atenuar los cambios fisiológicos y bioquímicos que llevan al pardeamiento del fruto cuando son expuestos a bajas temperaturas durante su vida postcosecha.

GB podría actuar estabilizando membranas lo cual se debería reflejar en una menor fuga de electrolitos y menor caída de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, debido a que protege a las proteínas asociadas a la membrana y a las que conforman los centros activos de los fotosistemas.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. General

Determinar el papel de la aplicación foliar precosecha de GB para reducir los desórdenes fisiológicos y bioquímicos provocados por la exposición postcosecha a bajas temperaturas de frutos de banano variedad Enano Gigante.

1.8.2. Particulares

1. Evaluar los posibles cambios de fenoles solubles, proteínas solubles, actividad de la polifenol oxidasa (PPO), clorofilas y carotenoides en frutos de banano sometidos a frío (10°C) durante 0, 2, 4 y 6 horas de exposición.
2. Cuantificar los cambios en la tasa respiratoria, producción de etileno, fuga de electrolitos y fluorescencia de clorofila en frutos de banano sometidos a 10°C durante 6 horas.
3. Determinar el papel de la aplicación foliar de la glicina-betaína (50 y 100 mM) en el desarrollo de los daños por frío en frutos durante etapas postcosecha.

1.9. LITERATURA CITADA

- Allard F., Houde M., Krol M., Ivanov A., Huner N. P.A., and Sharn F. (1998). Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* **39**: 1194-1202.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S.Y., Oleszek W. (1995). Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J. Ag. Food Chem.* **43**: 1132-1137.
- Artés F., y Artés-Hernández F. (2003). Daño por frío en la postrecolección de frutas y hortalizas. En: . López A., Espinoza A., y Artés F. (Eds). *Avances de la Ciencia y Técnicas de Frío*. Universidad de Murcia. Murcia, España. 299-310 pp.
- Ayora A., Sairam R.K., and Srivastava G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Curr. Sci.* **82**:1227-12382.
- Banacol (2004). Grados de madurez del Banano [en línea]. <http://www.banacol.com/espanol/productosBanano.html>. (Consultado: 3 de marzo de 2005).
- Baur, J.B., and Woarkman M. (1964). Relationship between cell permeability and respiration in ripening banana fruit tissue. *Plant Physiol.* **39**:540-43.
- Belalcázar, S., Velencia, J. y Lozada, J. (1991). La planta y el fruto. En: Belalcázar, S. (ed). *El cultivo del plátano en el trópico*. *Feriva. Armenia*. 43-89 pp.
- Beyer E.M. (1981). Ethylene action and metabolism. In: Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Friend J., and Rhodes M.J.C (Ed). Academic press. New York. 107-121 pp.
- Biale J. B., and Young R.E. (1981). Respiration and ripening in fruits retrospect and prospect. In: Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Academic press. New York. 1-30 pp.
- Blunden G., Yang M., Janicsák G., Máthé I. and Carabot-Cuervo A. (1999). Betaine distribution in the *Amaranthaceae*. *Biochem. System. Ecol.* **27**. 87-92 pp.
- Bohnert H.J., Nelson D.E. and Jensen R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* **7**:1099-1111.
- Boyer J.S. (1982) Plant productivity and environment. *Science.* **218**:443-448.
- Brouquisse R., Weigel P., Rhodes D., Yocum C.F., Hanson A.D. (1989). Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* **90**: 322-329.
- Burnet M., Lafontaine P.J., Hanson A. D. (1995). Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol.* **108**: 581-588.
- Cayón S.G., Giraldo G., y Arcilla P. M. I. (2000). Postcosecha y agroindustria del plátano en el eje cafetero de Colombia. Asiplat, Corpoica, U. del Quindío. Colciencias. *Armenia*. 267 p.

- Chen W. P., Li P. H., and Chen T. H. H. (2000). Glycinebetaine increase chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment*. **23**: 609-618.
- Craig S A.S. (2004). Betaine in human nutrition. *Am J. Clin. Nutr.* **80**: 539-549
- Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. U.S.A. Columbia University Press. 1131-1174 pp.
- Crouch J., Vuyluteske D., and R. Ortiz. (1998). Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plant and banana (*Musa sp.*). *Electronic. J. Biotechnol.* 1-13 pp.
- Dadzie B.K., y Orchard J.E. (1997). Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. *Guías Técnica Inibap*. El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. 63 p.
- De Larghe, E. (1987). Towards and international strategy for genetic improvement in the genus *Musa* banana and plantain breeding strategies. ACIAR proceedings. **21**:19-23.
- FAO, 2005. Indicadores de producción y comercialización internacional del banano [en línea] (<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&hasb ulk=0&version=ext&language=EN>). (Consultado: 18 de junio del 2005).
- Fitter A.H., and Hay R.K.M. (1987). Environmental physiology of plants. Second Edition. Ed. *Academic Press*. San Diego California. 197-221 pp.
- Fletcher S.R., and Kott L. S. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. 10 th Rapeseed Congress. University of Guelph. Ontario Canada. p 5
- Gómez-Lim, M. A. (1996). Perspectivas de la biotecnología vegetal en la fisiología de postcosecha de frutas comerciales. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. 397-404 pp.
- Gooding P.S., Bird C., and Robinson S.P. (2001b). Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*. **213**: 748-757.
- Gooding P.S., Bird C., y Robinson S.P. (2001a). Actividad de la polifenol oxidasa y expresión génica en la fruta de los bananos Goldfinger (AAAB, FHIA-01). *Infomusa*. **10**: 17-22.
- Gorham J. (1996). Glycinebetaine is a major nitrogen-containing solute in the Malvaceae. *Phytochem*. **43**: 367-369.
- Hällgren J-E. and Örqvist G. (1990). Adaptations to low temperatures. In: Alscher R. G., and Cumming J.R. (Eds). Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanism. Wiley-Liss, Inc. Umeå, Sweden. 265-293 pp.
- Harris, P. and Poland G. (1957). "Organic acids of ripening banana". *Food Res*. **2**:135-141.
- Hirimburegama W. K., Díaz W.K.G., and K. Hirimburegama. (2004). Banana improvement through gamma irradiation and testing for banana bract mosaic virus in Sri Lanka. In: Jain S.M., and R. Swennen (Eds). Banana Improvement cellular, molecular biology, and induced mutations. *Science. Publish*. 81-85 pp.

- Hobson G.E. (1981). Enzymes and texture change during ripening. In: Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic press. New York. 123-132 pp.
- Hubbard, N.L., Phair, D.M. and Huber, S.C. (1990). Role of sucrose phosphate syntase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climacteric. *Plant physiol.* **94**: 201-108.
- Iba K. (2002). Acclimatative reponse to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:225-245.
- Inibap, 2001. Muchos usos de *Musa*. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano. Montpellier, France. 1 p.
- Jones D.R. (2000). Disease of banana. Abacá and Emset (Eds). CAB Publishing. 352-379 pp.
- Knee M., and Bartley I.M. (1981). Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. In: Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic press. New York. 133-148 pp.
- Larcher W. (1995). Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer-Verlag, New York. 506 p.
- Le Rudulier D., Strom A.R., Dandekar A.M., Smith L.T. and Valentine R.C. (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Sciense.* **224**:1064-1063.
- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. I. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Second Edition. Academic Press, New York. **1**: 497 p.
- Linaza, L. A. (1976). Quantitative evolution of sugars in banana fruit ripening at normal to elevated temperatures. *Act. Hor.* **57**:163-173.
- Lyons J.M. 1973. Chilling Injury in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**:445-466.
- Ma Q-Q., Wang W., Li Y-H., Li D-Q., Zou Q. (2006). Alleviation of fotoinhibition in drought-stressed weat (*Triticum aestivum*) bay foliar-applied glycinebetaine. *J. Plant Physiol.* **163** (2): 165-175.
- Makela P, Peltonen-Sainio P, Jokinen K, Pehu E, Setala H, Hinkkanen R, Somersalo S. (1996). Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Sci.* **121** (2): 221-230.
- Makela P., M. Kontturi, E. Pehu and S. Somersalo. (1999). Photosynthetic response of drought-and salt stressed tomato and turnip rape plants to foliar-applied glycinebetaine. *Physiol. Plant.* **105**: 45-50.
- Maldonado, P. y Pacheco, E. (2000). Elaboración de una mezcla de harina de trigo y de plátano verde. *Arch. Latinosmer. Nutr.* **4**: 387-393.
- Mayer, A. M. (1987). Polyphenol oxidases in plants: recent progress. *Phytochem.* **26**: 11-20.
- McEvily A. J., Iyengar R., and Otwel W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32** (3): 253-273.
- Meyer A. M., and Harel E. (1981). Polyphenol oxidases in fruits changes during ripening. In: Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Recent advances in the

- biochemistry of fruits and vegetables. Academic press. New York. 161-180 pp.
- Morais S.A.L., Nascimento E.A., Queiroz C.R.A.A., Pilo-Veloso D., and Drumond M.G. (1999). Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. *J. Braz. Chem. Soc.* **10**(6): 447-452.
- Naidu B.P. and Williams R. (2004). Seed treatment and foliar application of osmoprotectants to increase crop establishment and cold tolerance at flowering in rice. Rural Industries Research and Development Corporation. 19 p.
- Naidu B.P., Stevenson G., Page R., and Munford S. (2003). Glycinebetaine foliar application increases pasture winter growth and milk yield. Proceedings of the 11 th Australian Agronomy Conference, Geelong. Victoria: *Aut. Soc. Agron.* 4 p.
- Nakamura T., Yokota S., Muramoto Y., Tsutsui K., Oguri Y., Fukui, K., and Takabe T. (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine non-accumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant. J.* **11**:1115- 1120.
- Nelson, D y Cox, M. (2000). Principles of biochemistry. *Worth Publisher.* New York, EUA. 233 pp.
- Nguyen T.B.T., Ketsa S., and Van Doorn W.G. (2003). Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyasa in banana peel, during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* **30**:187-193.
- Nicolas, J.J.; Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M-J., and Aubert S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**: 109-157.
- Nilsen E. T., and Orcutt D. M. (1996). The physiology of plants under stress abiotic factors. *Jonh Wiley & Sons Inc.* United States of America. 486-514 pp.
- Ni-Nong Xu, Ze-Neng W., Gui-Zhen J., Liang-Bi L. and Ting-Yun K. (2003). Effect of various temperature on phosphatidyl glycerol biosynthesis in thylakoid membranes. *Physiol. Plant.* **118**: 57-63
- Nishimura N., Zhang J., Abo M., Okubo A., and Yamazaki S. (2001). Application of capillary electrophoresis to the simultaneous determination of betaines in plants. *Analytical Sciences. Jap. Soc. Anal. Chem.* **17**: 103-106.
- Okane D., Gill V., Boyd P., Burdon R. (1996). Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta.* **198**: 371-377.
- Olvera G. J, Sánchez R. J. R., Ochoa B. R., Rodríguez C. F., Roque Z. J., Ortega R. C., y Palacios F. H. (1999b). Panorama Internacional de la Producción del Plátano. *Rev Claridades Agropecuarias.* Talleres Gráficos de México. México D.F. 21-27 pp.
- Olvera G. J., Sánchez R. J. R., Ochoa B. R., Rodríguez C. F., Roque Z. J., Ortega R. C. y Palacios F. H. (1999a). La producción del plátano en México, alcances y perspectivas. *Rev Claridades Agropecuarias.* Talleres Gráficos de México. México D.F. 3-18 pp.

- Orozco-Santos M., Farias-Larios J., Manzo-Sánchez J., and Guzmán-González G. (2001). Black sigatoka disease (*Mycosphaarella fijiensis* Morelet) in México. *Infomusa*. **10** (1): 33-37.
- Palmer J.K. (1971). The banana. In: Hulme A.C. (Ed). The Biochemistry of fruits and their products. *Academic Press*, London. **2**: 65-105.
- Papageorgiou G.C., and Murata N. (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynth. Res.* **44**: 243–252.
- Park E-J., Jeknic Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., and Chen T.H.H. (2004). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *Plant J.* **40**:474-487.
- Pólit C., P. (2005). http://www.sica.gov.ec/agronegocios/sistema%20valor/postcosecha_hortifuticolas.htm. (Consultado: 2 de octubre de 2005)
- Pratt H.K. (1975). The role of ethylene in fruit ripening: feacteurs et regulation de la maduration des fruits. Center National de la Recherche, Anatole. France. 45 p.
- Raison J.K., Champman E.A. Wrihth L.C. and Jacobs S.W.L. (1979). Membrane lipid transitions: their correlation with the climatic distribution of plants. In: J.M. Lyons, D. Graham J.L. Lyons (Eds). Low temperature Stress in Crop Plant. The role of the membrane. *Academic Press*. New York. 177-186 pp
- Raison, J.K., and Orr G. (1990). Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. In Wang Ch. Y. (Ed). Chilling Injury for Horticultural Crops. CRC Press. Boca Raton Fida. USA. 145-164 pp.
- Rhodes D., and Hanson A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384.
- Rhodes M. J. C., Wooltorton L. S. C., and Hill A. C. (1981). Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. In: Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic press. New Yok. 193-220 pp.
- Rivas R. N. (1977). Purificación parcial y caracterización cinética de la polifenol oxidasa del cambur manzano (Musa AAB cv manzano). *Rev. Fac. Agron. Maracay*. **9** (4): 39-49.
- Rivero M., R., Ruiz J.M., García P.C., López-Lefebre L.R., Sánchez E., and Romero L. (2000). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* **160**: 315-321.
- Robards, K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitand P., and Glover G. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**: 401-436.
- Robb D.A. (1981). Molecular properties of plant tyrosinases. In: Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic press. New Yok. 181-1928 pp.

- Robinson J.C. (1996). Bananas and plantains. CAB International, University Press Cambridge. UK. Cap I and 3. 238 p.
- Robinson S.P., and Jones G.P. (1986). Accumulation of glycinebetaine in chloroplast provides osmotic adjustment during salt stress. *Aust. J. Plant. Physiol.* **13**:659-668.
- Rodríguez Z.L.C., Santamaría F.J.M., James A., Gómez-Lim M., and López O. G.R. (2002). Caracterización Molecular, Fisiológica y Bioquímica del Desorden Fisiológico conocido como Acanelamiento y Desarrollo de un Protocolo para Eventualmente Obtener Plantas Transgénicas Tolerantes a Descensos de Temperatura de *Musa acuminata* cv enano gigante (AAA) económicamente importante en el sureste mexicano" (Sagarpa-2002-C01-1714). Proyecto vigente.
- Sáenz M. V. (1999). Estudio sobre dinámica de maduración de bananos del cultivar FHIA-2. Resumen 105 del XI Congreso Nacional Agronómico. Universidad de Costa Rica. 114 pp.
- Sagarpa. 2006. http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comagr2c.html. (Consultado: 9 mayo del 2006).
- Sakamoto A., and Murata N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environ.* **25**:163-171.
- Sakamoto A., and N. Murata. (2000). Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **51** (342):81-88.
- Sala F. G. (2003). Identificación de metabolitos secundarios con actividad biológica presentes en hojas de *Musa acuminata*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Salunkhe D.K., and Desai B.B. (1984). Postharvest Biotechnology of fruits. Library of Congress. Florida, United State. I: 43-58.
- Santoro M. M., Liu Y., Khan S. M. A., Hou L. X., and Bolen D. W. (1992). Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochem.* **31**:5278-5283.
- Saruyama H. and Tanida M. (1995). Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* **109**: 105-113.
- Seymour G.B., Taylor J.E. and Tucker G.A. (1993). Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall. Cambridge. 454 p.
- Shewfelt R.L. and Erickson M.E. 1991. Role of lipid peroxidation in the mechanism of membrane-associated disorders in edible plant tissue. *Trends Food Sci. Technol.* **2**:152-154.
- Smith, N.S.J. (1981). Softening and cell wall changes in bananas and plantains. In: Tropical fruit. *Aspects Applied Biol.* **12**: 95-107.
- Smolenska G., and Kuiper P.J.P. (1977). Effect of low temperature upon lipid and fatty acid composition of roots and leaves of winter rape plants *Physiol. Plant.* **41**: 29-35.

- Soto-Ballesteros M. (1985). Bananas, Cultivo y Comercialización. Ed. Lil S.A. Costa Rica. Cap. 1, 2 y 4.
- Stover R., and Simmonds N. (1987). Bananas. U.K. 3 ed. Longman Scientific and Technical. 1-3 pp.
- Swennen R., and Rosales F. (1995). Encyclopedia of agriculture science. Ed. Academic Press. 215-231 pp.
- Swennen R., and Vulylsteke D. (1993). Breeding black Sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Tropical Agriculture* (Trinidad). **70**: 74-77.
- Taiz L. and Zeiger E. (1991). Plant Physiology. The Benjamín/Comings Publishing Company, Inc. California, E. U. 346-368 pp.
- Taiz L. and Zeiger E. (1998). Plant Physiology. Sinauer Associates Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts. 725-757 pp.
- Takle E. (1997). Plant physiological effects of a changing environment. Iowa State University. 12-15 pp.
- Tamayo C. J. A. (2002). Estudio del sistema de polifenoloxidasas del fruto del chicozapote (*Achras sapota*). Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán. México. 81 p.
- Thomas J.E: (2000). Viruses of banana methods for their detection. In: Molina A. B., V.N. Roa, J. Bay-Petersen, A. T. Carpio and A. Joven (Eds). Managing banana and citrus diseases. International Plant Genetic Resources Institute. 32-37 pp.
- Thomashow M. F. (1999). Plant Cold Acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* **50**: 571-599.
- Valls J., Lampreave M., Nadal M., y Arola L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza- Alimentación Equipos y Tecnología. *Enología*. Catalunya, España. 119-124 pp.
- Vámos-Vigyázó L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**: 49-127.
- Wang H.G. and Gemma H. (1994). Ripening characteristics and chilling injury of banana fruit II. Change in degree of unsaturation of acids during exposure to chilling. *Jap. J. Trop. Agric.* **38**: 246-250.
- Weigel P., Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1986). Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **82**: 753-759.
- Wills R., Lee T., McGlasson B. y Graham D. (1984). Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas postcosecha. Ed. Acriba. Zaragoza (España). 195 p.
- Xing W., and Rajashekar C.B. (2001). Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* **46**(1): 21-28.
- Yang C-P., Nong Z-R., Lu J-L., Lu L., Xu J-S., Han Y-Z., Li Y-J., and Fujita S. (2004). Bananas polyphenol oxidase: occurrence and change of polyphenol oxidase activity in some banana cultivars during development. *Food Sci. Technol. Res.* **10** (1): 75-78

- Yang S:F. (1981). Biosynthesis of ethylene and it regulation. In: Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Friend J., and Rhodes M.J.C (Ed). Academic press. New Yok. 89-106 pp.
- Yang X., Ziang Z. and Lu C. (2005). Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* **138**: 2299-2309.
- Zheng L, Yuan Z, Yu-chun L, Yu-ping Z, Ai-ling L, Ju-fu H. (1991). Oxidation of betaine aldehyde by betaine dehydrogenase from spinach leaves. *Acta Bot. Sin.* **33**: 680-686.

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efecto en fenoles, proteínas, actividad de polifenol oxidasa (PPO), clorofilas y carotenoides

2.1. INTRODUCCIÓN

Muchas frutas, vegetales y plantas ornamentales de origen tropical y subtropical son sensibles a bajas temperaturas (Paull, 1990). Estos cultivos sufren daño por frío después de un período de exposición a temperaturas por debajo de los 10 °C, pero por arriba de su punto de congelamiento (Lyons 1973; Wang, 1994). Varias alteraciones bioquímico-fisiológicas y disfunciones celulares ocurren en especies sensibles como el banano, en respuesta al estrés por frío (Raison & Orr, 1990; Wang, 1994). Cuando esta condición se prolonga, estas alteraciones y disfunciones conducen al desarrollo de síntomas como lesiones superficiales, decoloración, pardeamiento y maduración anormal de frutos (Saltveit & Morris, 1990).

Se ha visto que ciertas plantas acumulan solutos compatibles como GB cuando están sujetos a estrés por bajas temperaturas (Ishitani *et al.*, 1993; Allard *et al.*, 1998). De igual manera si este osmolito es asperjado induce cierto efecto positivo ante el estrés por baja temperatura evitando la peroxidación de lípidos en *Zea maiz* (Chen *et al.*, 2000), incrementa la productividad en pastos (Naidu *et al.*, 2003), la tolerancia al congelamiento en arroz (Naidu & Williams, 2004), induciendo la síntesis de ácido giberélico y poliaminas en arroz (Naidu *et al.*, 2005). Bajo estrés salino y sequía, la GB que se acumula quizá mantiene el balance osmótico celular (Robinson & Jones, 1986; McCue & Hanson, 1992), estabiliza la estructura cuaternaria del complejo de proteínas que conforman los fotosistemas (Yancey *et al.*, 1982; Papageorgiou & Murata, 1995; Makela *et al.*, 1999). Sin embargo el mecanismo protector de GB contra el estrés por frío no está completamente claro. Se ha sugerido que GB quizá actúa como osmoprotector (Yancey *et al.*, 1982; Yancey, 1994), crioprotector (Coughlan & Heber, 1982), estabiliza la integridad de la membrana (Zhao *et al.*, 1992) y previene la fotoinhibición en trigo durante el estrés por congelamiento (Allard *et al.*, 1998).

Para tratar de determinar el efecto del frío en exceso de maduración del banano y de entender cómo actúa la GB en el desarrollo de los daños por frío en banano, en este estudio se asperjó dos concentraciones de GB (50 y 10 mM) en hojas cercanas a la infrutencia durante tres días. Posteriormente los frutos fueron sometidos a \uparrow durante 2, 4 o 6 horas con un control para cada tratamiento. Se evaluó parámetros bioquímicos como actividad de la polifenol oxidasa y contenido de fenoles solubles, factores que posiblemente están relacionados con el pardeamiento en frutos de banano y pudieran ser utilizados como indicadores del grado de daño ocasionado por frío; también se analizaron los contenidos de proteínas solubles, clorofilas y carotenoides totales.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Este trabajo se realizó en banano *Musa* AAA (grupo Cavendish) "Enano Gigante", cultivado en el vivero del CICY (figura) en Mérida Yucatán.



Figura 2.1. Plantación de banano variedad enano gigante en el invernadero del CICY.

El criterio de selección de las plantas fue la presencia de frutos de entre 10 y 12 semanas de desarrollo, edad donde se considera que los frutos ya tienen la madurez fisiológica (Dadzie & Orrd, 1997), porque han alcanzado la talla y el grosor máximo que corresponde al grado de madurez 1 (Banacol, 2004).

2.2.2. Estrategia experimental y obtención de muestras

Para evaluar el efecto protector de la glicina-betaína (GB) contra los desórdenes bioquímicos ocasionados por frío en los frutos de banano, se diseñó la estrategia experimental mostrada en la figura 2.2.

Las plantas seleccionadas se trataron con soluciones de 50 mM y 100 mM de GB respectivamente. Como control se utilizó plantas de banano a las cuales se les asperjó agua destilada (figura 2.2). Las soluciones de GB se asperjaron en las primeras dos hojas cercanas a la inflorescencia y el raíz con el fin de facilitar la traslocación a diferentes partes de la planta, incluyendo el fruto. Se realizaron aplicaciones diarias de 0.250 l/planta de cada uno de los tratamientos durante tres días seguidos antes de la cosecha de los frutos. Los frutos se cosecharon y se expusieron a tratamiento con frío. Cabe mencionar que de cada tratamiento con GB se hicieron tres réplicas (3 plantas).

La evaluación de los daños ocasionados por frío en los frutos de banano, se realizó mediante un tratamiento con temperatura de 10°C y tres tiempos de exposición (figura 2.2). Los frutos de las plantas asperjadas con GB y los controles fueron cosechados y se sometieron a temperatura de 10°C en una incubadora (Forma Scientific, Diurnal Growth Chamber), en oscuridad por periodos de 2, 4 o 6 horas (figura 2.3), con tres réplicas para cada tratamiento (3 manos), tomando como control frutos de banano mantenidos a 23°C ± 1°C.

Los frutos que fueron expuestos a frío se transfirieron a temperatura ambiente (23°C ± 1°C), fueron lavados con abundante agua para retirarles el polvo y enjuagados con una solución de sulfato de magnesio al 0.5% para retirar la resina que pudo haber permanecido en el fruto (Nguyen *et al.*, 2003). A continuación los frutos se sumergieron durante 3 minutos en una solución fungicida (Promilo 50 PH) a razón de 0.5 g/l; el ingrediente activo de este fungicida fue el benomilo (metil 1-(butilcarbamoil bencimidazol-2 ilcarbamato).

Los frutos de banano se secaron a temperatura ambiente, se envolvieron en papel periódico y se colocaron en cajas de plástico donde se mantuvieron a 23°C ± 1°C hasta su maduración.

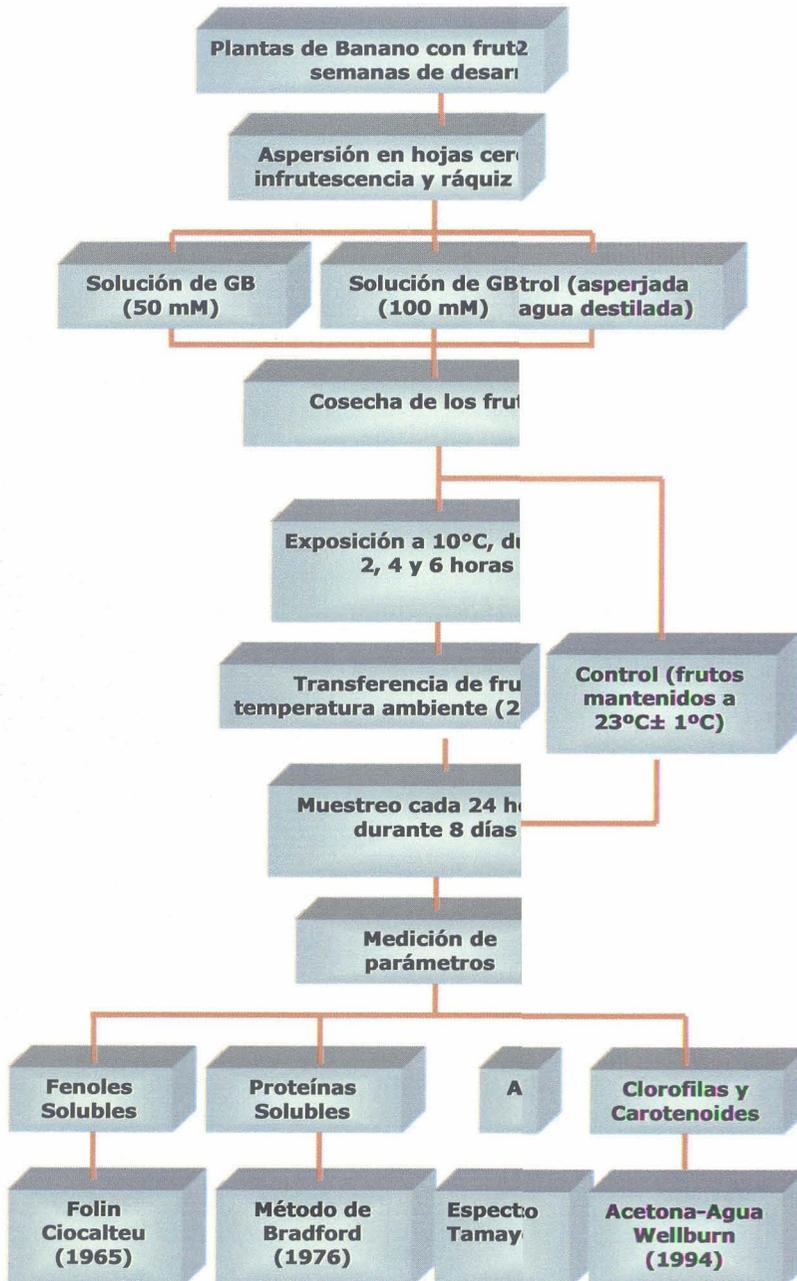


Figura 2.2. Diagrama de flujo de experimental.



Figura 2.3. Aspersión, corte y exposición a frío de frutos de banano tratados con GB.

Se registraron los síntomas ocasionados por el frío cada 24 horas por un periodo de 8 días, se tomaron fotos de los daños en los frutos, al mismo tiempo se extrajeron muestras para medir el contenido de fenoles solubles, proteínas solubles, actividad de PPO, clorofilas y carotenoides. Las muestras fueron extraídas de la parte central del fruto, para la determinación de la actividad enzimática de la PPO se extrajeron 5 g de la epidermis del fruto y un gramo para medir los parámetros de fenoles solubles, proteínas solubles, clorofilas y carotenoides, haciendo un total de 10 gramos por fruto (figura 2.4). Para cada tratamiento con GB y frío, se extrajo el tejido de la epidermis de 3 frutos (muestra). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido, y después se almacenaron a -80°C (Termo Forma -86°C UIT freezer s/N 803994-45, Model 716 de Termo Electrón Corporation), para su posterior análisis.



Figura 2.4. Obtención de muestras de tejido fresco de frutos de banano bajo tratamiento con GB y frío.

2.2.3. Evaluación de parámetros

2.2.3.1. Contenido de fenoles solubles

La determinación de los fenoles solubles se realizó por medio de la reacción de Folin Ciocalteu, descrita por Singlenton y Rossi en 1965 (Larrahondo, 1980; Larrahondo, 1985) con ligeras modificaciones (Nguyen *et al.*, 2003).

Para la extracción de los fenoles se tomó un gramo de epidermis de banano (peso fresco), se pulverizó en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el macerado se transfirió a un tubo de ensaye y se agregaron 5 ml de una mezcla de etanol-agua (1:1 v/v) en frío. El homogenado se agitó durante un minuto con un vortex (model M37615 Barnstead/thermolyne) y se colocó en hielo durante 6 horas. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm (Centrifuge 5415 D Eppendorff) durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de ensaye. Esta fracción constituyó el extracto experimental para la cuantificación de los fenoles solubles.

La cuantificación se realizó en un tubo de ensaye en el cual se agregaron 100µl del extracto experimental, 1.7 ml de agua destilada estéril, 100µl del reactivo Folin Ciocalteu 2N y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación (Dual Actino Shaker). Posteriormente se agregaron 100 µl de hidróxido de sodio 0.2 N, se homogenizó e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 650) a 725 nm, utilizando como blanco agua con 100 µl de Folin Ciocalteu 2N y 100µl de hidróxido de sodio 0.2 N.

Los cálculos del contenido de fenoles solubles, se realizaron a partir de un gráfico de calibración y se hizo la regresión lineal de la absorbancia contra concentración conocida (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 100 ppm), utilizando una solución patrón de ácido caféico de 200 ppm (Larrahondo, 1980), los resultados se expresaron como mg de fenoles. g PF⁻¹.

2.2.3.2. Contenido de proteínas solubles

La cuantificación espectrofotométrica de proteínas solubles, está basado en el método descrito por Bradford (1976). Para extraer la proteína del tejido

fresco, se maceró un gramo de la muestra de epidermis del fruto en un mortero agregando nitrógeno líquido y 1.5 % de PVPP (0.015 g. ml⁻¹) hasta obtener un polvo fino y se colocó en un tubo eppendorf. Se agregaron 2 ml de amortiguador de extracción (50 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 50 mM Tris pH 7.4, 250 mM de Sacarosa, 10% de Glicerol) e inhibidores de proteasas (5 µg/ ml de Aprotinina, 5 µg/ ml de leupeptina y 10 mM de PMSF), se agitó para maximizar la liberación de proteínas en el amortiguador y se centrifugó durante 30 minutos a 10,400 rpm a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y este sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de proteínas.

La determinación de las proteínas solubles se realizó mediante una curva de calibración utilizando una solución patrón de BSA de 1 mg/ml, se adicionó en tubos eppendorf 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 µl de la solución patrón de BSA para los estándares, a la vez que se prepararon las muestras agregando 10, 20 y 30 µl del extracto obtenido en tubos eppendorff. Se adicionó tanto a los estándares como a las muestras, amortiguador de extracción hasta alcanzar 100 µl, y se le agregó un mililitro de la solución de Bradford (100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml de etanol al 50%, 100 ml de ácido fosfórico al 85%, todo esto aforado a un litro con agua destilada estéril y filtrado en papel Whatman no. 1), cada tubo se agitó en el vortex y se dejó reposar durante 10 minutos. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 650) a una longitud de onda de 595 nm.

Para hacer los cálculos del contenido de proteínas solubles, se determinó la regresión lineal de la absorbancia contra concentración conocida de BSA, los resultados se expresaron como mg de proteína. g PF⁻¹.

2.2.3.3. Actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO)

La evaluación de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa se realizó de acuerdo al método utilizado por Tamayo (2002), excepto que el sustrato y la cantidad de proteína fueron diferentes.

Extracción de la enzima (PPO)

La extracción de la PPO se realizó macerando 5g de tejido de cada una de las muestras en presencia de nitrógeno líquido, el polvo fue homogenizado en 10 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7 (0.1 M de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 0.1 M de fosfato de sodio dibásico

hepta hidratado) con inhibidores de proteasas (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Aprotinina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina y 10 mM de PMSF), 10 mM de ácido ascórbico y 3% de PVPP para la precipitación de los fenoles, se homogenizó con un politrón (Poly science model. X-520). El agente reductor fue usado con el fin de prevenir el oscurecimiento del tejido y de la solución durante la extracción de la proteína. Posteriormente se centrifugó a 13,200 rpm durante 30 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante y se colocó en tubos para tener el extracto enzimático que se utilizó para la determinación de la actividad de la PPO.

Ensayo de la actividad de PPO

La actividad de la enzima fue determinada mediante los métodos utilizados por Tamayo (2002) y Arzápalo (2002). Primero se realizó una caracterización de la afinidad de PPO de banano para diferentes sustratos y concentraciones de los mismos. Los sustratos que se utilizaron fueron: 4-metil catecol, pirocatecol, p-cresol y ácido caféico, a concentraciones de 0.01 M, 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M, 0.1M, 0.2 M, 0.3M, 0.4 M, 0.5 M y 1 M. Además se determinó la cantidad de proteína y el tiempo en que ninguno de estos factores era limitante durante la reacción para medir la actividad de la PPO.

El ensayo de actividad de PPO se realizó utilizando 3 ml de una solución de 4-metil catecol 0.1 M disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7, e incubando durante 20 minutos a 30°C en baño maría (Yamato model BT15). Transcurrido el tiempo, se agregó el extracto enzimático el cual contenía alrededor de 60 μg de proteína y se agitó para iniciar la reacción. Inmediatamente se determinó la absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos a 420 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 650), como blanco se utilizó el sustrato sin extracto enzimático.

La actividad absoluta (A.A) de la enzima se expresó como $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml enzima}^{-1}$, para ello se considero que el cambio en 0.001 unidad de absorbancia corresponde a una unidad de producto formado. Esta actividad se calculó considerando la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = coeficiente de extinción molar por grosor de la cubeta por la concentración). Para ello primeramente se calculó la pendiente (m) de la recta obtenida al graficar la absorbancia contra tiempo. Los valores de actividad se obtuvieron aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad absoluta (A.A)} = \frac{m \cdot V_R \cdot 10^{+3}}{\epsilon \cdot V_E}$$

Donde:

A.A= Actividad absoluta= $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml enzima}^{-1}$ ó $\text{UAE} \cdot \text{ml}^{-1}$ de enzima

m = pendiente de la recta

V_R = volumen de la reacción (3ml del sustrato + volumen de extracto) en ml

V_E = volumen de extracto (ml)

ϵ = Coeficiente de extinción molar del sustrato (el utilizado fue 4-metilcatecol $\epsilon = 3.04544246 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La actividad específica (A.E.) se calculó considerando la cantidad de proteína contenida en el extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Específica (A.E.)} = \frac{\text{Actividad absoluta (UAE} \cdot \text{ml de enzima}^{-1})}{\text{Vol. del extracto} \times \text{Cantidad de proteína (mg)}}$$

Las unidades de la actividad específica están dadas en Unidades (U).mg de proteína⁻¹ que equivalen a $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

2.2.3.4. Contenido de clorofilas y carotenoides totales

Para la extracción de clorofilas y carotenoides se utilizó la técnica de Wellburn (1994); un gramo de tejido fresco se pulverizó en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, al macerado se le agregó acetona fría al 80% (10 ml por gramo de tejido). El homogenado se transfirió a un embudo Buchner provisto de papel filtro y se sometió a vacío. El filtrado obtenido se dejó reposar 30 minutos en frío y en la oscuridad, posteriormente se centrifugó 10 min a 12,000 rpm, se decantó y se midió el volumen obtenido. El extracto acetónico se leyó en el espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 650) a tres longitudes de onda: 470, 645 y 663 nm (Wellburn, 1994).

La concentración de clorofilas y carotenoides se obtuvieron de la siguiente manera:

$$\text{Clorofila A} = 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645}) = \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$\text{Clorofila B} = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663}) = \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$\text{Clorofilas Totales} = 20.2 (A_{645}) + 8.2 (A_{663}) = \mu\text{g/ml} = (\text{clorofila total} \times \text{vol})/\text{g}$$

$$\text{PF} = \mu\text{g} \cdot \text{g PF}^{-1}$$

Capítulo II. Papel de GB en el desde daños ocasionados por frío:

$$\text{Carotenoides totales} = (1000 (A470) - A663) - 104 (A645) / 198 = \mu\text{g/ml} = (\text{carotenoides} \times \text{vol (ml)}) / \text{g PF} = \mu\text{g}^{-1}$$

2.2.4. Análisis estadístico

Para la realización del análisis esb se utilizaron los datos provenientes de 3 plantas diferentes pa tratamiento y 3 manos para cada tiempo de exposición al frío, tod su respectivo control (tabla 2.1). Los parámetros se midieron en tres diferentes por día de cada tratamiento y tiempo de exposición al friendo un total de 288 frutos analizados. Se calcularon los promediosdesviaciones estándar de los resultados obtenidos de cada parámetrol programa de Excel 2000. Las diferencias significativas entre los trntos se detectaron mediante análisis de las medias (LSD) con un nivenfianza del 95% (P=0.05) en el programa StatGraphics Plus 4.1.

Tabla 2.1. Número de frutos expuestos a durante diferentes tiempos de exposición por cada tratamiento con GB.

Tratamientos con GB	No. de plantas	Tiempo de exposición (días)	No. de manos	No. de frutos (dedos)
Control (agua destilada)	3	0 (0)	3	42
			3	40
			3	39
			3	42
			12	163
50 mM	3	0 (0)	3	39
			3	42
			3	39
			3	40
			12	160
100 mM	3	0 (0)	3	40
			3	42
			3	39
			3	41
			12	162

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Síntomas visiales del daño por frío y efecto de GB

En la figura 2.5 se muestra el aspecto de los frutos con los diferentes tratamientos a los 12 días después del corte.

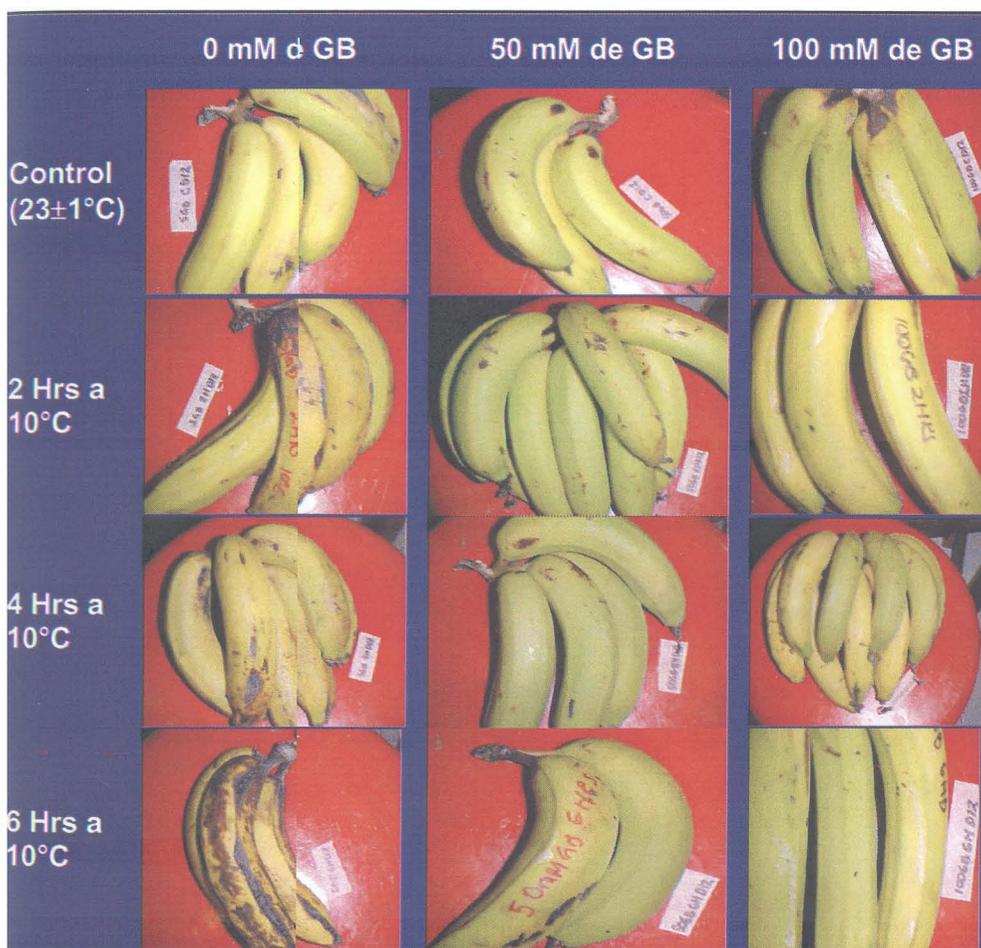


Figura 2.5. Frutos de bano bajo tratamiento con GB y frío, doce días después del corte. Las columnas representan los tratamientos con GB (0, 50 y 100 mM) y las filas el tiempo de exposición a 10°C (0, 2, 4 o 6 horas).

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

Se observó que los frutos sin la aplicación de GB y expuestos a frío, presentaron una maduración acelerada a comparación de aquellos frutos cuyas plantas fueron asperjadas con GB, principalmente en las tratadas con 50 mM. GB parece retardar la maduración en los frutos mantenidos a una temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$ y también en aquellos frutos bajo estrés por frío. A nivel subepidérmico los síntomas de pardeamiento en los frutos de banano comienzan a aparecer un día después de la exposición al frío, siendo más marcados al segundo día (figura 2.6) en aquellos frutos en ausencia de GB y expuestos durante 6 horas a una temperatura de 10°C . En los otros tratamientos no se observaron diferencias.

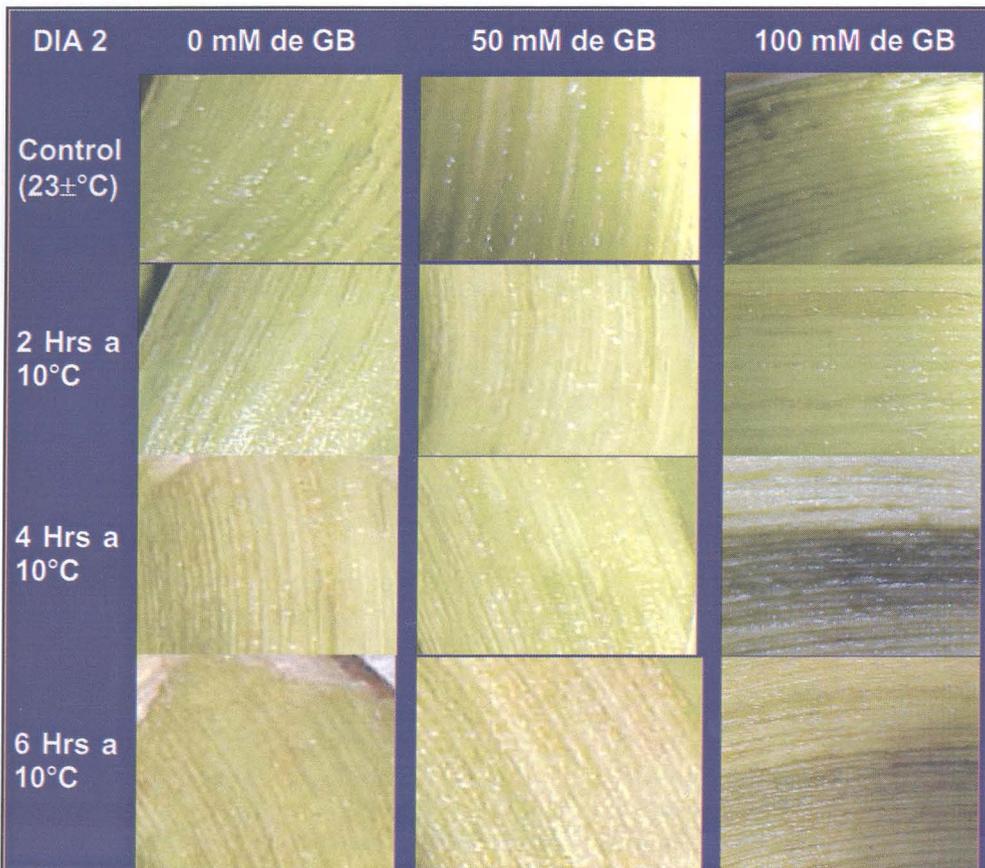


Figura 2.6. Epidermis de bananos tratados con GB y frío, dos días después de cada tratamiento. Las columnas indican las concentraciones de GB (0, 50 y 100 mM) y las filas el tiempo de exposición a 10°C (2, 4 o 6 horas).

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

A partir del cuarto y quinto día después del tratamiento con frío, se observaron mancha subepidérmicas en los frutos tratados con 50 mM de GB y expuestos durante 6 horas (figura 2.7). Mientras que los frutos expuestos a 100 mM no mostraron daño alguno. En contraste, aquellos frutos con 0mM de GB y expuestos durante 4 y 6 horas a 10°C presentaron un pardeamiento epidérmico marcado. Los controles no mostraron daño alguno.

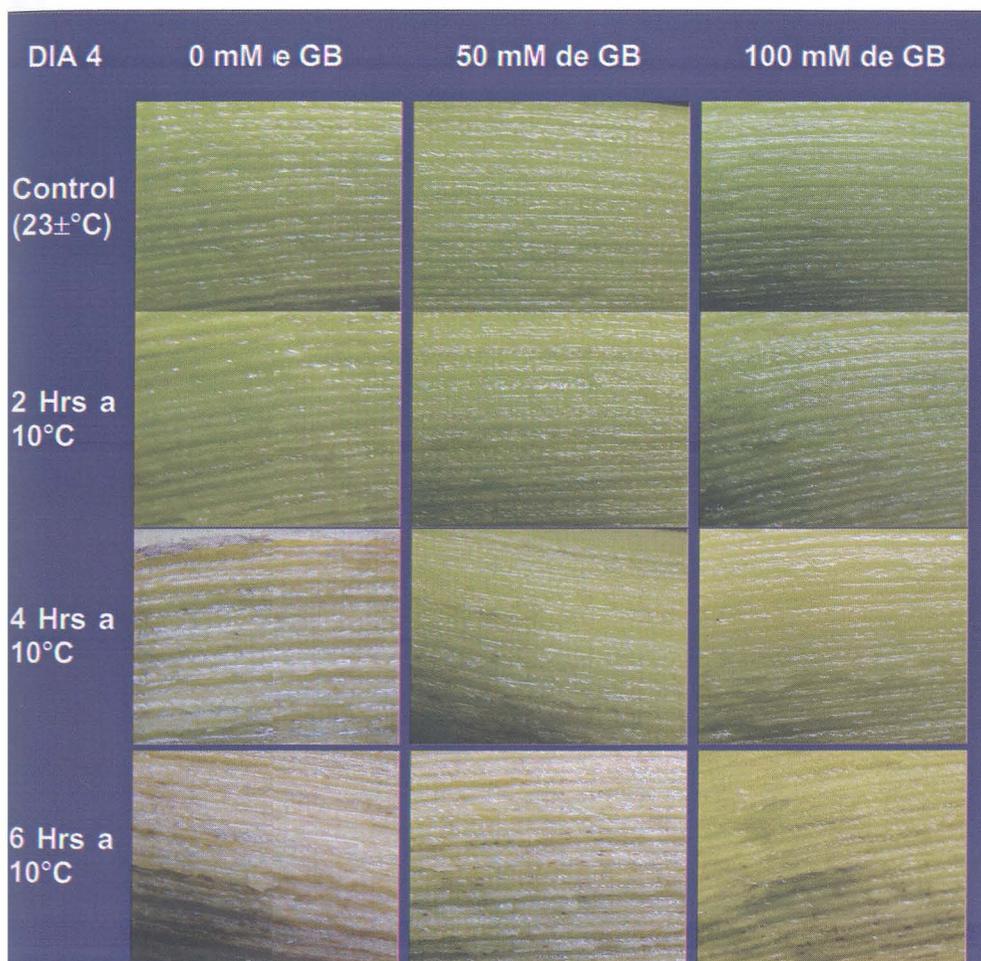


Figura 2.7. Epidermis de bananos tratados con GB y frío, cuatro días después de la aplicación de cada tratamiento. Las columnas indican las concentraciones de GB (0, 50 y 100 mM) y las filas el tiempo de exposición a 10°C (2, 4 o 6 horas).

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

En la figura 2.8 se muestran los bananos bajo tratamiento con GB y frío ocho días después del corte, los frutos mantenidos durante 4 y 6 horas a 10°C presentaron manchas subepidérmicas, tanto lo que fueron tratados con GB como su control. En contraste los frutos mantenidos a temperatura ambiente (23±1°C) y los frutos expuestos durante 2 horas a 10°C, no presentaron estas manchas.

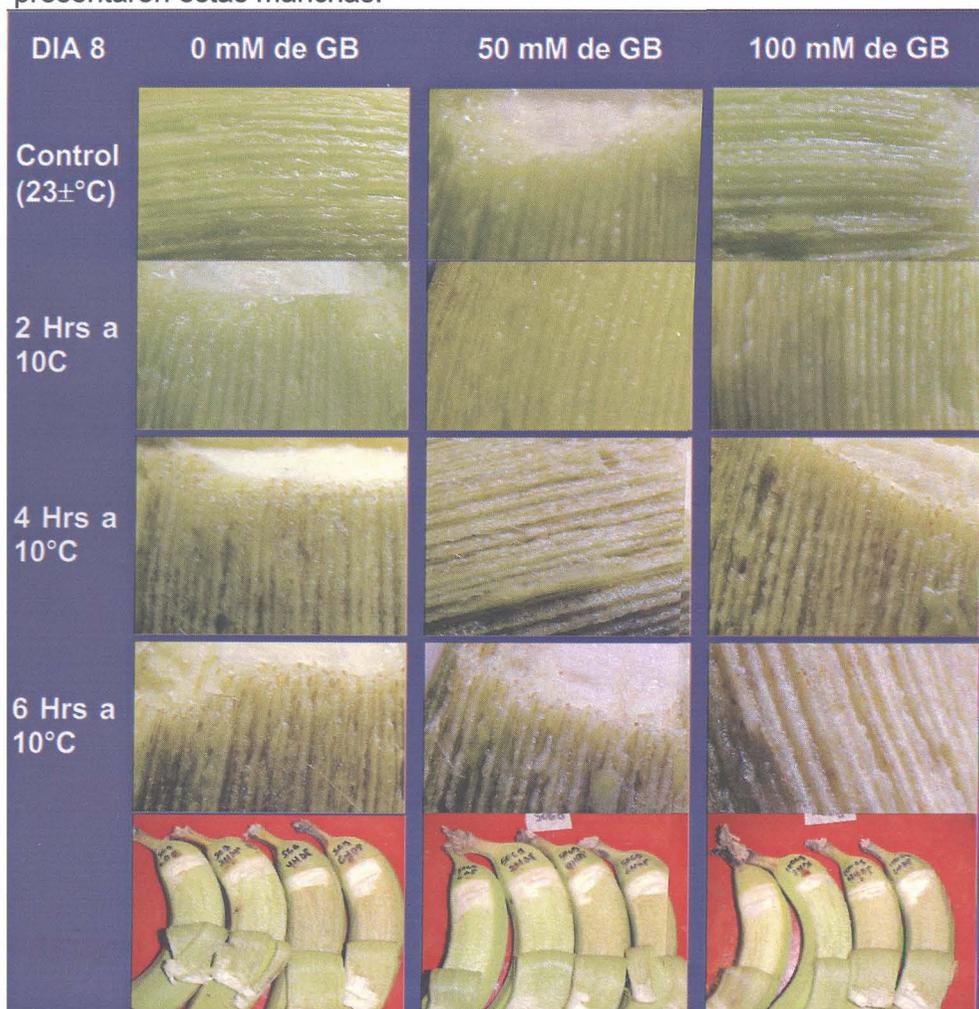


Figura 2.8. Epidermis de bananos tratados con GB y frío, ocho días después de la aplicación de cada tratamiento. Las columnas indican las concentraciones de GB (0, 50 y 100 mM) y las filas el tiempo de exposición a 1°C (2, 4 o 6 horas).

Al parecer los frutos mantenidos durante 4 y 6 horas a 10°C y en ausencia de GB presentaban ya una coloración verde claro a los ocho días después del corte, indicando que había dado inicio la maduración en estos frutos. Los frutos restantes comenzaron a adquirir esa tonalidad a los 10 días, quedando una madurez grado 4 o 5 a los doce días.

2.3.2. Cambios bioquímicos en frutos de banano expuestos a frío

2.3.2.1. Contenido de fenoles solubles

El contenido de fenoles en la epidermis de los frutos expuestos a 2, 4 o 6 horas a 10°C, fueron menores comparados con el control (figura 2.9, panel A). El contenido de fenoles aumentó conforme maduraron los frutos hasta 4.5 veces más con respecto al contenido que tenían al inicio del corte (0.525 ± 0.063 hasta 2.5 ± 0.29 mg de fenoles. g PF⁻¹). Cuando los frutos fueron expuestos a frío esta tendencia se mantuvo, aunque el contenido de fenoles solubles fue menor con respecto al control en los frutos expuestos a frío y se redujo a la mitad en aquellos frutos que fueron mantenidos a 10°C durante 6 horas (0.145 ± 0.0175 hasta 1.310 ± 0.157 mg de fenoles. g PF⁻¹). Hubo diferencias estadísticas significativas en el contenido de fenoles entre los frutos expuestos a frío y el control (mantenido a $23 \pm 1^\circ\text{C}$), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los frutos mantenidos por 4 o 6 horas en frío.

2.3.2.2. Contenido de proteínas solubles

El comportamiento del contenido de proteínas solubles en los frutos utilizados como control (mantenidos a $23 \pm 1^\circ\text{C}$), mostró un incremento de 0.921 ± 0.005 a 1.995 ± 0.194 mg de proteína. g PF⁻¹ en los primeros cuatro días después del corte (figura 2.9, panel A). No obstante, a partir del quinto día disminuyó el contenido de estas macromoléculas hasta alcanzar un valor de 0.14 ± 0.091 mg de proteína. g PF⁻¹ en el octavo día. La figura 2.9, panel B muestra el contenido de proteínas solubles presentes en la epidermis de los frutos de banano expuestos a 10°C durante 2, 4 o 6 horas. Se observó que los frutos expuestos durante 2 y 4 horas presentaron un comportamiento similar al control durante los primeros tres días después del corte. Posteriormente las proteínas disminuyeron de manera drástica tanto en el control como los frutos expuestos a 4 y 6 horas, excepto en los frutos mantenidos durante 2 horas a 10°C (1.266 ± 0.44 mg de proteína. g

PF⁻¹), en los cuales el contenido de proteínas fue diez veces mayor al registrado por el control en el octavo día.

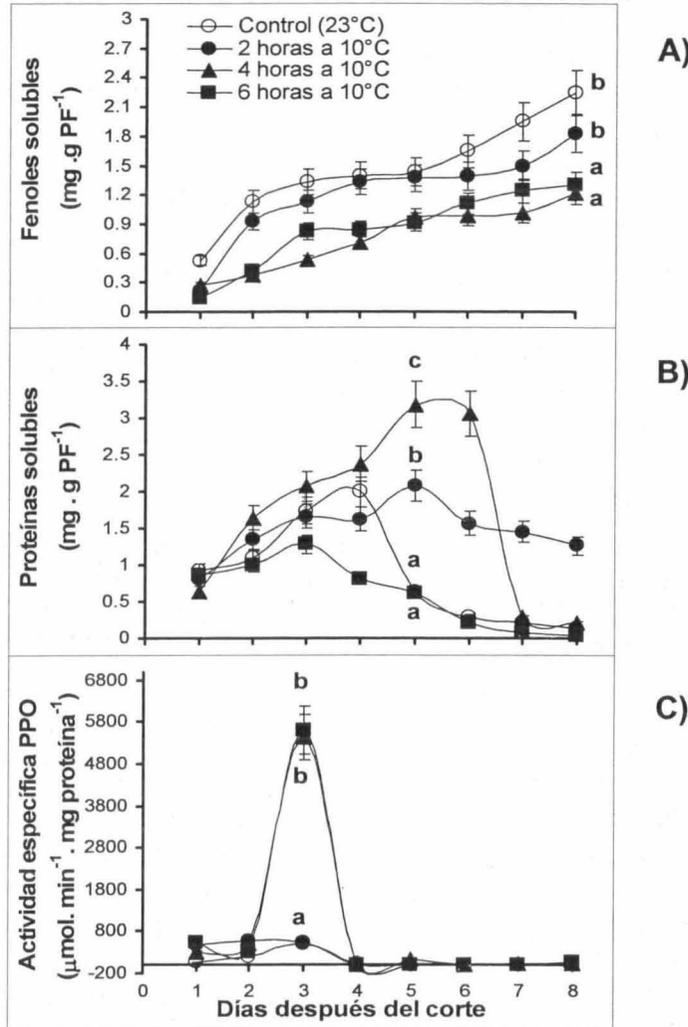


Figura 2.9. Efecto del frío sobre algunos parámetros bioquímicos de la epidermis del banano variedad enano gigante, durante ocho días de seguimiento. A) Fenoles solubles, B) Proteínas solubles, C) Actividad específica de PPO de frutos mantenidos a 23°C y expuestos a 10 °C durante 2 4 o 6 horas. (P=0.05, cada punto es el promedio de n=3 ± SD). (○) Mantenido a 23±1°C (Control), (●) 2 horas a 10°C, (▲) 4 horas a 10°C y (■) 6 horas a 10°C. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

El comportamiento observado en los frutos expuestos a 4 y 6 horas fue similar al presentado por el control, aunque hubo un desplazamiento en el tiempo de reducción de la proteína; en el control disminuyó al quinto día mientras a las 4 horas disminuyó a los 7 días y en los frutos expuestos por 6 horas a 10°C disminuyó a los cuatro días.

El contenido de proteína también varió entre tratamientos, los valores máximos registrados fueron de 2.0, 2.08, 3.2 y 1.3 mg de proteína. g PF⁻¹ en los frutos expuestos a 0, 2, 4 y 6 horas a 10°C respectivamente. Esto sugiere que el frío indujo la síntesis de proteínas durante las primeras horas de la exposición, aunque dependiendo del tiempo de exposición se aceleró la degradación de estas macromoléculas la cual fue superior a 6 horas. Hubo diferencias estadísticas significativas entre el control y los tratamientos con frío.

2.3.2.3. Actividad específica de la polifenol oxidasa

En la figura 2.9 panel C, se muestra el comportamiento de la actividad específica de PPO presente en la epidermis de los frutos de banano bajo tratamiento con frío. Se observó una baja actividad basal al primer y segundo día después del corte, alcanzando una actividad máxima al tercer día. Esta actividad decayó posteriormente hasta valores basales.

El comportamiento en la actividad de PPO se observó en todas las condiciones de tratamiento con frío, lo único que cambió fue la actividad máxima alcanzada al tercer día. Los frutos mantenidos durante 6 horas a 10°C presentaron una actividad específica 10 veces superior ($5614.4 \pm 898.6 \mu\text{mol. min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$) a los valores encontrados en el control ($523.53 \pm 83.20 \mu\text{mol. min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$). La actividad específica en los frutos expuestos a frío fue mayor al control, lo que sugiere que a mayor tiempo de exposición al frío hubo un aumento en la actividad específica de PPO y por lo tanto mayor pardeamiento del fruto. Hubo diferencias estadísticas significativas entre los frutos expuestos durante 4 y 6 horas a 10°C con respecto al control.

2.3.2.4. Contenido de clorofilas

La figura 2.10 panel A, muestra el contenido de clorofilas totales de los frutos expuestos a frío. En el control se observó una degradación gradual de las clorofilas (55.26 ± 0.217 a $1.25 \pm 0.104 \mu\text{g clorofila. g PF}^{-1}$) conforme

transcurrieron los días después del corte, esto sugiere que los factores que condicionan la degradación de la clorofila se expresaron con mayor intensidad en los días posteriores al corte.

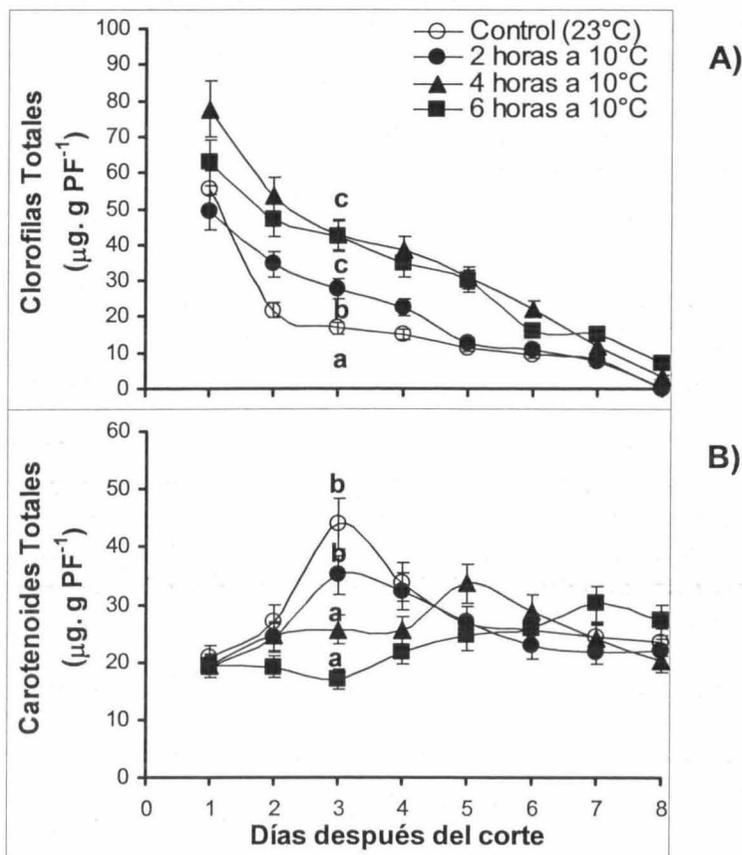


Figura 2.10. Efecto del frío en el contenido de clorofilas y carotenoides presentes en la epidermis del banano variedad enano gigante durante ocho días de seguimiento. A) Clorofilas totales, B) Carotenoides totales de frutos mantenidos a 23°C y expuestos a 10 °C durante 2, 4 o 6 horas. (P=0.05, cada punto es el promedio de $n=3 \pm SD$). (○) Control, (●) 2 horas a 10°C, (▲) 4 horas a 10°C y (■) 6 horas a 10°C. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

Cuando los frutos estuvieron expuestos a frío (temperatura de 10°C durante 2, 4 o 6 horas) las clorofilas mantuvieron un comportamiento similar al

control, disminuyeron conforme pasaron los días después del corte. Aunque el contenido de clorofilas en los frutos expuestos a frío fue mayor al registrado por el control, indicando que la degradación de las clorofilas fue más lenta cuando los frutos estuvieron expuestos a frío. Hubo diferencias significativas en el contenido de clorofilas en cada uno de los tratamientos analizados.

Este comportamiento pudo ser resultado de que los frutos al ser expuestos a frío perdieron la habilidad de madurar o de que este proceso se modificó presentándose una maduración anormal del fruto.

2.3.2.5. Contenido de carotenoides

La figura 2.10 panel B, muestra el efecto en el contenido de carotenoides totales en la epidermis de banano variedad Enano Gigante; se puede observar que el contenido de carotenoides en el control presentó un ligero incremento hasta el tercer día, en los días posteriores el contenido de carotenoides se mantuvo a una concentración de 20.77 ± 0.58 a 23.31 ± 0.515 μg de carotenoides. g PF^{-1} . Los frutos expuestos durante 4 y 6 horas a 10°C no presentaron este comportamiento, porque el contenido de carotenoides se mantuvo. Hubo diferencias estadísticas significativas en el contenido de carotenoides entre los frutos expuestos durante 4 y 6 horas con respecto al control.

2.3.3. Efecto de GB en el desarrollo del daño por frío

2.3.3.1. Contenido de fenoles solubles

La figura 2.11, muestra como GB afectó el contenido de fenoles en frutos expuestos a una temperatura de 10°C durante 2, 4 y 6 horas. La figura 2.11 panel A, presenta la concentración de fenoles en los frutos control y en presencia de 50 y 100 mM de GB, se observó que los fenoles incrementaron 1.5 veces su contenido conforme avanzó el proceso de maduración, y fue mayor en aquellos frutos cuyas plantas fueron asperjadas con GB (0.387 ± 0.046 hasta 3.316 ± 0.398 mg de fenoles. g. PF^{-1} con respecto a 50 mM de GB y 0.523 ± 0.063 hasta 3.072 ± 0.369 mg de fenoles. g. PF^{-1} a 100 mM de GB). Se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con GB y su respectivo control.

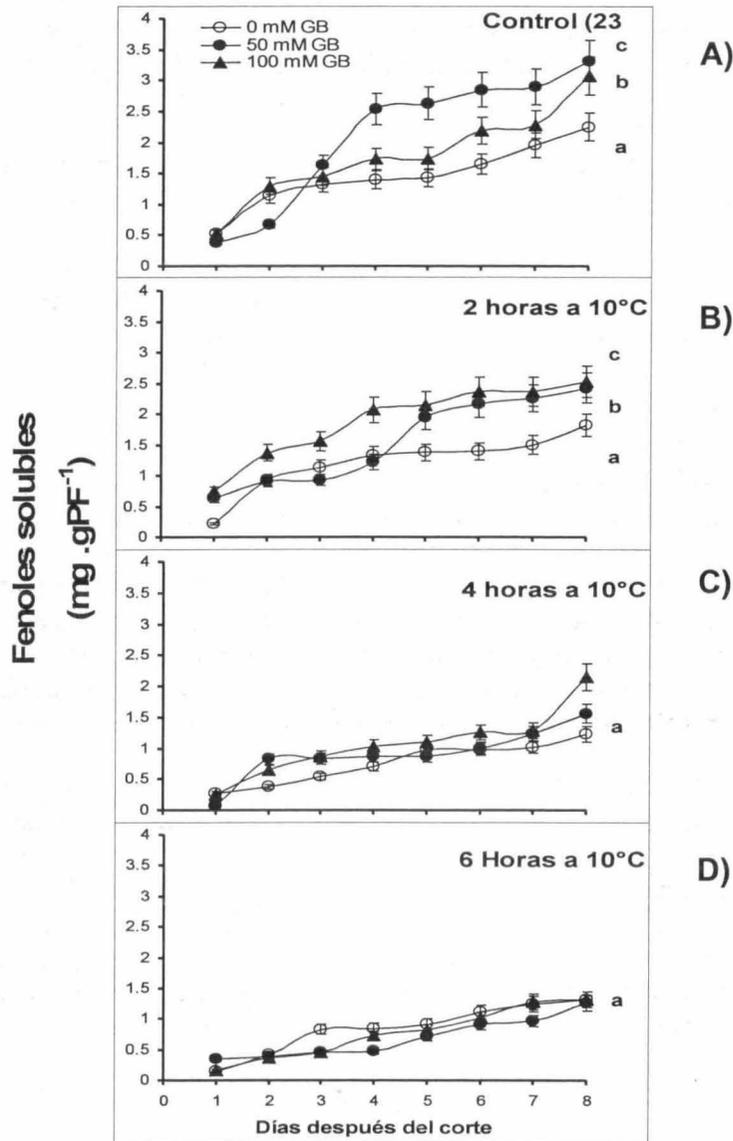


Figura 2.11. Contenido de fenoles solubles presentes en la epidermis de banano bajo tratamiento con GB y expuestos a frío. (A) 23°C, (B) 2 horas a 10°C, (C) 4 horas a 10°C y (D) 6 horas a 10°C. (P=0.05, n=3 ± SD). (○) 0 mM de GB (control), (●) 50 mM de GB, (▲) 100 mM de GB. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

Cuando los frutos fueron expuestos a frío el contenido de fenoles disminuyó como se muestra en los paneles B, C y D de la figura 2.11 y la cantidad de fenoles fue menor conforme se incrementó el tiempo de exposición al frío.

En frutos que fueron tratados con GB, la cantidad de fenoles fue mayor comparada con el control. Cuando los frutos fueron expuestos a frío la cantidad de fenoles disminuyó gradualmente, tanto en los tratados con GB como el control (0 mM de GB). Solo hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos de GB en aquellos frutos expuestos por 2 horas a 10°C, no ocurrió así en frutos expuestos durante 4 y 6 horas a 10°C en donde no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

2.3.3.2. Contenido de proteínas solubles

El contenido de proteínas totales (figura 2.12) en los frutos de banano tratados con GB fue mayor (figura 2.12, panel B, C y D) con respecto al control (panel A), en donde hubo mayor degradación conforme pasaron los días después del corte. En el panel A de la figura 2.12 se muestra que el contenido de proteínas aumentó durante los primeros días en el control, quizá por efecto de la maduración. Así mismo, se observó que una intensidad de 4 horas a 10°C pudo ser suficiente para producir daño por frío e inducir síntomas como el pardeamiento en frutos.

Cuando los frutos de banano se expusieron a frío, el contenido de proteínas en el control disminuyó conforme incremento el tiempo de exposición al frío, con 50 mM y 100 mM de GB el contenido de proteínas aumentó conforme la intensidad del frío fue mayor (0.042 ± 0.004 , 2.032 ± 0.137 , 2.510 ± 0.204 mg de proteína. g PF⁻¹ a las 6 horas tratadas con 0, 50 y 100 mM de GB respectivamente en el día 8 después del corte). Esto podría sugerir que GB promueve la síntesis de proteínas en la epidermis de los frutos cuando están expuestas a frío (figura 2.12 panel D).

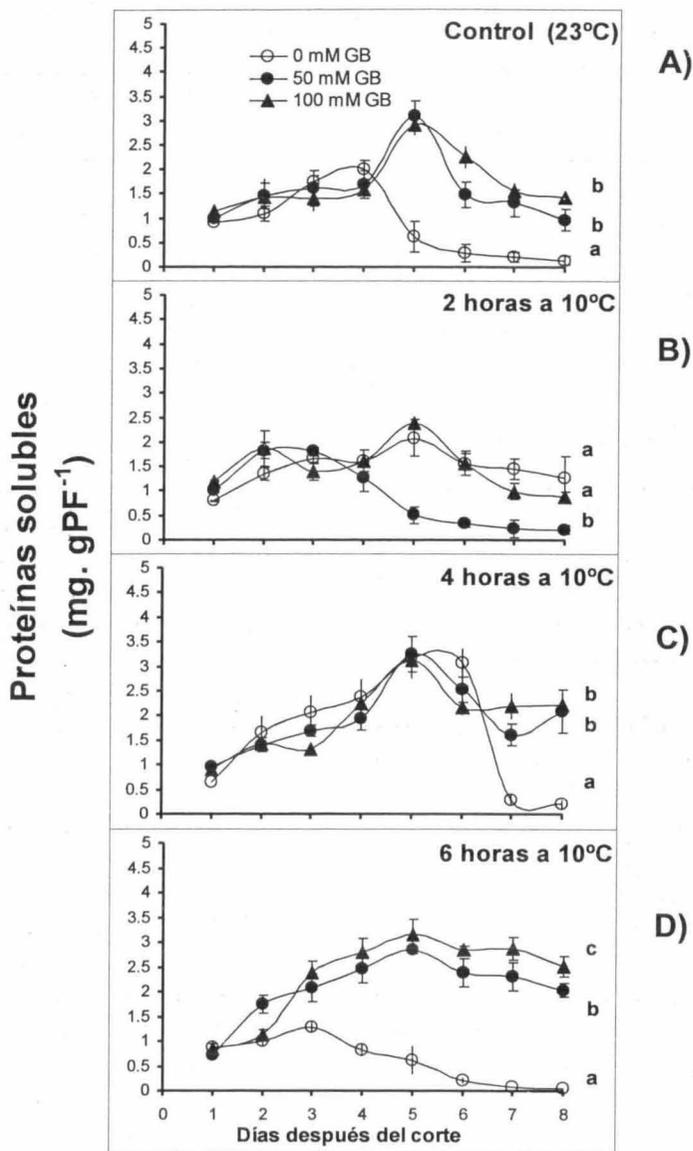


Figura 2.12. Contenido de proteínas solubles presentes en la epidermis de bananos tratados con GB y expuestos a frío. (A) 23°C, (B) 2 horas a 10°C, (C) 4 horas a 10°C y (D) 6 horas a 10°C. (○) 0 mM de GB (control), (●) 50 mM de GB, (▲) 100 mM de GB. ($P=0.05$, $n=3 \pm SD$). Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

2.3.3.3. Actividad enzimática de PPO

La figura 2.13, muestra el comportamiento de la actividad específica de PPO en la epidermis de los frutos bajo tratamiento con GB y frío. Se observó que el daño por frío, como es el pardeamiento de los frutos, puede ser causado por la actividad de la polifenol oxidasa sobre los fenoles, cuya actividad aumentó cuando los frutos se expusieron por mayor tiempo al frío (figura 2.13, panel A, B, C y D). El panel A de la figura 2.13 muestra que en bananos tratados con GB y mantenidos a temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$, presentaron mayor actividad de PPO ($1364.62\pm 43.36 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$ en frutos con 50 mM y $649.65\pm 81.37 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$ en aquellos tratados con 100 mM) con respecto al control ($523.53\pm 83.20 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$).

La actividad específica de la PPO mantuvo un comportamiento similar entre el control y los tratamientos con GB, durante los primeros días hubo un aumento de la actividad específica de la PPO, y posteriormente una caída brusca de la actividad. La actividad máxima se registra al tercer día en todos los tratamientos, y fue mayor en los frutos tratados con GB (1361.62 ± 43.36 y $649.64\pm 81.37 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$ para 50 y 100 mM de GB respectivamente). No hubo diferencias estadísticas significativas entre los frutos tratados con 100 mM de GB y el control, aunque si hubo diferencias significativas entre el control y 50 mM de GB.

Cuando los frutos se expusieron a frío se observó que entre mayor es el tiempo de exposición, la actividad de la polifenol oxidasa fue mayor y la concentración de fenoles se redujo. Este hecho sugiere que la concentración de la PPO en el tejido es inversa a la concentración de fenoles presentes en el tejido. Cuando los frutos fueron tratados con GB y se expusieron a frío, la actividad de la PPO aumentó ligeramente alcanzando valores de hasta $6403.51\pm 707 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$, lo que representó un 12.3% más que el control ($5614.4 \pm 898.59 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$). Estos resultados sugieren que la PPO posiblemente esté actuando en otro mecanismo de protección diferente al de pardeamiento en los frutos de banano. Este hecho se reforzó cuando se detectó que en los frutos tratados con GB no se presentó el pardeamiento, a pesar de que presentaban mayor actividad de PPO. La razón quizá fue que GB esta protegiendo la integridad de las membranas y probablemente no existe contacto entre los fenoles y la PPO. Hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con GB y frío con respecto al control.

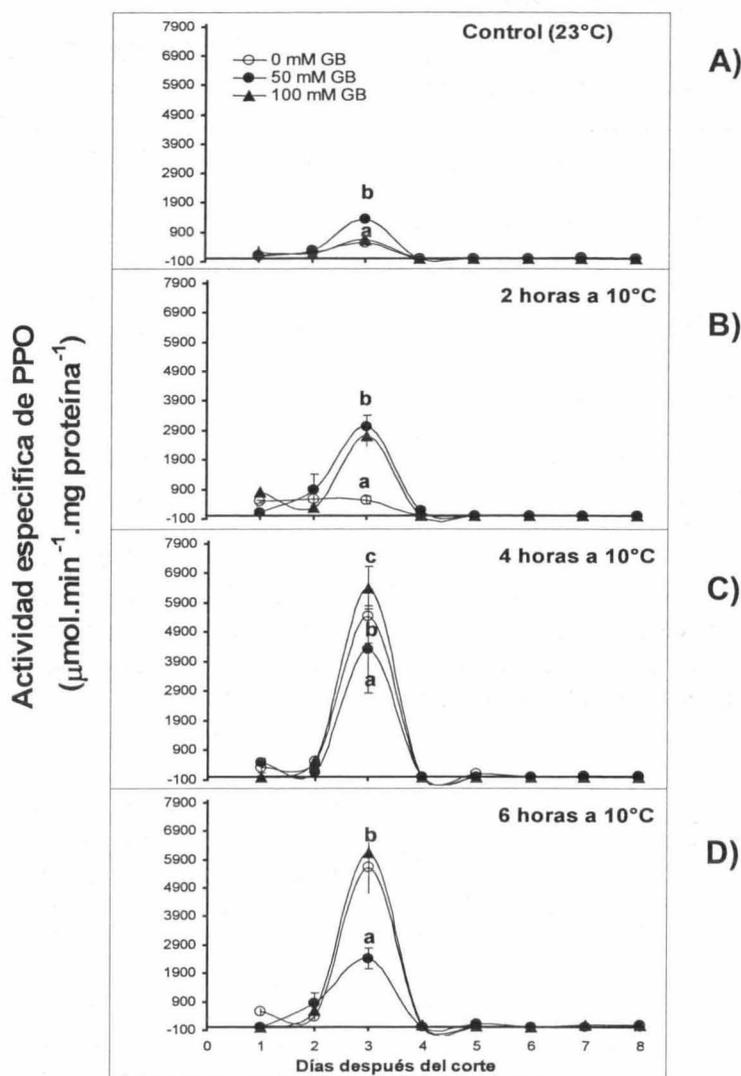


Figura 2.13. Comportamiento de la actividad específica de la PPO en la epidermis de bananos tratados con GB y frío. (A) 23°C, (B) 2 horas a 10°C, (C) 4 horas a 10°C y (D) 6 horas a 10°C. (○) 0 mM de GB (control), (●) 50 mM de GB, (▲) 100 mM de GB. ($P=0.05$, $n=3 \pm \text{SD}$). Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

2.3.3.4. Contenido de clorofilas

En la figura 2.14 se muestra el contenido de clorofilas totales de la epidermis de los frutos expuestos a frío y bajo tratamiento con GB. El panel A de la figura 2.14 muestra los valores del contenido de clorofilas en los frutos tratados con GB y mantenidos a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. La presencia de GB pareció mantener el contenido de clorofilas, por lo que la degradación de las clorofilas fue más lenta que la del control.

El contenido de clorofilas totales presentó un comportamiento similar tanto en el control como en los frutos tratados con GB. Conforme pasan los días después del corte las clorofilas disminuyeron y el contenido de clorofilas fue mayor en los frutos tratados con GB.

Cuando los frutos se expusieron a frío mantuvieron el mismo comportamiento, en lo que respecta al contenido de clorofilas, las cuales disminuyeron conforme transcurrieron los días después del corte. Aunque el contenido de clorofilas fue ligeramente mayor en los frutos tratados con GB que presentaron de 16.49 a 21.64 $\mu\text{g. g PF}^{-1}$ y el control 7.02 $\mu\text{g. g PF}^{-1}$ en el octavo día. Esto sugiere que la degradación de clorofilas fue 23.9% más lenta en los frutos tratados con GB. Hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

2.3.3.5. Cantidad de carotenoides

La figura 2.15 muestra el comportamiento del contenido de carotenoides en la epidermis de banano, se observó que el contenido de carotenoides fue mayor cuando los frutos no estuvieron expuestos a frío. Con frío, el contenido de carotenoides disminuyó conforme aumentó el tiempo de exposición a éste factor (Panel B, C y D de la figura 2.15).

Con 50 y 100 mM de GB el contenido de carotenoides fue ligeramente mayor con respecto al control, cuando estuvieron expuestos por 6 horas a 10°C . En frío el contenido de carotenoides disminuyó; por lo que podemos decir que los carotenoides quizá fueron utilizados como un mecanismo alternativo de protección contra el estrés a frío. En frutos tratados con soluciones de GB (50 y 100 mM), el contenido de carotenoides fue mayor, porque quizá GB retardó la degradación de clorofilas y carotenoides.

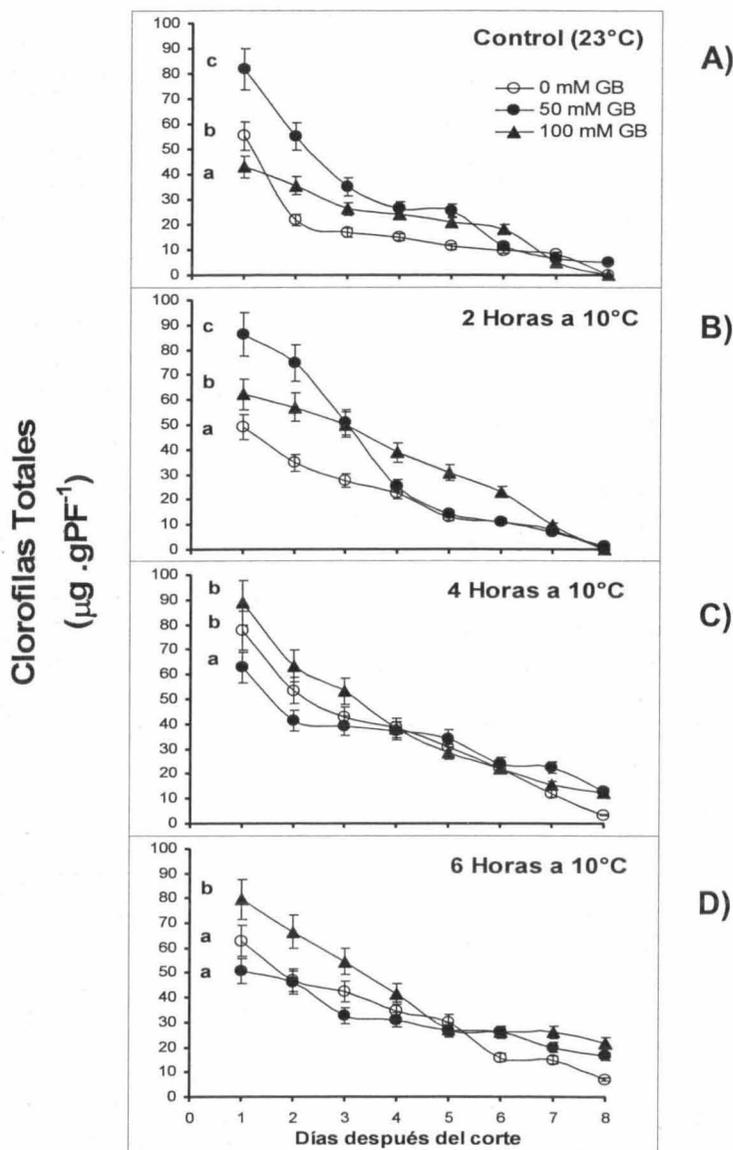


Figura 2.14. Comportamiento del contenido de clorofilas totales presentes en la epidermis de bananos tratados con GB y frío. (A) 23°C, (B) 2 horas a 10°C, (C) 4 horas a 10°C y (D) 6 horas a 10°C. (○) 0 mM de GB (control), (●) 50 mM de GB, (▲) 100 mM de GB. ($P=0.05$, $n=3 \pm \text{SD}$). Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

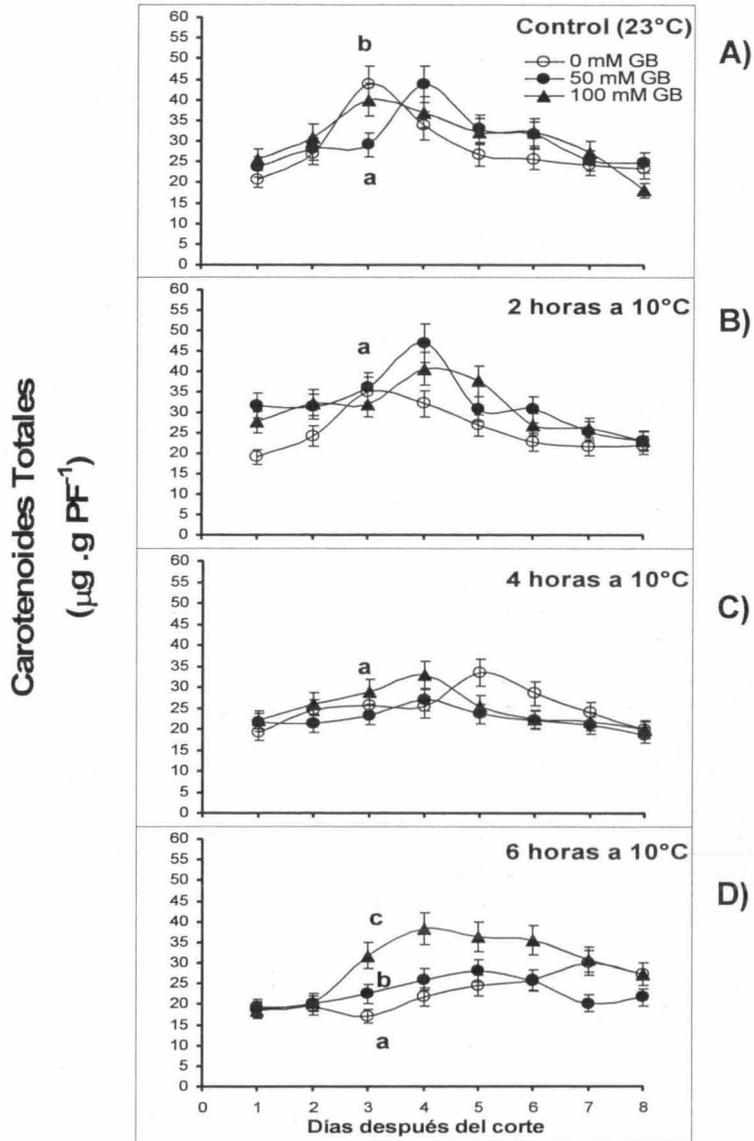


Figura 2.15. Comportamiento del contenido de carotenoides totales presentes en la epidermis de bananos tratados con GB y frío. (A) 23°C, (B) 2 horas a 10°C, (C) 4 horas a 10°C y (D) 6 horas a 10°C. (○) 0 mM de GB (control), (●) 50 mM de GB, (▲) 100 mM de GB. ($P=0.05$, $n=3 \pm \text{SD}$). Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

2.4. DISCUSIÓN

El banano es una planta sensible al frío que al ser expuesta a temperaturas por debajo de su punto crítico (entre los 10-12°C) (Lyons, 1973; Jones, 2000) sufre lesiones que se manifiestan en una maduración irregular, pardeamiento del fruto, lento crecimiento o baja productividad (Salunkhe & Desai, 1984 & Morelli *et al.*, 2003). El daño por frío en los frutos de banano depende mucho de la susceptibilidad del cultivar (Salunkhe & Desai, 1984); se sabe que la variedad más susceptible al frío es la de manzano, ya que en experimentos preeliminares se observó que éstos frutos presentaron los síntomas de daño por frío con una exposición de dos horas a 10°C. Estos daños pueden presentarse en cualquier estadio de desarrollo del fruto, siendo más susceptibles durante las etapas tempranas de desarrollo y durante su reproducción (Salunkhe & Desai, 1984; Park *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la variedad enano gigante sufre daño al estar expuesto a frío (10°C) por un tiempo mayor a 4 horas, manifestándose ciertos desórdenes que se reflejaron en una maduración irregular, aceleración de la maduración, pardeamiento epidérmico, coincidiendo con los resultados obtenidos por Morelli y colaboradores (2003), quienes trabajaron con cinco variedades diferentes de banano a nivel de postcosecha. Ellos manejaron temperaturas de 5, 7.2 y 10 °C durante un tiempo de exposición de hasta 7 días, mencionando que para la mayoría de las variedades estudiadas es aceptable 10°C hasta 3 días. Sin embargo, en este trabajo se determinó que el daño puede presentarse con 6 horas de exposición a 10°C en el caso de la variedad enano gigante, los síntomas no son visibles al momento pero se manifestaron en su maduración.

En los frutos de plantas tratadas con soluciones de GB (50 y 100 mM), se observaron más vigorosos y verdes, parece ser que los efectos de este osmolito se acentuaron en la protección. Quizá GB este estabilizando la integridad de las membranas, por lo que los efectos secundarios causados por frío en el banano no ocurrieron. Este hecho sugiere que GB pudiera estar actuando en algún mecanismo de la maduración del fruto.

La aplicación exógena de GB tuvo un efecto benéfico en bananos bajo estrés por frío, puesto que los desórdenes causados por este estrés no se manifestaron, lo cual coincidió con los resultados favorables obtenidos por Makela y colaboradores (1996), ellos trabajaron con diferentes plantas de

importancia agrícola, principalmente monocotiledóneas y encontraron que las especies asperjadas con GB tenían una mejor productividad.

Uno de los daños detectados y que es inducido por frío fue el pardeamiento de los frutos, este proceso se debe a la acción de enzimas como la peroxidasa y la polifenol oxidasa (Gooding *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004), que actúan sobre sus sustratos fenólicos y los oxidan hasta formar compuestos sumamente inestables, que se polimerizan generando pigmentos pardos en la epidermis (Gooding *et al.*, 2001).

Los resultados de la actividad específica de PPO y la concentración de fenoles de tejido de frutos expuestos a frío, sugirieron que la actividad de la PPO en la epidermis de banano se incrementaba después de los primeros días del corte al estar expuestos a frío y durante la maduración normal del fruto. Estos resultados coinciden con los descritos por Gooding y colaboradores (2001), quienes encontraron que la actividad de la enzima ocurre durante los primeros días de la maduración y los frutos maduros presentaron una actividad nula o baja en condiciones normales.

En el presente trabajo se detectó que la actividad de la PPO se incrementó cuando los frutos se expusieron a frío. Asociado al incremento en la actividad de esta enzima, se encontró que el contenido de fenoles disminuyó en el tejido. Este resultado concuerda con los datos obtenidos por Nguyen y colaboradores (2003), quienes encontraron que los bananos Kluai Khai y Kluai Hom Tom expuestos a temperaturas de 6 y 10°C, tenían una elevada actividad de la PPO y un mayor pardeamiento en los frutos, concluyendo que la baja temperatura indujo la actividad de la PPO sobre los fenoles y por lo tanto fue mayor el pardeamiento en el fruto.

La aplicación de GB incrementó el contenido de fenoles y también la actividad de PPO bajo condiciones normales y de estrés por frío. Al parecer GB promueve la síntesis de fenoles, aunque sería interesante conocer que tipo de fenoles son los que se sintetizan. Este aumento parece lógico porque los fenoles son el primer mecanismo de defensa ante cualquier agente extraño en la planta (Fletcher & Kott, 1999; Valls *et al.*, 2000).

Sakamoto y Murata (2002) reportaron que GB tiene la capacidad de osmoregular, estabilizando membranas, lo que no permite el contacto de los fenoles con la enzima polifenol oxidasa. Por otro lado, se observó que GB también esta promoviendo la síntesis de fenoles, ya que en el control

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

aumentó la concentración de estos compuestos. En este estudio solo se midieron los fenoles solubles y no se analizó el tipo de fenol que se están sintetizando, pero muchos de los fenoles tienen propiedades antioxidantes (Valls *et al.*, 2000; Rhodes *et al.*, 1981) y podrían estar mitigando el estrés oxidativo causado por frío (Levitt, 1980).

Con respecto a las proteínas solubles estas disminuyeron conforme fue mayor el tiempo de exposición al estrés por frío. Resultados similares a los obtenidos por Lyons (1973) y Levitt (1980) quienes encontraron que el frío aceleró la degradación de las proteínas. La aplicación de GB indujo la síntesis de proteínas ante el estrés por frío y además redujo la degradación de éstas, lo cual correspondió a lo observado por Makela y colaboradores (2000) en tomate pero bajo estrés por sequía y salinidad, donde encontraron que el contenido de proteínas aumentaba cuando se aplicaba GB en las hojas. Lo anterior sugiere que GB tiene un efecto protector manteniendo la estructura de las proteínas y promoviendo la síntesis de éstas.

Uno de los aspectos más evidentes en el proceso de maduración es la pérdida de clorofila, asociada con la destrucción de los cloroplastos y la activación de las clorofilasas (Purvis, 1980). Bajo estrés por frío se menciona que las clorofilas se degradan (Levitt, 1980), no obstante en el presente estudio, se obtuvo un mayor contenido de clorofilas en frutos mantenidos bajo estrés por baja temperatura, esto es quizá debido a que la intensidad y el tiempo de exposición no fueron suficientes para ocasionar la degradación de las clorofilas, o bien debido a la maduración irregular del fruto.

La aplicación de GB redujo la degradación de las clorofilas y aumento y mantuvo el contenido de carotenoides. Resultados similares a los obtenidos por Makela y colaboradores (2000), ellos trabajaron con plantas de tomate previamente tratadas con GB y sometidas posteriormente a estrés por salinidad y sequía. Ellos encontraron que GB mantuvo el contenido de clorofilas y carotenoides ante estos tipos de estrés. Entonces podemos sugerir que GB reduce la degradación de clorofilas y carotenoides en los frutos de banano tratados con este soluto.

2.5. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el presente capítulo se puede concluir que la maduración a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ causó un aumento en el contenido de fenoles y en la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) presentándose un pico al tercer día para luego disminuir, así como una disminución en el contenido de proteínas y clorofilas y mantenimiento del contenido de carotenoides, en la epidermis del fruto conforme avanza el proceso de maduración.

La exposición al frío causó en la epidermis del fruto un aumento en la actividad de la PPO respecto al control y por consiguiente una disminución en la concentración de fenoles, que al oxidarse debieron de haber aumentado los pigmentos causantes del pardeamiento. Un aumento en la degradación de proteínas, pues su contenido se vio reducido cuando el tiempo de exposición al frío fue mayor, una reducción en el contenido de carotenoides y un aumento de las clorofilas con respecto al control, por la maduración irregular que presentaron los frutos.

La aplicación foliar de GB modificó la respuesta de los frutos al ser expuestos al frío, causando un menor pardeamiento de los frutos que parece correlacionar con una menor actividad de la PPO, aunque no se afectó la concentración de fenoles. Promovió la síntesis de proteínas, no tuvo efecto en la degradación de clorofilas, aunque sí causó una mayor síntesis de carotenoides.

Con los parámetros evaluados en este capítulo no se pudo determinar a que nivel está actuando la GB, pero sí se puede concluir que este metabolito promueve la síntesis de proteínas y de carotenoides en respuesta al frío. Sería conveniente poder evaluar otros parámetros como son la fuga de electrolitos, la fluorescencia de clorofila y el etileno para obtener una mejor idea del papel que tiene la aplicación de GB en bananos sometidos a estrés por baja temperatura.

2.6. LITERATURA CITADA

- Allard F., Houde M., Krol M., Ivanov A., Huner N. P.A., and Sharn F. (1998). Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* **39**: 1194-1202.
- Arzápalo M. A. M. (2002): Actividad mono y difenolasa en extractos crudos de chicozapote (*Achras sapota*, *Manilkara achras* Mill. Tesis de Maestría en

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

- Ciencia en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida Yucatán. 76 p.
- Banacol (2004). Grados de madurez del Banano [en línea]. <http://www.banacol.com/espanol/productosBanano.html>. (Consultado: 3 de marzo de 2005).
- Bradford M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Chen W. P., Li P. H., and Chen T. H. H. (2000). Glycinebetaine increase chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment.* **23**: 609-618.
- Coughlan S.J., Heber U. (1982). The role of glycinebetaine in the protection of spinach thylakoids against freezing stress. *Planta.* **156**: 62-69
- Dadzie B.K., and J.E. Orchard. (1997). Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. *Guías Técnica Inibap*. El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. 63 p.
- Fletcher S.R., and Kott L. S. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. 10 th Rapeseed Congress. University of Guelph. Ontario Canada. 5 p
- Fujita S., Yang C-P., Matsufuji K., Ashrafuzzaman M.D., Hayashi N., and Shimokawa K. (2001). Changes of polyphenol oxidase activity (*Musa sapientum* L.) fruits during treatment by ethylene. *Food Preserv. Sci.* **27**(2): 79-82.
- Gooding P.S., Bird C., y Robinson S.P. (2001). Actividad de la polifenol oxidasa y expresión génica en la fruta de los bananos Goldfinger (AAAB, FHIA-01). *Infomusa.* **10**: 17-22.
- Ishitani M, Arakawa K, Mizuno K, Kishitani S, Takabe T 1993 Betaine aldehyde dehydrogenase in the Gramineae: levels in leaves of both betaine-accumulating and nonaccumulating cereal plants. *Plant Cell Physiol.* **34**: 493-495.
- Jones D.R. (2000). Disease of banana. Abacá and Emset (Eds). CAB Publishing. 352-379 pp.
- Larrahondo J. E. (1980). Plantas antitumores: constituyentes de la *Nectaria rigida*. *Natural products.* **43**, 353 p.
- Larrahondo J. E. (1985). Productos naturales: pruebas químicas iniciales en una planta. Guía de estudio del Departamento de Química, Universidad del Valle. 10 p.
- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. I. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Second Edition. Academic Press, New York. **1**. 497 p.
- Lyons J.M. 1973. Chilling Injury in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**: 445-466.
- Makela P, Peltonen-Sainio P, Jokinen K, Pehu E, Setala H, Hinkkanen R, Somersalo S. (1996). Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Sci.* **121** (2): 221-230.

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

- Makela P., Karkkainen J., and Somersalo S. (2000). Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grow under drought or salinity. *Biol. Plant.* **43**(3): 471-475.
- Makela P., M. Kontturi, E. Pehu and S. Somersalo. (1999). Photosynthetic response of drought and salt stressed tomato and turnip rape plants to foliar-applied glycinebetaine. *Physiol. Plant.* **105**: 45-50.
- McCue KF, Hanson A. D. (1992). Effects of soil salinity on the expression of betaine aldehyde dehydrogenase in leaves: Investigation of hydraulic, ionic and biochemical signals. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**: 555-564.
- Morelli K.L., Hess-Pierce B.M., and Kader A.A. (2003). Genotypic variation in chilling sensitivity of mature-green bananas and plantains. *Horttechn.* **12**(2): 328-332.
- Naidu B., Gunawardena T., and Fukai S. (2005). Increasing cold tolerance in rice by selecting for high polyamine and gibberellic acid content. A report for the rural industries research and development corporation. 21 p.
- Naidu B.P. and Williams R. (2004). Seed treatment and foliar application of osmoprotectants to increase crop establishment and cold tolerance at flowering in rice. Rural Industries Research and Development Corporation. 19 p.
- Naidu B.P., Stevenson G., Page R., and Munford S. (2003). Glycinebetaine foliar application increases pasture winter growth and milk yield. Proceedings of the 11 th Australian Agronomy Conference, Geelong. Victoria: *Aut. Soc. Agron.* 4 p.
- Nguyen T.B.T., Ketsa S., and Van Doorn W.G. (2003). Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel, during low temperature storage. *Postharvest. Biol. Technol.* **30**: 187-193.
- Papageorgiou G.C., and Murata N. (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynth. Res.* **44**: 243–252.
- Park E-J., Jeknic Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., and Chen T.H.H. (2004). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants and flowers from chilling damage. *Plant J.* **40**: 474-487.
- Paull R.E. (1990). Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. In: Wang C. Y. (Ed) Chilling injury of Horticultural Crops CRC Press, Boca Raton Fld. USA. 17-36 pp.
- Purvis, A. (1980). Sequence of chloroplasts degreening in calamondin fruit as influence by ethylene and AgNO₃. *Plant. Physiol.* **6**: 624-627.
- Raison, J.K., and Orr G. (1990). Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. In Wang Ch. Y. (Ed). Chilling Injury for Horticultural Crops. CRC Press. Boca Raton Fld. USA. 145-164 pp.

Capítulo II. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío:

- Rhodes M. J. C., Wooltorton L. S. C., and Hill A. C. (1981). Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. In: Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic press. New York. 193-220 pp.
- Robinson S.P., and Jones G.P. (1986). Accumulation of glycinebetaine in chloroplast provides osmotic adjustment during salt stress. *Aust. J. Plant. Physiol.* **13**: 659-668.
- Sakamoto A., and Murata N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environ.* **25**: 163-171.
- Saltveit M.E., and Morris L.L. (1990). Overview on chilling injury of horticultural crops. In Wang Ch. Y. (Ed). Chilling Injury for Horticultural Crops. CRC Press. Boca Raton Flida. USA. 3-15 pp.
- Salunkhe D.K., and Desai B.B. (1984). Postharvest Biotechnology of fruits. Library of Congress. Florida, United State. I: 43-58.
- Tamayo C. J. A. (2002). Estudio del sistema de polifenoloxidasas del fruto del chicozapote (*Achras sapota*). Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán. México. 81 p.
- Valls J., Lampreave M., Nadal M., y Arola L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza- Alimentación Equipos y Tecnología. *Enología*. Catalunya, España. 119-124 pp.
- Wang C.Y. (1994). Reduction of chilling injury by methyl jasmonate. *Act. Hort.* **368**: 901-907.
- Wellburn A.R. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **144**: 307-313.
- Yancey P.H. (1994). Compatible and counteracting solutes celular and molecular physiology of cell volume regulation. Ed. K. Strange autin T.X. CRC Press. 81-109 p.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., and Somero G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Sciense.* **217**: 1214-1222.
- Yang C-P., Nong Z-R., Lu J-L., Lu L., Xu J-S., Han Y-Z., Li Y-J., and Fujita S. (2004). Bananas polyphenol oxidase: occurrence and change of polyphenol oxidase activity in some banana cultivars during development. *Food Sci. Technol. Res.* **10** (1): 75-78
- Zhao Y., Aspinall D. & Paleg L.G. (1992) Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycine betaine against the effects of freezing. *J. Plant Physiol.* **140**: 541-543.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío; efectos en respiración, etileno, eficiencia del fotosistema II y fuga de electrolitos

3.1. INTRODUCCIÓN

Los desórdenes fisiológicos y bioquímicos ocasionados por frío se deben a modificaciones en las propiedades de la membrana debido a la exposición a temperaturas por debajo de las consideradas como críticas (Lyons, 1973; Levitt, 1980), que en el caso de las plantas tropicales y algunas de clima templado es por debajo de los 11°C (Salunkhe & Desai, 1984; Nilsen & Orcutt, 1996; Dadzie & Orchard, 1997).

Entre los desórdenes observados se encuentran la inhibición de la síntesis de proteínas, la reducción de la tasa fotosintética, el aumento en la respiración anaeróbica y daños en el mecanismo fotosintético (Levitt, 1980). Todos estos cambios alteran el metabolismo de la planta y se manifiestan en un lento crecimiento, enchinamiento de hojas, clorosis de hojas, pardeamiento de frutos, aceleración de la maduración, maduración anormal entre otros daños (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Nielsen & Orcutt, 1996; Ayora *et al.*, 2002 y Artés & Artés-Hernández, 2003).

El fotosistema II es uno de los componentes más vulnerables del aparato fotosintético (Anderson & Baber, 1996). Diversos estudios sugieren que el estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas pueden reducir la eficiencia del fotosistema II, aumentando la degradación de la proteína D1 e interfiriendo en la fosforilación del PSII (Giardi *et al.*, 1996; Makela *et al.*, 1999). Además existen evidencias de que cuando la membrana celular está dañada por frío se incrementa la fuga de electrolitos (King & Ludford, 1984; Autio & Bramlage, 1986; Woods *et al.*, 1991; Sharom *et al.*, 1994), la tasa de producción de etileno y CO₂ usualmente se incrementan (Lyons & Breidenbach, 1990; Field, 1990; Leshem & Kadish, 1992). La respiración normalmente declina en frutos cosechados, pero cuando son expuestos a frío, la respiración se incrementa por la ruta alternativa en respuesta al frío (Moynihan *et al.*, 1995). Algunos tipos de frutos (peras y melones), aceleran la producción de etileno durante el estrés por frío (Wang & Adams, 1982).

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

Las plantas cuentan con varios mecanismos para sobrevivir ante las condiciones de estrés, y una forma es la síntesis de moléculas de bajo peso molecular denominados solutos compatibles, como la GB (Santoro *et al.*, 1992; Rhodes & Hanson, 1993; Papageorgiou & Murata, 1995; Sakamoto & Murata, 2002). Dentro de las funciones de la glicina-betaína se encuentran la osmoregulación (Wyn *et al.*, 1977), protección de la funcionalidad de las proteínas como la rubisco y lípidos del aparato fotosintético y mantiene el flujo electrónico a través de las membranas de los tilacoides (Xing & Rajashekar, 1999; Allakhverdiev *et al.*, 2003).

En estudios en donde se asperjo GB a hojas de plantas, se ha encontrado que GB protege al complejo del fotosistema PSII del daño producido, a través de la aceleración de la renovación de la proteína D1 y manteniendo la actividad antioxidante en altos niveles, factor que reduce el fotodaño producido por la sequía en plantas de trigo (Ma *et al.*, 2006). También se ha encontrado que GB aplicada foliarmente previene la fotoinhibición en trigo (*Triticum aestivum*) durante el estrés por congelamiento (Allard *et al.*, 1998). Plantas transgénicas de arroz (Sakamoto *et al.*, 1998), *Arabidopsis* (Alia *et al.*, 1999) y tabaco (Holmstrom *et al.*, 2000), que expresan transgenes para enzimas involucradas en la síntesis de GB como la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), colina deshidrogenasa (CDH), colina monooxigenasa (CMO) o colina oxidasa (COD), fueron más tolerantes a la fotoinhibición causado por frío, alta luminosidad y salinidad.

En el capítulo anterior de este trabajo, se demostró que la GB protege de las alteraciones metabólicas causadas por frío. No obstante es importante incluir una serie de parámetros adicionales para entender mejor a que nivel se da el papel protector de GB al daño ocasionado por frío en banano. Para ello se realizó la aplicación foliar de GB (100 mM) durante tres días seguidos, usando como control agua destilada. Los frutos se cosecharon y se colocaron en una incubadora a 10°C durante 6 horas, y por último se transfirieron a 23°C± 1°C hasta su maduración. Cada 24 horas se evaluaron parámetros como la eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm), evolución de la producción de etileno, la respiración y la fuga de electrolitos, los cuales son considerados como indicadores del daño causado por frío de acuerdo a McCollum y Mc Donald (1991). Se evaluaron dichos parámetros con la finalidad de intentar comprender como afecta el frío en el proceso de maduración del banano y qué efectos tiene la aplicación de GB ante los daños ocasionados por este tipo de estrés.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

Este trabajo se realizó en banano *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) "Enano Gigante", cultivado en el vivero del CICY. Las plantas seleccionadas tenían frutos de 13 semanas de desarrollo, con grado de madurez 1 (Banacol, 2004).

3.2.2. Tratamientos

La evaluación del efecto de GB sobre el desarrollo de los daños fisiológicos ocasionados por frío en los frutos de banano, se realizó mediante la estrategia presentada en la figura 3.1. Las plantas seleccionadas se trataron con una solución 100 mM de GB, como control se utilizó plantas asperjadas con agua destilada. Las aspersiones se realizaron en las primeras dos hojas cercanas a la inflorescencia y el ráquíz, se hicieron aplicaciones diarias de 0.250 l/planta de la solución de GB por tres días. Posteriormente los frutos se cosecharon de las diferentes plantas tratadas y se expusieron a 10°C durante 6 horas en una incubadora (Forma Scientific, Diurnal Growth Chamber) en completa oscuridad. Como controles se utilizaron frutos mantenidos a una temperatura de 23°C±1°C.

Los frutos que fueron expuestos a frío se transfirieron a temperatura ambiente (23°C± 1°C) y se les dio un tratamiento igual al descrito en el capítulo anterior, para eliminar el exceso de resina y el polvo que pudiera tener los frutos de banano. Cada 24 horas se registraron los síntomas visibles ocasionados por el frío, se tomaron fotos de los daños en los frutos y se analizaron los parámetros de fuga de electrolitos, eficiencia del fotosistema II, producción de etileno y la tasa respiratoria.

3.2.3. Evaluación de parámetros

3.2.3.1. Producción de etileno y tasa respiratoria

La evaluación de la producción de etileno y tasa respiratoria se realizó de acuerdo al método utilizado por McCollum y Mc Donald (1991) y Liu *et al.* (1999) con algunas modificaciones de acuerdo con Chiller y Lapeyre de Bellaire (2002).

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

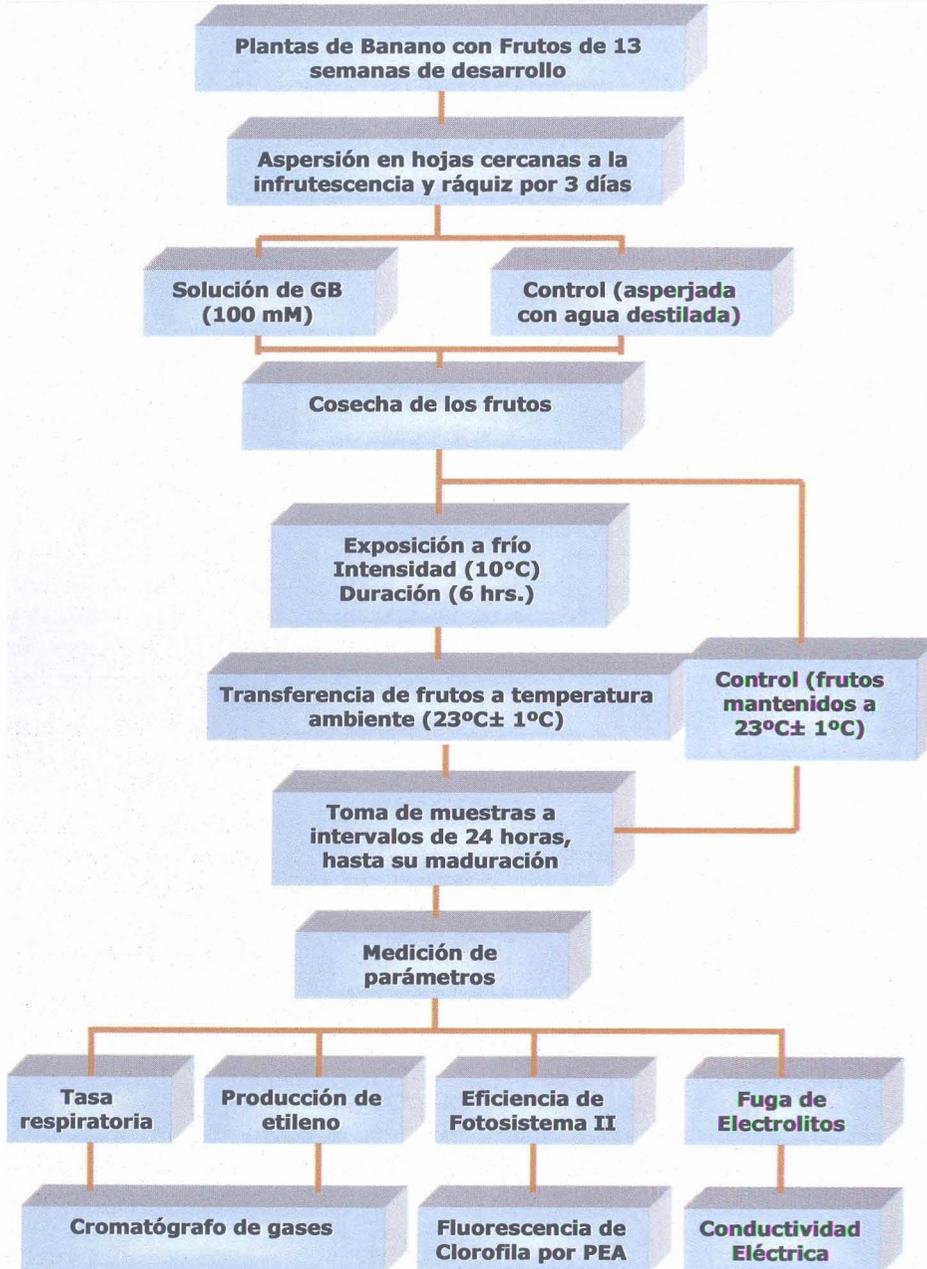


Figura 3.1. Diagrama de flujo del trabajo experimental.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

Se colocaron dos frutos en un recipiente de vidrio cuya capacidad fue de un litro, se cerró herméticamente y se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 1 hora. Esto se hizo para cada uno de los tratamientos y con tres réplicas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 3 ml de la mezcla de gases contenido en el colector y se analizaron en un cromatógrafo de gases (figura 3.2) del Instituto Tecnológico de Mérida.



Figura 3.2. Determinación por cromatografía de gases de la producción de etileno y la respiración de frutos de banana tratados con GB y frío.

El cromatógrafo de gases (Varian Star 3400 cx) posee dos detectores puestos en serie; el primero es un detector de conductividad térmica (TCD) para el CO_2 , y el segundo es un detector de ionización de flama (FID), utiliza como flama hidrógeno y aire y como gas acarreador al helio. Como patrón se utilizó una mezcla compuesta de: Bióxido de Carbono (CO_2) $5005 \mu\text{mol. Mol}^{-1}$, etileno $50 \mu\text{mol. Mol}^{-1}$ y nitrógeno. Se hizo también una curva de calibración con el patrón, utilizando 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 ml del gas estándar, para evaluar la linealidad de los compuestos en el cromatógrafo.

Los valores obtenidos del cromatógrafo fueron las áreas del pico formado a un tiempo de retención del compuesto; para el etileno fue de 1.67 min y para el CO_2 un tiempo de retención de 1.45 min. Los valores de etileno y CO_2 se obtuvieron despejando la fórmula obtenida de la linealidad de la curva de calibración. Las fórmulas usadas para los cálculos de los valores de etileno y respiración fueron los siguientes (Liu *et al.*, 1999):

$$\text{Concentración de } \text{CO}_2 \text{ de la muestra} = \frac{\text{área del pico} - 213.93}{127.23}$$

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de sionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y futrolitos

$$\text{Producción de CO}_2 = \frac{\text{Conc. de CO}_2 \times \text{Volite-Vol. de la muestra}}{\text{Vol. inyectado de la muestra} \times \text{Tiempo de h (hrs.)}}$$

$$\text{Concentración de etileno} = \frac{\text{Área del pico de muestra} \times \text{conc. del estándar}}{\text{Área de estándar}}$$

$$\text{Producción de etileno} = \frac{\text{Conc. de etileno} \times \text{Vcte-Vol. de la muestra}}{\text{Vol. inyectado de la muestra} \times \text{Tiempo ción (hrs.)}}$$

Los valores de etileno se expresaron en $\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ y la respiración en $\text{ml de CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$. Se pesó el fruto antes y después de la medición, se consideró el volumen del fruto y el tiempo de incubación.

3.2.3.2. Fuga de electrolitos

La fuga de electrolitos se midió de acuerdo a la técnica utilizada por McCollum y Mc Donald (1991) y Prohens et al, se cortó el tejido en discos de un centímetro de diámetro con un cuchillo y se colocaron 10 fragmentos en 25 ml de manitol 0.4 M, se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la conductividad eléctrica con un corómetro (Orión modelo 162) en cada una de las muestras, usando solamente la solución de manitol 0.4M y agua destilada (figura 3.3). Las muestras se esterilizaron a 121°C a 1.05 kg cm^{-2} y a 15 psi, para romper los tejidos y liberar los electrolitos. Cada tratamiento se realizó por triplicado.



Figura 3.3. Medición de fuga de electrolitos en fanano tratados con GB y frío.

Capítulo III. Papel de G₁ en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

La fuga de electrolito se estimó con el cociente de la conductividad obtenida a las veinticuatro horas de incubación entre la conductividad eléctrica total después de la esterilización multiplicado por 100, la fuga de electrolitos se expresó en porcentaje.

$$\text{Fuga de electrolitos (\%)} = \frac{\text{Conductividad eléctrica a las 24 hrs}}{\text{Conductividad eléctrica de tejido esterilizado}} \times 100$$

3.2.3.3. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm)

La eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) es un parámetro indicativo de la estabilidad e integridad del PSII, se determinó calculando la relación fluorescencia variable/fluorescencia máxima (Fv/Fm). La fluorescencia de clorofila se utilizó para evaluar el daño por frío en la capacidad fotoquímica del fotosistema II de acuerdo a la técnica utilizada por Maxwell y Johnson (2000). Esta se determinó utilizando como detector una sonda FDP/2 en un equipo analizador de eficiencia vegetal (Plant Efficiency Analyser PEA, Hansatech Instr. Ltd, Norfolk UK). Cinco frutos de banana por cada tratamiento fueron aptados en la oscuridad durante 20 minutos y posteriormente expuestos a una luz saturante por dos segundos para conocer el estado de eficiencia del fotosistema II (figura 3.4). El analizador vegetal calcula los valores de Fo (Fluorescencia basal), Fv (fluorescencia variable), Fm (fluorescencia máxima) y Fv/Fm (relación fluorescencia variable y fluorescencia máxima) que da el rendimiento cuántico óptimo del fotosistema II. Fo refleja la pérdida de una parte de la energía absorbida por las moléculas-antena antes que éstas hayan podido transferir la energía de excitación hacia los centros de reacción (Krause & Weis, 1984; Briantais *et al.*, 1986).



Figura 3.4. Medición de la fluorescencia de clorofilas con un analizador de fluorescencia vegetal (PE), en frutos de banana tratados con GB y frío.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

3.2.4. Análisis estadístico

Cada tiempo de exposición del tratamiento con GB y su respectivo control, tenía 3 manos provenientes de 3 plantas diferentes (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Número de frutos expuestos a 10 °C durante 6 horas por cada tratamiento con GB y su respectivo control.

Tratamientos con GB	No. de plantas	Tiempo de exposición (horas) a 10°C	No. de manos	No. de frutos (dedos)
Control (agua destilada)	3	0 (Control)	9	120
		6	9	126
		Total	18	246
100 mM	3	0 (Control)	9	117
		6	9	126
		Total	18	243

Los parámetros se midieron en tres frutos diferentes por día de cada tratamiento y tiempo de exposición al frío, haciendo un total de 36 frutos analizados por día. Se calcularon los promedios y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos de cada parámetro con el programa de Excel 2000. Las diferencias significativas entre los tratamientos se detectaron mediante análisis de las medias (LSD) con un nivel de confianza del 95% ($P=0.05$) en el programa StatGraphics Plus 4.1.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Síntomas visuales del efecto de frío y de la aplicación de GB

Los frutos bajo tratamiento foliar con GB y expuestos a frío tenían 13 semanas después de fructificar, los dedos de cada mano ya estaban completamente llenos, con grado de madurez tipo 1. Los frutos expuestos a frío y sin GB maduraron más rápido, presentando un grado de madurez tipo 3 al primer día después del corte. Mientras los demás frutos bajo tratamiento presentaban una tonalidad verde todavía. En la figura 3.5, se muestra los frutos bajo tratamiento con frío y GB, durante trece días de seguimiento después del corte. Se observa que los bananos que fueron expuestos a frío maduraron más rápido. Mientras que los tratados con GB y sin exposición al frío retardaron su maduración. Resultados muy similares a los obtenidos y descritos en el capítulo anterior.

A nivel subepidérmico, los síntomas de pardeamiento comienzan a aparecer al tercer día después de la exposición al frío en aquellos frutos sin GB (figura 3.6). En los otros tratamientos no se observaron diferencias marcadas. La figura 3.6 muestra la epidermis de los bananos bajo tratamiento con GB y frío, durante los 13 días de seguimiento después del corte. Los frutos mantenidos durante 6 horas a 10°C, tanto los tratados con GB y su control presentan manchas subepidérmicas a los tres días después del corte. Mientras los frutos mantenidos a temperatura ambiente (23±1°C) no presentaron estas manchas.

3.3.2. Cambios fisiológicos durante la maduración del banano

3.3.2.1. Respiración y Producción de Etileno

El banano es una fruta climatérica, en el panel A de la figura 3.7 se muestra la relación de etileno y la respiración durante el proceso de maduración normal (mantenida a 23±1°C) del fruto de banano después de corte. Los frutos alcanzaron una madurez entre grado 6 y 7 a los 9 días después del corte. Se observó al quinto día un incremento de hasta 30.65 ml CO₂ kg⁻¹.hr⁻¹ y alcanzó un máximo al noveno día después del corte (95.61 ml CO₂ kg⁻¹.hr⁻¹). La producción de etileno, se mantuvo sin cambio hasta el día 7 y

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de dañados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga rolitos

alcanzó un máximo de $8.24 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$ hr veno día después del corte (panel A de la figura 3.7).

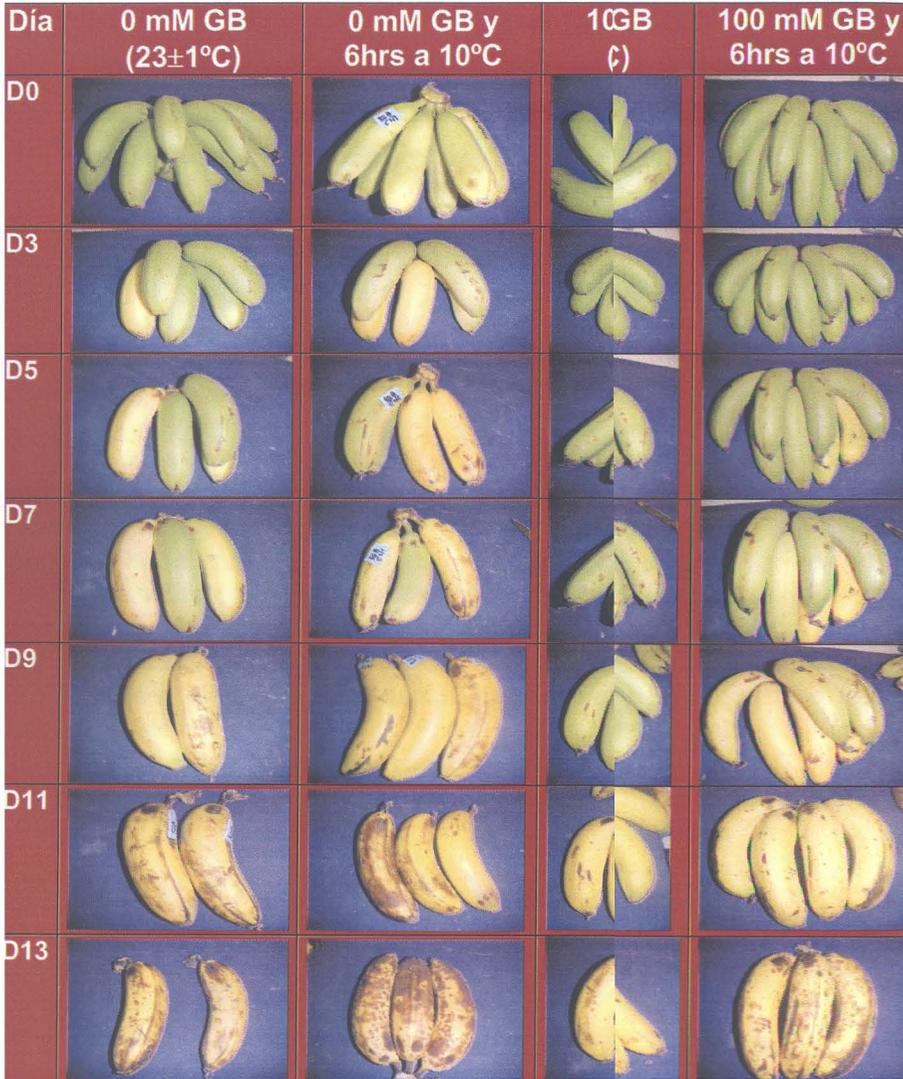


Figura 3.5. Seguimiento de la maduración de frutano bajo tratamiento con GB y frío. Las columnas representan los tratarcon GB (0 y 100 mM) y el tiempo de exposición a temperaturas de 23°C (6 hrs a 10°C), las filas representan los días después del corte.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

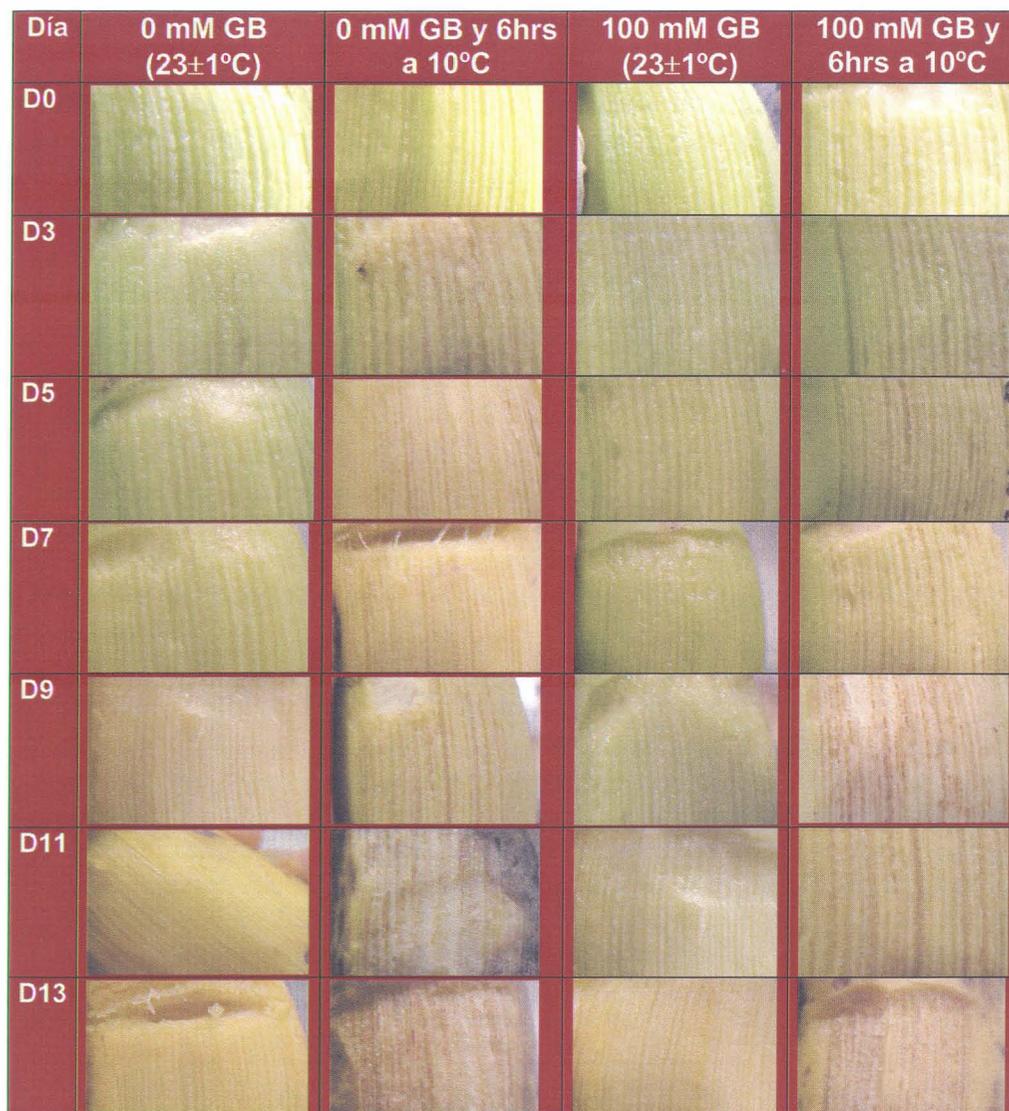


Figura 3.6. Seguimiento subepidérmico del efecto de GB y frío en frutos de banana durante trece días después del corte. Las columnas indican las concentraciones de GB (0 y 100 mM de GB) y el tiempo de exposición a temperatura ambiente (23°C) o a frío (6 horas a 10°C) y las filas los días después del corte.

3.3.2.2. Fuga de electrolitos y eficiencia fotoquímica del fotosistema II

El panel B de la figura 3.7, muestra la relación de la fuga de electrolitos y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m), en los frutos de banano mantenidos a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. El comportamiento de fuga de electrolitos en la epidermis de banano durante la maduración, mostró un mayor porcentaje de fuga al séptimo día cuando el fruto empezó a madurar, con un valor del 32.3%, en un estado ya sobremaduro del fruto la fuga fue mayor al 50%.

El comportamiento de la Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) mostró una eficiencia de 0.725 a 0.8435 durante los primeros 6 días. No obstante, cuando inició la maduración la eficiencia del fotosistema II disminuyó de manera gradual, debido a la degradación de las clorofilas durante la maduración (de 0.6305 a 0.2945).

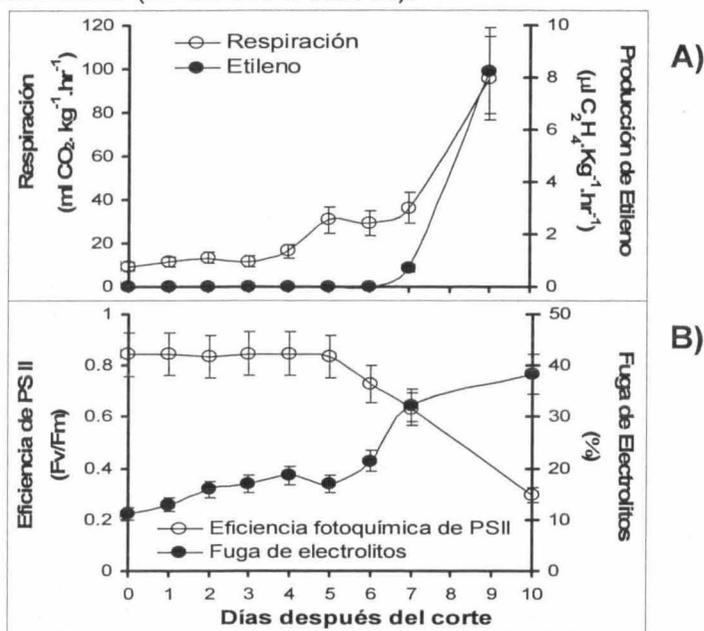


Figura 3.7. Cambios fisiológicos en la epidermis durante la maduración del fruto de banano, variedad enano gigante. A) Respiración y producción de etileno, B) Eficiencia fotoquímica del fotosistema II y fuga de electrolitos. (n=5 ± SD).

3.3.3. Cambios fisiológicos durante el desarrollo del daño por frío en banano

3.3.3.1. Respiración

El panel A de la figura 3.8, muestra el comportamiento de la respiración de los frutos durante su maduración después de que fueron separados de la planta y de que estuvieron bajo tratamiento con frío (6 horas a 10°C). Se observó que durante los primeros cuatro días, la concentración de CO₂ se mantuvo entre 9.38 a 16.32 ml CO₂.kg⁻¹.hr⁻¹, y al quinto día aumentó hasta 30.65 ml CO₂.kg⁻¹.hr⁻¹. En los días posteriores la concentración de CO₂ se mantuvo alrededor de este valor hasta el día 8, los valores máximo registrados fueron de 95.61 ml CO₂.kg⁻¹.hr⁻¹ durante el día 9.

La respiración en los frutos expuestos a frío, mantuvo un comportamiento similar al control durante los primeros 4 días (9.06 a 16.66 ml CO₂.kg⁻¹.hr⁻¹) y al noveno día la respiración se incrementó hasta 49.29 ml CO₂.kg⁻¹.hr⁻¹. Los frutos expuestos a frío redujeron su respiración en un 51.5% con respecto al control. Hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

3.3.3.2. Producción de etileno

La figura 3.8 panel B muestra el comportamiento de la producción de etileno en los frutos tratados con frío. Se observó que el frío adelantaba la producción de etileno (3.75 μl C₂H₄.kg⁻¹.hr⁻¹) al tercer día después del corte, lo que quizá provocó la maduración prematura del fruto con respecto al control la cual registró una producción de etileno de 8.24 μl C₂H₄.kg⁻¹.hr⁻¹ en el día nueve después del corte. La producción máxima de etileno en los frutos expuestos a frío representaron apenas el 45.51% de la registrada en los frutos control, esto pudieron haber afectado la maduración normal de los frutos.

La producción temprana de etileno en los frutos bajo estrés por frío quizá fue una respuesta del estrés a la cual fueron sometidos, y la producción de etileno para la maduración quedó afectada, por lo que los frutos perdieron la habilidad de madurar. Estadísticamente hubo diferencias significativas entre tratamientos.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

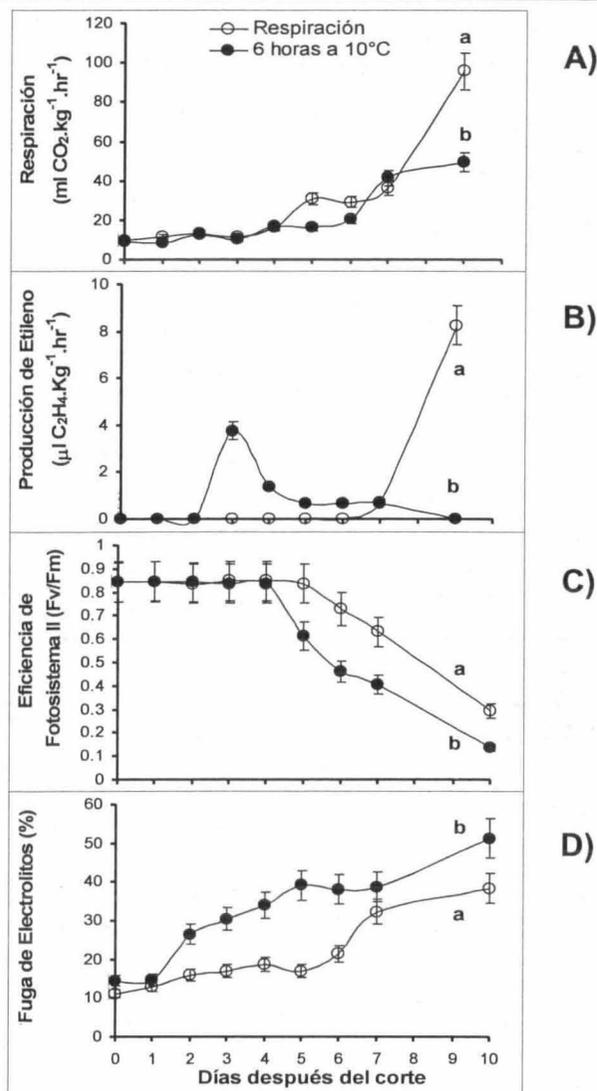


Figura 3.8. Efecto del frío en los parámetros fisiológicos de la parte epidérmica del banano. A) Respiración, B) Producción de etileno, C) Eficiencia fotoquímica del fotosistema II y D) Fuga de electrolitos. (P=0.05, cada punto es el promedio de n=5 ± SD). (○) Control (23±1°C), (●) Expuestos a frío 6 horas a 10°C. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

3.3.3.3. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II

La eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) de los frutos de banano es mostrada en el panel C de la figura 3.8. En dicha gráfica se muestra que la eficiencia de fotosistema II (F_v/F_m) se redujo de manera rápida, cuando los frutos fueron expuestos a una temperatura de 10°C durante 6 horas. Durante los primeros cuatro días, la eficiencia del fotosistema II se mantuvo constante con valores de entre 0.83 y 0.84 en los frutos expuestos a frío. En el quinto día, la eficiencia del fotosistema II decayó de manera rápida (de 0.61 a 0.4) a comparación con el control (de 0.83 a 0.63). Aunque ya por efecto de maduración la eficiencia del fotosistema disminuyó en los frutos control (0.2945 en el día 10 después del corte). Estadísticamente hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control.

3.3.3.4. Fuga de electrolitos

En lo que respecta a la integridad de la membrana, los frutos de banano expuestos a frío, sufren modificaciones en la estructura de la membrana y esto se pudo comprobar con la fuga de electrolitos (figura 3.8, panel D). Los frutos de banano expuestos a frío presentaron mayor fuga de electrolitos (26.43%) en el segundo día con respecto al control (15.92%) lo cual representó un incremento de fuga del 66%. Los frutos expuestos a frío presentaron valores de fuga mayores al 50%, debido a la sobre maduración de los frutos. Hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

3.3.4. Efecto de GB en los desórdenes fisiológicos ocasionados por frío en frutos de banano.

3.3.4.1. Respiración

En la figura 3.9, se muestra el efecto de GB en el proceso de respiración y producción de etileno en frutos de banano variedad Enano Gigante bajo tratamiento con frío. Los frutos que fueron tratados con GB presentaron una respiración máxima de 94.93 ml $\text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ en el control, mientras los frutos expuestos a frío registraron una producción del 75.61 ml $\text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ en el día 9 después del corte. Como se pudo observar los valores registrados para los frutos tratados con GB fueron muy similares a los del control. Pero cuando los frutos estuvieron expuestos a frío y fueron tratados con GB tuvieron un incremento de la respiración del 53.38 % con respecto

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

a los frutos que fueron expuestos a frío pero sin GB. Estadísticamente hubo diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

GB quizá estuvo protegiendo las proteínas involucradas en el proceso respiratorio, porque cuando hubo daño por frío este parámetro disminuyó. Sin embargo cuando los frutos fueron tratados con GB y bajo estrés por baja temperatura, la respiración se mantuvo en niveles parecidos al control (Panel A de la figura 3.9).

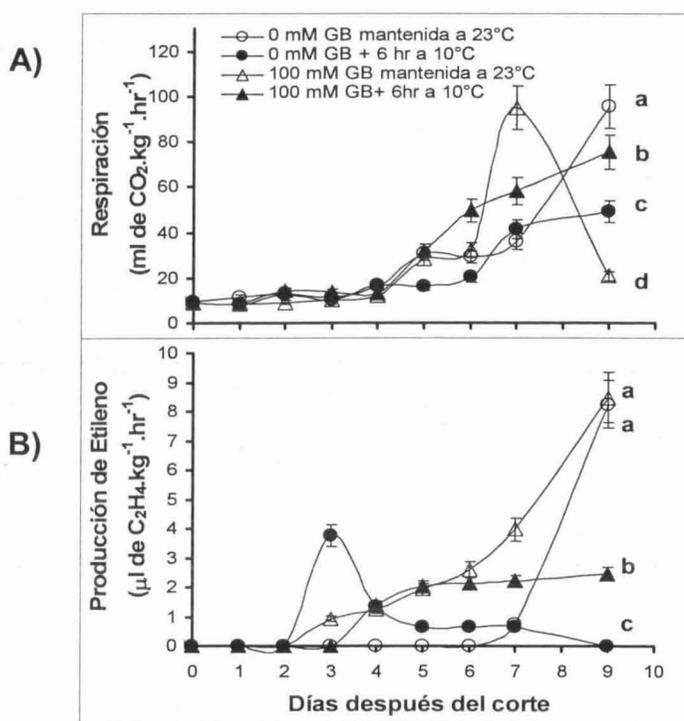


Figura 3.9. Efecto de GB en algunos parámetros fisiológicos de la epidermis de banana variedad enano gigante durante su maduración y exposición a frío. A) Respiración, B) Producción de etileno. ($P=0.05$, cada punto es el promedio de $n=5 \pm SD$). (○) 0 mM GB mantenido a 23°C, (●) 0 mM GB a 6 horas a 10°C, (△) 100 mM GB mantenidas a 23°C, (▲) 100 mM GB a 6 horas a 10°C. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

3.3.4.2. Producción de etileno

El panel B de la figura 3.9, muestra los valores de producción de etileno de los frutos tratados con GB y también de aquellos que fueron expuestos a frío. La producción de etileno en los frutos sin GB y mantenidos a una temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ presentaron valores máximos de $8.24 \mu\text{l de C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ en el día 9. Mientras en los frutos expuestos a frío y sin GB la producción de etileno se adelantó, presentado valores máximos de $3.75 \mu\text{l de C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ al tercer día. Cuando fueron tratados con GB, la producción de etileno tuvo valores máximos de $8.48 \mu\text{l de C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ al día 9 después del corte, mientras que en los frutos expuestos a frío los valores máximos registrados fueron de $2.46 \mu\text{l de C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ al día 9 después del corte. Hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con GB y frío. Este resultado indica que el frío está acelerando la maduración de los frutos, produciendo cantidades de etileno durante los primeros días después del corte, lo que pudo estar provocando una maduración irregular del fruto. Con GB este efecto se atenuó, presentado valores aún por debajo del control.

3.3.4.3. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II

En la figura 3.10 se muestra el efecto de GB y del frío en la eficiencia del fotosistema II medida como la razón de F_v/F_m y la fuga de electrolitos en la epidermis de frutos de banano variedad Enano Gigante. El panel A de la figura 3.10, muestra el seguimiento de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, se observó que el frío ocasiona daño a éste nivel (fotosistema II), reduciendo la eficiencia de 0.84 a 0.137 a comparación con el control (0.84 a 0.29), la cual fue decayendo de manera gradual por efecto de la maduración hasta el séptimo día (0.84 a 0.63).

Cuando los frutos fueron tratados con GB presentaron mayor eficiencia del fotosistema II (0.81 a 0.76) a los 7 días después del corte en comparación con el control (0.84 a 0.63). En frutos expuestos a frío, la eficiencia se redujo de 0.82 a 0.53, estos valores se mantuvieron bajo condiciones similares a las registradas en bananos sin GB y sin frío (0.84 a 0.63). Esto sugiere que GB estuvo protegiendo a este nivel, por lo cual el daño en el fotosistema II no ocurrió. Estos datos concuerdan con los valores del contenido de clorofilas, la degradación de clorofilas y carotenoides fue menor cuando se aplicó GB. Además GB mantuvo por más tiempo la eficiencia del fotosistema II (F_v/F_m), inclusive mejorando los valores

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

registrados en el control. Se observó que conforme avanza el proceso de maduración del fruto la fluorescencia disminuyó.

3.3.4.4. Fuga de electrolitos

El panel B de la figura 3.10, muestra el efecto de GB en la fuga de electrolitos, se observó que cuando los frutos fueron expuestos a frío hubo un mayor porcentaje de fuga de electrolitos hasta 51.2% con respecto al control con 38.35%, lo cual nos indicó que hubo daño a nivel de la integridad de la membrana.

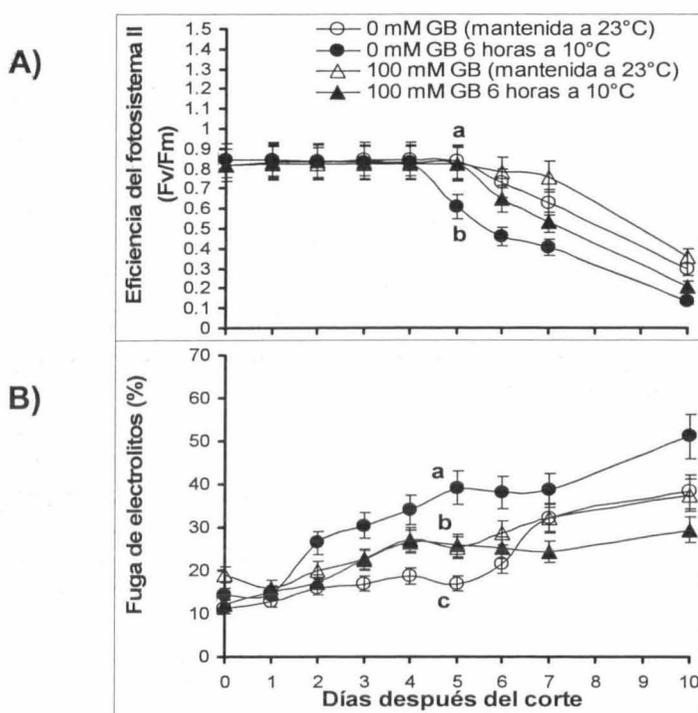


Figura 3.10. Efecto de GB en el desarrollo del daño por frío con respecto a la eficiencia del fotosistema II y la fuga de electrolitos en la epidermis de banano. A) Eficiencia fotoquímica del fotosistema II, B) Fuga de electrolitos. ($P=0.05$, cada punto es el promedio de $n=5 \pm SD$). (○) 0 mM GB mantenidas a 23°C, (●) 0 mM GB a 6 horas a 10°C, (△) 100 mM GB mantenidas a 23°C, (▲) 100 mM GB a 6 horas a 10°C. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

Cuando se aplicó GB y los frutos fueron expuestos a frío, la fuga de electrolitos fue menor (hasta 29.45%) comparado con el control (37.56%). Los valores del control fueron muy parecidos a los registrados en aquellos frutos mantenidos a temperatura de 23°C y sin GB. Esto sugiere que GB estaba protegiendo la integridad de la membrana cuando los frutos estuvieron bajo estrés por baja temperatura. Hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con frío, mientras que no hubo diferencias significativas entre los frutos tratados con GB.

3.4. DISCUSIÓN

Ante el estrés por frío, el fotosistema II es uno de los componentes más vulnerable del aparato fotosintético (Anderson & Baber, 1996). Diversos estudios sugieren que el estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas pueden reducir la eficiencia del fotosistema II, aumentando la degradación de la proteína D1 e interfiriendo en la fosforilación del PSII (Giardi *et al.*, 1996; Makela *et al.*, 1999). La eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) es utilizada como indicador del funcionamiento fotosintético de las plantas (Maxwell & Jonson, 2000) y representa una medida del estatus de la funcionalidad del complejo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, el frío produce ciertas alteraciones fisiológicas en los frutos de banano, dado que hubo daño en el mecanismo fotosintético y afecto al fotosistema II y esto se reflejó en una caída rápida en la eficiencia del transporte electrónico de este fotosistema (F_m/F_v) el cual se redujo de 0.8425 a 0.137. Estos resultados indican que posiblemente existe un daño en el transporte de electrones del fotosistema II y esto afecta a la fotosíntesis. No sabemos si este problema se da a nivel de daño en la función de una proteína que conforma el centro de reacción del fotosistema II (D1), pero esta proteína es muy susceptible cuando hay una baja de temperatura.

La aplicación de GB tuvo un efecto protector en la estructura y función del complejo del PSII. El incremento de los valores de F_v/F_m en los frutos de banano tratados con GB, bajo condiciones de estrés por frío, indica que la aplicación de GB reduce la fotoinhibición causada por frío, resultados muy similares a los obtenidos por Allard y colaboradores (1998), quienes encontraron que la aplicación de GB previene la fotoinhibición causado por congelamiento en trigo.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

Además, plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Alia *et al.*, 1999), tabaco (Holmstron *et al.*, 2000), *Zea maiz* (Quan *et al.*, 2004) y *Brassicca juncea* (Prasad & Pardha Saradhi, 2004) que expresaron genes para COD, CDH/BADH, CDH o COD respectivamente, también mantienen valores altos de Fv/Fm en comparación con sus respectivos controles cuando están sujetas a foto inhibición causados por alta radiación combinado con estrés por salinidad y baja temperatura.

Por otra parte el efecto protector de GB en el complejo PSII contra los diferentes tipos de estrés ha sido bien establecido in Vitro. (Mamedov *et al.*, 1991; Mamedov *et al.*, 1993; Papageorgiou & Murata, 1995; Allakhverdiev *et al.*, 2003).

Una de las corrientes más aceptadas del daño por frío, son las modificaciones en las propiedades de la membrana sobreviniendo la fuga de electrolitos en tejidos dañados (King & Ludford, 1983; Autio & Bramlage, 1986; Woods *et al.*, 1991). La fuga de electrolitos es un parámetro que mide indirectamente la permeabilidad de la membrana, pues mide la fuga de iones de los compartimentos membranales hacia el exterior, y cuando mayor es el porcentaje de pérdida es mayor la permeabilidad de la membrana de acuerdo a Wills y colaboradores (1984).

Los resultados obtenidos con respecto a la fuga de electrolitos, muestran que aumentó el porcentaje de fuga de electrolitos cuando los frutos de banano estuvieron expuestos a frío coincidiendo con las observaciones de otros autores (King & Ludford, 1983; Autio & Bramlage, 1986; Woods *et al.*, 1991). La aplicación de GB quizá tuvo acción a nivel de ajuste osmótico, factor que permitió estabilizar las membranas presentando una reducción en la fuga de electrolitos de 42.4%, por lo que no se desencadenaron los disturbios metabólicos ocasionados por frío.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Nayyar y colaboradores (2005), quienes trabajaron con plantas de garbanzo sujetas a estrés por frío (12-14/3-5°C), a las cuales aplicaron 1mM de GB durante tres días consecutivos, observando que los síntomas del daño por frío en las plantas de garbanzo se minimizaron, la fuga de electrolitos se redujo un 63%, mientras la respiración se incremento en un 69%. Mencionan que la tolerancia al frío inducido por GB esta relacionado con el alto contenido de agua, a las clorofilas y sacarosa y a la reducción del ácido abscísico así como de las especies activas de oxígeno.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

En condiciones de estrés por frío, la tasa de producción de etileno y CO₂ usualmente se incrementan (Lyons & Breidenbach, 1990; Field, 1990; Leshem & Kadish, 1992). La respiración normalmente declina en frutos cosechados, pero cuando son expuestos a frío, esta se incrementa por la ruta alternativa en respuesta al frío (Moynihan *et al.*, 1995). Algunos tejidos como los de peras y melones, aceleran la producción de etileno durante el estrés por frío (Wang & Adams, 1982). Los daños producidos por este estrés se dan quizá porque las proteínas asociadas a la membrana, incluyendo los receptores de etileno, y enzimas involucradas en la fotosíntesis y respiración, pierden su función (Mc Collum & Mc Donald, 1991; Fluhr & Mattoo, 1996; Marangoni *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en la presente tesis con respecto a la producción de etileno y respiración, muestran que en frutos expuestos a frío la respiración disminuyó en un 48.43 % con respecto al control. Mientras la producción de etileno se adelantó provocando la maduración temprana del fruto. Estos desórdenes en el metabolismo del fruto coinciden con las observaciones hechas por Lyons (1973) y Levitt (1980). De acuerdo a Jiang y colaboradores (2004), las lesiones por frío en frutos almacenados a bajas temperaturas, son debido a la reducción de la habilidad del tejido de responder al etileno, lo cual aumenta los síntomas del daño por frío y repercute en una maduración anormal del fruto, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Los resultados favorables de la aplicación de GB, han enfocado al estudio de este mecanismo que tienen algunas plantas para aclimatarse ante condiciones ambientales desfavorables. (Rhodes & Hanson, 1993; Hare *et al.*, 1998; Bohnert & Shen, 1999; Sakamoto & Murata, 2002). El trigo por ejemplo, es un acumulador natural de GB, y aplicado exógenamente incrementa la concentración de GB en las células (Makela *et al.*, 1996; Rajasekaran *et al.*, 1997; Allard *et al.*, 1998). El incremento de la concentración de GB en plantas pretratadas, sugiere que la aplicación foliar de GB puede ser absorbido por plantas cultivadas (Makela *et al.*, 1996). Los datos obtenidos en la presente tesis sugieren que GB no solo puede proteger a plantas de clima templado, sino también plantas tropicales como banano que tiene una diferencia en la composición de ácidos grasos en sus membranas.

3.5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- La exposición de frutos de banano al frío durante postcosecha parece ocasionar daños en la membrana, lo que desencadena una serie de disturbios como la caída rápida de Fv/Fm, incremento de la fuga de electrolitos, aceleración de la producción de etileno y una reducción en la respiración.
- La aplicación foliar de GB en precosecha atenúa los efectos del daño por frío en frutos, tal vez protegiendo la integridad de la membrana lo que reduce la caída de la fuga de electrolitos y atenúa la caída de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II.
- La aplicación foliar de GB atenúa la caída de la respiración e impide la maduración acelerada al no presentarse un pico de etileno temprano como ocurre en frutos bajo estrés por baja temperatura.
- La aplicación precosecha de GB en cultivares de banano, independientemente de su efecto protector de daños por frío, podría utilizarse para prolongar la vida de anaquel de frutos de banano en su manejo postcosecha.

3.6. LITERATURA CITADA

- Alia Kondo Y., Sakamoto A., Nonaka H., Hayashi H., Pardha Sarashi P., Chen THH., and Murata N. (1999). Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase. *Plant Mol Biol.* **40**: 279–288.
- Allakhverdiev S.I., Hayashi H., Nishiyama Y., Ivanov A.G., Aliev J.A., Klimov V.V., Murata N., and Carpentier R. (2003). Glycinebetaine protects the D1/D2/Cytb559 complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation. *J Plant Physiol.* **160**: 41–49.
- Allard F., Houde M., Krol M., Ivanov A., Huner N. P.A., and Sharn F. (1998). Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* **39**: 1194–1202.
- Anderson B., and Barber J. (1996). Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: N.R. Baker (Ed). *Photosynthesis and the environment: advance in photosynthesis research*. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 102–121 pp.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

- Artés F., y Artés-Hernández F. (2003). Daño por frío en la postrecolección de frutas y hortalizas. En: Avances de la Ciencia y Técnicas de Frío-1. López A., Espinoza A., y Artés F. (Eds). Universidad de Murcia. Murcia, España. 299-310 pp.
- Autio W.R., and Bramlage W.J. (1986). Chilling sensitivity of tomato fruit in relation to ripening and senescence. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **111**:201-204.
- Ayora A., Sairam R.K., and Srivastava G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Curr. Sci.* **82**:1227-12382.
- Banacol (2004). Grados de madurez del Banano [en línea]. <http://www.banacol.com/espanol/productosBanano.html>. (Consultado: 3 de marzo de 2005).
- Bohnert H.J., and Shen B. (1999). Transformation and compatible solutes. *Sci Hort.* **78**: 237–260 pp.
- Briantais J.M., Vernet C., Krause G.H., y Weis E. (1986). Chlorophyll fluorescence of higher plant chloroplasts and leaves. In: J.A. Govindjee y D.C. Fork (Eds). Light emission by plants and photosynthetic bacteria. 539-577 pp.
- Chillet M., and Lapeyre de Bellaire L. (2002). Variability in the production of wound ethylene in bananas from the French West Indies. *Sci. Hort.* **96**:127-137.
- Dadzie B.K., y Orchard J.E. (1997). Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. *Guías Técnica Inibap*. El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. 63 p.
- Field R.J. (1990). Influence of chilling stress on ethylene production. In: Ed. C.Y. Wang. *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press. Boca Raton. 235-253 pp.
- Fluhr R., any Mattoo A.k. (1996). Ethylene biosynthesis and perception. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **15**:479-523.
- Giardi M.T., Cona A., Geiken B., Kucera T., Masojidek J., and Mattoo A.K. (1996). Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta.* **199**: 118–125.
- Hare P.D., Cress W.A., and Staten V.J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* **21**: 535–553.
- Holmström K.-O., Somersalo S., Mandal A., Palva T.E., and Welin B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycinebetaine. *J. Exp Bot.* **51**: 177–185.
- Jiang Y., Joyce D.C., Jiang W., and Lu W. (2004). Effect of chilling injury on ethylene binding by banana fruit. *Plant Growth Regul.* **43**: 109-115.
- King M.M., and Ludford P.M. (1983). Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of difference tomato cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **108**: 74-77.
- Krause G.H., and Weis E. (1984). Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II Interpretation of the fluorescence signals. *Photosynth. Research.* **5**: 139-157.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

- Leshem Y.Y., and Kadish D. (1992). Membrane related effects of chilling stress on ethylene production in green peppers stored at 4°C as compared to 17°C (shelf temperature). *Res. Report, U.S.-Israel, BARD Foundation*. 1-23 pp.
- Levitt J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. I. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Second Edition. Academic Press, New York. 1. 497 p.
- Liu X., Shiomi S., Nakatsuka A., Kubo Y., Nakamura R., and Inaba A. (1999). Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. *Plant Physiol.* **121**:1257-1265.
- Lyons J.M. 1973. Chilling Injury in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**:445-466.
- Lyons J.M., and Breidenbach R.W. (1990). Relation of chilling stress to respiration. In: Ed. C.Y. Wang. *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press. Boca Raton. 223-233. pp.
- Ma Q-Q., Wang W., Li Y-H., Li D-Q., Zou Q. (2006). Alleviation of fotoinhibition in drought-stressed weat (*Triticum aestivum*) bay foliar-applied glycinebetaine. *J. Plant Physiol.* **163** (2): 165-175.
- Makela P, Peltonen-Sainio P, Jokinen K, Pehu E, Setala H, Hinkkanen R, Somersalo S. (1996). Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Sci.* **121** (2): 221-230.
- Mäkelä P., Kontturi M., Pehu E., and Somersalo S. (1999). Photosynthetic response of drought- and salt-stressed tomato and turnip rape plants to foliar-applied glycinebetaine. *Physiol Plant.* **105**: 45–50.
- Mamedov M.D., Hayashi H., and Murata N. (1993). Effects of glycinebetaine and unsaturation of membrane lipids on heat stability of photosynthetic electron-transport and phosphorylation reactions in *Synechocystis* PCC6803. *Biochim Biophys Acta.* **1142**: 1–5.
- Mamedov M.D., Hayashi H., Wada H., Mohanty P.S., Papagergiou G.C., and Murata N. (1991). Glycinebetaine enhances and stabilized the evolution of oxygen and the synthesis of ATP by cyanobacterial thylakoid membranes. *FEBS Lett.* **294**: 271–274.
- Marangoni A.G., Palma T., and Sanley D.W. (1996). Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biol. Technol.* **7**: 193-217.
- Maxwell K., and Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot.* **51**: 659–668.
- Mc Collum T.G., and Mc Donald R.E. (1991). Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indice of chilling injury in grapefruit. *Hortsc.* **26**(9):1191-1192.
- Moynihan M. R., Ordentlich A., and Raskin I. (1995). Chilling-induced heat evolution in plants. *Plant Physiol* **108**: 995-999
- Nayyar H., Chander K., Kumar S., and Bains T. (2005). Glycine betaine mitigates cold stress damage in chickpea. *Sciense.* **25** (3):381-388.
- Nilsen E. T., and Orcutt D. M. (1996). The physiology of plants under stress abiotic factors. *Jonh Wiley & Sons Inc.* United States of America. 486-514 pp.

Capítulo III. Papel de GB en el desarrollo de daños ocasionados por frío: efectos en respiración, etileno, eficiencia del PSII y fuga de electrolitos

- Papageorgiou G.C., and Murata N. (1995). The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth Res.* **44**: 243–252.
- Prasad K.V.S.K., and Pardha Saradhi P. (2004). Enhance tolerance to photoinhibition in transgenic plants through targeting of glycinebetaine biosynthesis into chloroplasts. *Plant Sci.* **166**: 1197–1212.
- Prohens J., Miró R., Rodríguez-Burruezo A., Chiva S., Verdú G., and Nuez F. (2004). Temperature, electrolyte, ascorbic acid content and sunscald in two cultivars of pepino, *Solanum muricatum*. *J. Hort. Sci. and Biotechnol.* **79**(3): 375-379.
- Quan R., Shang M., Zhang H., Zhao Y., and Zhang J. (2004). Improved chilling tolerance by transformation with *betA* gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. *Plant Sci.* **166**: 141–149.
- Rajasekaran L.R., Kriedemann P.E., Aspinall D., and Paleg L.G. (1997). Physiological significance of proline and glycinebetaine maintaining photosynthesis during NaCl stress in wheat. *Photosyn.* **34**: 357–366.
- Rhodes D., and Hanson A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **44**: 357–384.
- Sakamoto A., and Murata N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environ.* **25**: 163-171.
- Sakamoto A., Murata A., and Murata N. (1998). Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol Biol.* **38**: 1011–1019.
- Salunkhe D.K., and Desai B.B. (1984). Posharvest Biotechnology of fruits. Library of Congress. Floride, United State. I: 43-58.
- Santoro M. M., Liu Y., Khan S. M. A., Hou L. X., and Bolen D. W. (1992). Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochem.* **31**:5278–5283.
- Sharom M., Willemot C., and Thompson J.E. (1994). Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. *Plant Physiol.* **105**: 305-308.
- Wang C.Y., and Adams D.O. (1982). Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativa* L.). *Plant Physiol.* **69**: 424-427.
- Wills R., Lee T., McGlasson B. y Graham D. (1984). Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas postcosecha. Ed. Acriba. Zaragoza (España). 195 p.
- Wood F.M., Garner J.O., Silva J.L. Phromtong C. (1991). Estimation of chilling sensitivity in leaves of sweet potato by chlorophyll fluorescence and electrolyte leakage. *Phyton.* **52**: 33-37.
- Wyn R.G., Jones, Storey R., and Leigh P.A. (1977). A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: E. Marre and Ciferri (Eds). *Regulation of cell membrane activities in higher plants*. Amsterdam. Elsevier . 121–136 pp.
- Xing W., and Rajashekar C.B. (1999). Alleviation of water stress in beans by exogenous glycinebetaine. *Plant Sci.* **148**: 185–195.

Capítulo IV. Discusión general

4.1. CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS OCASIONADOS POR FRÍO EN BANANO.

En el presente trabajo se caracterizaron cuáles son los problemas fisiológicos y bioquímicos que presentan los frutos de banano bajo estrés por frío, midiendo los parámetros de fenoles solubles, proteínas solubles, clorofilas y carotenoides, actividad enzimática de la PPO, eficiencia fotoquímica del fotosistema II, fuga de electrolitos, producción de etileno y respiración en la epidermis de banano, *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) "Enano Gigante".

Los resultados obtenidos muestran que la variedad enano gigante sufre daño al estar expuesto a frío (10°C) por un tiempo mayor a las 4 horas, manifestándose ciertos desórdenes que se visualizan en una maduración irregular, aceleración de la maduración, pardeamiento epidérmico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Morelli y colaboradores (2003), quienes trabajaron con cinco variedades diferentes de banano a nivel de postcosecha. Ellos encontraron que la mayoría de las variedades estudiadas toleraban la exposición a 10°C hasta por 3 días. Sin embargo, en este trabajo se muestra que el daño puede presentarse, en el caso de la variedad enano gigante, con solo 6 horas de exposición a 10°C, los síntomas no son visibles al momento, pero si se manifiestan durante su maduración.

La disminución de la temperatura en plantas sensibles, como las tropicales y especialmente banano, ocasiona trastornos fisiológicos y bioquímicos (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Sanlukhe & Desai, 1984). Esto se debe principalmente a cambios en las propiedades de la membrana que pasa de un estado líquido a una fase gel (Raison *et al.*, 1979; Levitt, 1980; Taiz & Zeiger, 1991), afectando la función de proteínas que se encuentran asociadas a membranas, principalmente las mitocondriales y cloroplásticas, ocasionando disturbios metabólicos como la reducción en la fotosíntesis, lo cual se ve reflejado en un menor crecimiento (Fitter & Hay, 1987).

Algunos autores mencionan que esta reducción de la fotosíntesis, se debe a que la maquinaria fotosintética es afectada por el estrés por frío, principalmente se daña las proteínas que integran los centros activos del fotosistema I y II (Lyons, 1973; Nielsen & Orcutt, 1996; Makela *et al.*, 1999; Ayora *et al.*, 2002). Al verse afectada esta maquinaria se produce un estrés oxidativo, generando especies activas de oxígeno (AOS) y especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que ocasiona disturbios en el metabolismo de la planta (Levitt, 1980; Foyer *et al.*, 2002).

La producción de etileno, hormona asociada al proceso de maduración y senescencia de frutos, se ve favorecida cuando hay estrés por frío. Se menciona también que hay mayor degradación de clorofilas y carotenoides, degradación de proteínas entre otros trastornos bioquímicos y fisiológicos (Levitt, 1980). Aunque también por el efecto de la maduración se ponen de manifiesto factores que provocan la degradación de la clorofila, lo que se puede observar en el cambio de color del fruto de una tonalidad verde a una amarillo por el efecto de la maduración (Dadzie & Orchard, 1997). Estos disturbios en el metabolismo de la planta, dependen mucho de la intensidad y duración de la baja temperatura, la especie y del estado fenológico de la planta (Sanlukhe & Desai, 1984).

El banano, siendo una planta tropical, bajo ciertas circunstancias sufre problemas de daños por frío, al bajar la temperatura por debajo de su punto crítico de desarrollo que suele ser entre los 10 a 12°C (Dadzie & Orchard, 1997; Sanlukhe & Desai, 1984), sufriendo alteraciones en los frutos como es el pardeamiento, lo que baja su calidad en el mercado, ocasionando pérdidas al productor (Sánchez, 2004).

Uno de los daños por frío manifestado fue el pardeamiento de los frutos, este pardeamiento de la epidermis y subepidermis se debe a la acción de enzimas como la peroxidasa y la polifenol oxidasa (Gooding *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004), que actúan sobre sus sustratos fenólicos, los cuales se oxidan hasta formar compuestos sumamente inestables, que se polimerizan generando pigmentos pardos en la epidermis (Gooding *et al.*, 2001).

Los resultados del presente trabajo muestran que la actividad de PPO de la epidermis de banano se incrementa durante los primeros días después del corte durante la maduración y al estar expuesto a frío. Esto es, mantienen un mismo comportamiento durante la maduración del fruto, aunque la

actividad presentada por los frutos expuestos a frío presenta un pico mayor dependiendo del tiempo de exposición a este tipo de estrés.

Estos resultados coinciden con los descritos por Gooding y colaboradores (2001), en los cuales encontraron que la actividad de la enzima polifenol oxidasa ocurrió durante los primeros días de la maduración y los frutos maduros presentaban una actividad nula o baja en condiciones normales.

Cuando los frutos se expusieron a frío se observó que la actividad de la PPO se incrementó y se redujo el contenido de fenoles, estos resultados son similares a los datos obtenidos por Nguyen y colaboradores (2003), quienes trabajaron bananos Kluai Khai y Kluai Hom Tom expuestos a temperaturas frías de 6 y 10°C, concluyendo que la baja temperatura indujo la actividad de la PPO sobre los fenoles ocasionando mayor pardeamiento del fruto.

Este grado de pardeamiento se debe en gran medida a que el frío induce una mayor permeabilidad de la membrana poniendo en contacto a la PPO, una enzima que se encuentra asociada a membrana interna del cloroplasto, con su sustrato: Esto se pudo comprobar con los resultados de la fuga de electrolitos, un parámetro que mide indirectamente la permeabilidad de la membrana, pues mide la fuga de iones de los compartimentos membranales hacia el exterior, y cuando mayor es el porcentaje de pérdida es mayor la permeabilidad de la membrana (King & Ludford, 1983; Wills *et al.*, 1984; Autio & Bramlage, 1986; Woods *et al.*, 1991).

En forma similar con la fuga de electrolitos aumenta durante la maduración y es dos veces mayor cuando los frutos de banano fueron expuestos a frío de hasta un 55% de fuga de electrolitos. Esto comprueba que el frío daña la integridad de la membrana, aumentando la permeabilidad de ésta, coincidiendo con las observaciones de otros autores como King y Ludford (1983), Autio y Bramlage (1986) y Woods y colaboradores (1991).

Con respecto a las proteínas solubles estas disminuyen conforme más intenso es el estrés por frío y la prolongación a este estrés, lo cual corresponde a lo observado por otros autores como Lyons (1973) y Levitt (1980). Aunque como se pudo observar en el capítulo dos de este trabajo, durante las primeras cuatro horas de exposición al frío se observa un incremento de proteínas durante los primeros días después del corte, sin embargo cuando la exposición al frío fue de seis horas, las proteínas

disminuyen, esto nos podría indicar que por efecto de maduración se induzca la síntesis de proteínas aunque puede ocurrir también por estrés por frío.

Uno de los aspectos más evidentes en el proceso de maduración es la pérdida de clorofila, asociada con la destrucción de los cloroplastos y la activación de las clorofilasas (Purvis, 1980). Bajo estrés por frío se menciona que las clorofilas se degradan (Levitt, 1980), sin embargo en el presente estudio los resultados obtenidos fueron contrarios, se tuvo un mayor contenido de clorofilas en frutos mantenidos bajo estrés por baja temperatura, esto es quizá debido a que el tiempo de exposición no fue suficiente para ocasionar la degradación de las clorofilas, o bien debido a la maduración irregular del fruto.

Ante el estrés por frío, el fotosistema II es la parte más vulnerable del aparato fotosintético (Anderson & Baber, 1996). Estudios sugieren que el estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas pueden reducir la eficiencia del fotosistema II, aumentando la degradación de la proteína D1 e interfiriendo en la fosforilación del PSII (Giardi *et al.*, 1996; Makela *et al.*, 1999). La eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm) es usualmente usada como indicador sensible en el funcionamiento fotosintético de plantas (Maxwell & Jonson, 2000) y representa una medida del estatus de la funcionalidad del complejo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se infiere que el frío produce ciertas alteraciones fisiológicas en los frutos de banano, hubo daño en el mecanismo fotosintético afectando al fotosistema II y esto se reflejó en una caída rápida en la eficiencia del transporte electrónico de este fotosistema (Fm/Fv) el cual se redujo de 0.8425 a 0.137.

En condiciones de estrés por frío, la tasa de producción de etileno y CO₂ se incrementan (Lyons & Breidenbach, 1990; Field, 1990; Leshem & Kadish, 1992). La respiración normalmente declina en frutos cosechados, pero cuando son expuestos a frío, esta se incrementa por la ruta alternativa en respuesta al frío (Moynihan *et al.*, 1995). Algunos tejidos como los de peras y melones, aceleran la producción de etileno durante el estrés por frío (Wang & Adams, 1982). Los daños producidos por este estrés se desarrollaron quizá porque las proteínas asociadas a la membrana, incluyendo los receptores de etileno y enzimas involucradas en la

fotosíntesis y respiración, pierden su función (Mc Collum & Mc Donald, 1991; Fluhr & Mattoo, 1996; Marangoni *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos con respecto a la producción de etileno y respiración, nos indican que la respiración disminuyó en un 51.5 % con respecto al control. Mientras la producción de etileno se adelantó provocando la maduración temprana del fruto. Estos desórdenes en el metabolismo del fruto coinciden con las observaciones hechas por Lyons (1973) y Levitt (1980). De acuerdo a Jiang y colaboradores (2004), las lesiones por frío en frutos almacenados a bajas temperaturas, se presentaron debido a la reducción de la habilidad del tejido de responder al etileno, lo cual aumenta los síntomas del daño por frío y repercute en una maduración anormal del fruto, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

4.2. EFECTO DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE GB, EN LOS FRUTOS DE BANANO

Dentro de las estrategias que utilizan las plantas para hacer frente al estrés por frío, está la generación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, llamados solutos compatibles (Bohnert *et al.*, 1995; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Iba, 2002). Estos compuestos se encuentran en forma estable en la célula y tienen un efecto en la función celular cuando se acumula en altas concentraciones (Yancey *et al.*, 1982) y se cree que desempeñan un papel importante para incrementar la presión osmótica interna y evitar la pérdida de agua de la célula (Sakamoto & Murata, 2002).

Dentro de las propiedades que presentan estos solutos se incluyen el ser bastantes solubles en agua, mantener la presión de turgencia durante el estrés, servir como agentes protectores que estabilizan la estructura y función de ciertas macromoléculas (Santoro *et al.*, 1992; Papageorgiou & Murata, 1995). Así que la acumulación de estos compuestos en las plantas, contribuye a la aclimatación de las células al estrés ambiental, tal es el caso del estrés por frío.

Entre los diferentes solutos compatibles que se pueden mencionar se encuentran el manitol, sorbitol, eritriol, glicerol, trehalosa, sacarosa, aminoácidos como la prolina, glutamina, lisina y derivados de aminoácidos como GB. La prolina se acumula en casi todas las plantas, sin embargo GB

esta distribuida solamente en aquellas con alta tolerancia a la salinidad y a frío (Le Rudulier *et al.*, 1984; Thomashow, 1999; Iba, 2002).

La síntesis de GB en algunas plantas ha sido de gran interés de la ingeniería genética, dado que la manipulación de esta vía ha permitido generar plantas transgénicas que expresan los genes de síntesis de GB (Styrvoid *et al.*, 1986; Larmak *et al.*, 1996; Sakamoto & Murata 2000; Sakamoto & Murata, 2002). Plantas transformadas con genes que sintetizan la GB han tenido la capacidad de acumular GB, se ha visto que la acumulación de 1 μ mol de GB/gPF aumenta de 10 a 100 veces la tolerancia al estrés por baja temperatura, salinidad y sequía (Eshoo, 1988; Lamark *et al.*, 1991; Rathinasabapathi *et al.*, 1997; Weretilnyk & Hanson, 1998; Nyssola, 2001; Xing & Rajashekar, 2001).

Dentro del grupo de las betaínas se encuentra representada por GB, β -alanina betaína, prolina betaína y 2-hidroxi prolina betaína (Nishimura *et al.*, 2001). Este trabajo se enfocó al estudio del efecto de GB en el desarrollo de los daños ocasionados por frío en banano: la GB es un osmolito completamente sustituido de grupos metilos, cuya función es estabilizar la estructura y función de muchas macromoléculas (Sakamoto & Murata, 2002), previene daños de la deshidratación celular por el balance osmótico, sostiene la fotosíntesis, mantiene el volumen de cloroplastos y protege a las enzimas que actúan en la cadena respiratoria (Gorham 1995; Makela *et al.*, 1999).

También se ha observado que la aplicación foliar de GB en especies de importancia comercial, que no son capaces de acumular este osmolito registran una mayor productividad y cuando estas son sometidas a estrés por temperatura tienen una mayor capacidad de tolerarla (Makela *et al.*, 1996; Makela *et al.*, 1999). La ventaja de usar este osmolito es que penetra rápidamente en el tejido y de inmediato trasloca a otros órganos (Makela *et al.*, 1996). No se tiene claro cual es el efecto de GB aplicado en hojas cercanas a la infrutescencia de banano, tampoco si banano produce este osmolito. Pero según los reportes, el banano cuenta con la maquinaria de síntesis de GB, aunque no es capaz de acumularla (Nakamura *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos de la aplicación foliar de GB en hojas cercanas a la infrutescencia, a una concentración de 50 y 100 mM, sugieren que GB fue tomado por las hojas y traslocado a frutos por lo que tiene cierto efecto en los frutos. Se vio un incremento en el contenido de fenoles con respecto

a muestras de banano que no fueron asperjados con GB. Parece que GB promueve la síntesis de fenoles o bien funciona como un inductor, lo cual provoca que la planta desarrolle cierto mecanismo de defensa, incrementando las síntesis de fenoles.

Con respecto al contenido de proteínas solubles, clorofilas y carotenoides hubo menor degradación de estos en frutos de banano de plantas asperjados con GB con respecto al control. La actividad enzimática de la PPO fue mayor a la del control en los frutos de plantas tratadas con GB, de 649.65 a 1361.62 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ durante los primeros tres días después del corte, comparado con 523.5315 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ en frutos de plantas no asperjadas. La fuga de electrolitos después de los primeros días del corte de los frutos de plantas tratadas con GB, fue mayor al del control. Sin embargo al madurar presentaron valores similares tanto los frutos de plantas tratadas con GB, como las no tratadas.

La producción de etileno y respiración fueron ligeramente más altos en aquellos frutos cuyas plantas fueron asperjadas con GB. Estos resultados no están muy claros, ya que no sabemos como está actuando la glicina-betaína en este nivel, ni tampoco se tienen reportes al respecto.

Los resultados de la eficiencia del PS II, sugiere que GB esta protegiendo al fotosistema II, manteniendo por más tiempo su eficiencia. Estos resultados del efecto protector de GB en los fotosistemas de la maquinaria fotosintética, concuerdan con los obtenidos por Allakhverdieva y colaboradores (1999), quienes encontraron que GB protege al fotosistema I y fotosistema II contra la inactivación térmica (estrés por calor), también con los estudios realizados por Allard et al. (1998), quienes sugieren que GB confiere gran estabilidad a la membrana cloroplástica y protege a las proteínas asociadas a ella, bajo estrés por baja y alta temperatura.

4.3. EFECTO DE GB EN LOS DESÓRDENES DESARROLLADOS POR FRÍO

Los resultados obtenidos, muestran que GB atenúa el fenómeno de pardeamiento en los frutos de banano cuando están expuestos a frío. Los efectos de este osmolito se ven marcados en los frutos tratados con GB, viéndose más vigorosos y verdes. GB puede quizá estar actuando a nivel de ajuste del potencial osmótico y por ende estabilizando membranas, por lo que los efectos secundarios del frío en frutos susceptibles como el

banano no ocurre (Sakamoto & Murata, 2002). Por otra parte, GB pudiera estar actuando en algún mecanismo de la maduración del fruto al retardarlo, aunque no queda muy claro de que manera.

La aplicación de GB incrementó el contenido de fenoles y también la actividad de PPO bajo condiciones normales y de estrés por frío, lo que sugiere que los fenoles están siendo usados en algún mecanismo de defensa. Al parecer GB promueve la síntesis de fenoles, aunque sería interesante conocer que tipo de fenoles son los que se sintetizan. Este aumento parece lógico porque los fenoles son el primer mecanismo de defensa ante cualquier agente extraño en la planta por sus propiedades antioxidantes (Fletcher & Kott, 1999; Valls *et al.*, 2000).

La aplicación exógena de GB tiene un efecto positivo en bananos bajo estrés por frío, puesto que los desórdenes causados por frío no se manifestaron, lo cual se une a los resultados favorables obtenidos por Makela y colaboradores (1996), quienes trabajando con diferentes plantas de importancia agrícola, principalmente monocotiledóneas, en las cuales evaluaron la traslocación de la GB en todas las especies analizadas, obteniendo como resultado que en aquellas especies asperjadas con GB tenían una mejor productividad.

Además Sakamoto y Murata (2002) reportaron que GB tiene la capacidad de osmoregular, estabilizando membranas, lo que no permite el contacto de los fenoles con la enzima polifenol oxidasa, enzima causante de pardeamiento. Por otro lado, se observa que GB también está promoviendo la síntesis de fenoles, ya que en el control se muestra una mayor concentración de hasta un 100% más. En este estudio solo se midió la concentración de fenoles solubles y no se sabe que tipo de fenoles se están sintetizando, pero si de que muchos de ellos tienen propiedades antioxidantes (Valls *et al.*, 2000; Rhodes *et al.*, 1981) y podrían estar actuando debido al estrés oxidativo causado por frío (Levitt, 1980), por lo que al tener un nivel alto de fenoles éstos pueden estar atenuando el efecto del estrés.

La aplicación de GB induce la síntesis de proteínas ante el estrés por frío y además reduce la degradación de estas, lo cual corresponde a lo observado por Makela y colaboradores (2000) en tomate pero bajo estrés por sequía y salinidad, observando que el contenido de proteínas aumentaban cuando se aplicaba GB y bajo estrés, lo cual nos indica que

GB tiene un efecto protector manteniendo la estructura de la proteína y promoviendo la síntesis de ésta.

La aplicación de GB aumenta aun más el contenido de clorofilas y mantuvo el contenido de carotenoides, valores que corresponden a los obtenidos por Makela y colaboradores (2000) en donde plantas de tomate fueron sometidas a estrés por salinidad y sequía, encontrando que GB mantiene el contenido de clorofilas y carotenoides ante el estrés por salinidad y sequía. Ante esto podemos decir que GB reduce la degradación de clorofilas y carotenoides en los frutos de banano tratados con GB y bajo estrés por frío.

La aplicación de GB tuvo un efecto protector en la estructura y función del complejo del PSII, estos datos concuerdan con los valores del contenido de clorofilas, con GB y expuestas a frío, los frutos de banano presentan menor degradación de clorofilas y carotenoides. Estos resultados son parecidos a los obtenidos por Allakhverdieva y colaboradores (1999), en donde se menciona que GB tiene efecto protector en las proteínas extrínsecas de los fotosistemas I y II que conforman el centro de reacción y se da principalmente en la plastocianina. Además el incremento de los valores de Fv/Fm en los frutos de banano tratados con GB, bajo condiciones de estrés por frío, indica que la aplicación de GB reduce la fotoinhibición causada por frío, resultados muy similares a los obtenidos por Allard y colaboradores (1998), quienes encontraron que la aplicación de GB previene la fotoinhibición en trigo causado por congelamiento.

En plantas transgénicas como *Arabidopsis* (Alia *et al.*, 1999), tabaco (Holmstron *et al.*, 2000), Zea maiz (Quan *et al.*, 2004) y *Brassicca juncea* (Prasad y Pardha Saradhi, 2004) que expresaron genes para COD, CDH/BADH, CDH o COD respectivamente, también mantienen valores altos de Fv/Fm a comparación con sus respectivos controles cuando están sujetas a foto inhibición causados por alta radiación combinado con estrés por salinidad y baja temperatura.

Por otra parte el efecto protector de GB en el complejo PSII contra los diferentes tipos de estrés ha sido bien establecido in Vitro. (Mamedov *et al.*, 1991; Mamedov *et al.*, 1993; Papageorgiou & Murata, 1995; Allakhverdiev *et al.*, 2003).

La aplicación de GB quizá tuvo acción a nivel de ajuste osmótico, factor que permitió estabilizar las membranas presentando menor fuga de

electrolitos de apenas un 29.45%, por lo que no se desencadenaron los disturbios metabólicos ocasionados por frío. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Nayyar y colaboradores (2005), quienes trabajaron con plantas de garbanzo sujetas a estrés por frío (12-14/3-5°C), a las cuales aplicaron 1mM de GB durante tres días consecutivos, observando que los síntomas del daño por frío en las plantas de garbanzo se minimizaron, la fuga de electrolitos se redujo un 63%, mientras la respiración se incremento en un 69%. Mencionan que la tolerancia al frío inducido por GB esta relacionado con el alto contenido de agua, a las clorofilas y sacarosa y la reducción del ácido abscísico así como las especies activas de oxígeno.

Los resultados favorables de la aplicación de GB, han enfocado al estudio de este mecanismo que tienen algunas plantas para aclimatarse ante condiciones ambientales desfavorables. (Rhodes & Hanson, 1993; Hare *et al.*, 1998; Bohnert & Shen, 1999; Sakamoto & Murata, 2002). El trigo por ejemplo, es un acumulador natural de GB, y aplicado exógenamente incrementa la concentración de GB en las células (Makela *et al.*, 1996; Rajasekaran *et al.*, 1997; Allard *et al.*, 1998). El incremento de la concentración de GB en plantas pretratadas, sugiere que la aplicación foliar de GB puede ser absorbido por plantas cultivadas (Makela *et al.*, 1996). Los resultados de la presente tesis permiten suponer que GB tiene potencial para conferir tolerancia en especies tropicales como el banano.

4.4. LITERATURA CITADA

- Alia Kondo Y., Sakamoto A., Nonaka H., Hayashi H., Pardha Sarashi P., Chen THH., and Murata N. (1999). Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase. *Plant Mol Biol.* **40**: 279–288.
- Allakhverdiev S.I., Hayashi H., Nishiyama Y., Ivanov A.G., Aliev J.A., Klimov V.V., Murata N., and Carpentier R. (2003). Glycinebetaine protects the D1/D2/Cytb559 complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation. *J Plant Physiol.* **160**: 41–49 pp.
- Allakhverdieva Y.M., Mamedov M.D., Ferimozova N., Papageorgiou G.C., and Gasanov R.A. (1999). Glycinebetaine stabilizes photosystem 1 and photosystem 2 electron transport in spinach thylakoid membranes against heat inactivation. *Photosyn. International J. Photosyn. Res.* **37** (3): 423-432.
- Allard F., Houde M., Krol M., Ivanov A., Huner N. P.A., and Sharn F. (1998). Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* **39** (11): 1194-1202.

- Anderson B., and Barber J. (1996). Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: N.R. Baker (Ed). *Photosynthesis and the environment: advance in photosynthesis research*. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 102–121 pp.
- Autio W.R., and Bramlage W.J. (1986). Chilling sensitivity of tomato fruit in relation to ripening and senescence. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **111**: 201-204.
- Ayora A., Sairam R.K., and Srivastava G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Curr. Sci.* **82**(10):1227-1238.
- Bohnert H.J., and Shen B. (1999). Transformation and compatible solutes. *Sci Hort.* **78**: 237–260 pp.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., and Jensen R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* **7**: 1099–1111.
- Dadzie B.K., y Orchard J.E. (1997). Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. *Guías Técnica Inibap*. El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. 63 p.
- Eshoo M. W. (1988). *Lac* fusion analysis of the *bet* genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *J. Bacteriol.* **170**: 5208-5215.
- Field R.J. (1990). Influence of chilling stress on ethylene production. In: Ed. C.Y. Wang. *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press. Boca Raton. 235-253 pp.
- Fitter A.H., and Hay R.K.M. (1987). *Environmental Physiology of plants*. Second Edition. Ed. Academic Press. San Diego California. 197-221 pp.
- Fletcher S.R., and Kott L. S. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. 10 th Rapeseed Congress. University of Guelph. Ontario Canada. 5 p
- Fluhr R., any Mattoo A.k. (1996). Ethylene biosynthesis and perception. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **15**:479-523.
- Foyer C. H., Vanacker H., Gómez L.D., harbinson J., (2002). Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiol. Biochem.* **40**:659-668.
- Fujita S., Yang C-P., Matsufuji K., Ashrafuzzaman M.D., Hayashi N., and Shimokawa K. (2001). Changes of polyphenol oxidase activity (musa sapientum L.) fruits during treatment by ethylene. *Food Preserv. Sci.* **27**(2): 79-82.
- Giardi M.T., Cona A., Geiken B., Kucera T., Masojidek J., and Mattoo A.K. (1996). Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta.* **199**: 118–125.
- Gooding P.S., Bird C., y Robinson S.P. (2001). Actividad de la polifenol oxidasa y expresión génica en la fruta de los bananos Goldfinger (AAAB, FHIA-01). *Infomusa.* **10** (2): 17-22.
- Gorham J. (1995). Betaines in higher plants – biosynthesis and role in stress metabolism. In *Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants* (ed. R.M. Wallsgrave). Cambridge University Press, Cambridge. 171–203 pp.

- Hare P.D., Cress W.A., and Staten V.J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* **21**: 535–553.
- Holmström K.-O., Somersalo S., Mandal A., Palva T.E., and Welin B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycinebetaine. *J. Exp. Bot.* **51**: 177–185.
- Iba K. (2002). Acclimatative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:225-245.
- Jiang Y., Joyce D.C., Jiang W., and Lu W. (2004). Effect of chilling injury on ethylene binding by banana fruit. *Plant Growth Regul.* **43**: 109-115.
- King M.M., and Ludford P.M. (1983). Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of difference tomato cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **108**:74-77.
- Lamark T., Kaasen I., Eshoo M.W., Falkenberg P., McDougall J., and Strom A.R. (1991). DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1049-1064.
- Lamark T., Rokenes T.P., McDougall J., and Strom A.R. (1996). The complex *bet* promoters of *Escherichia coli*: Regulation by oxygen (*ArcA*), choline (*BetI*), and osmotic stress. *J. Bacteriol.* **178**:1655-1662.
- Le Rudulier D., Strom A.R., Dandekar A.M., Smith L.T., and Valentine R.C. (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science.* **224**:1064–1063
- Leshem Y.Y., and Kadish D. (1992). Membrane related effects of chilling stress on ethylene production in green peppers stored at 4°C as compared to 17°C (shelf temperature). *Res. Report, U.S.-Israel, BARD Foundation.* 1-23 pp.
- Levitt J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. I. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Second Edition. Academic Press, New York. **1**. 497 p.
- Lyons J.M. 1973. Chilling Injury in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**:445-466.
- Lyons J.M., and Breidenbach R.W. (1990). Relation of chilling stress to respiration. In: C.Y. Wang (Ed.). *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press. Boca Raton. 223-233 pp.
- Mac Collum T.G., and Mc Donald R.E. (1991). Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indice of chilling injury in grapefruit. *Hortsc.* **26**(9):1191-1192.
- Makela P, Peltonen-Sainio P, Jokinen K, Pehu E, Setala H, Hinkkanen R, Somersalo S. (1996). Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Sci.* **121** (2): 221-230.
- Makela P., Karkkainen J., and Somersalo S. (2000). Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grow under drought or salinity. *Biol. Plant.* **43**(3):471-475.
- Makela P., M. Konturi, E. Pehu and S. Somersalo. (1999). Photosynthetic response of drought-and salt stressed tomato and turnip rape plants to foliar-applied glycinebetaine. *Physiol. Plant.* **105**:45-50.

- Mamedov M.D., Hayashi H., and Murata N. (1993). Effects of glycinebetaine and unsaturation of membrane lipids on heat stability of photosynthetic electron-transport and phosphorylation reactions in *Synechocystis* PCC6803. *Biochim Biophys Acta*. **1142**: 1–5.
- Mamedov M.D., Hayashi H., Wada H., Mohanty P.S., Papageorgiou G.C., and Murata N. (1991). Glycinebetaine enhances and stabilized the evolution of oxygen and the synthesis of ATP by cyanobacterial thylakoid membranes. *FEBS Lett*. **294**: 271–274.
- Marangoni A.G., Palma T., and Sanley D.W. (1996). Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biol. Technol.* **7**:193-217.
- Maxwell K., and Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot*. **51**: 659–668.
- Morelli K.L., Hess-Pierce B.M., and Kader A.A. (2003). Genotypic variation in chilling sensitivity of mature-green bananas and plantains. *Horttechn.* **12**(2):328-332.
- Moynihan M. R., Ordentlich A., and Raskin I. (1995). Chilling-induced heat evolution in plants. *Plant Physiol*. **108**: 995-999
- Nakamura T., Yokota S., Muramoto Y., Tsutsui K., Oguri Y., Fukui, K., and Takabe T. (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine non-accumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant. J.* **11**:1115- 1120.
- Nayyar H., Chander K., Kumar S., and Bains T. (2005). Glycine betaine mitigates cols stress damage in chickpea. *Sciense*. **25** (3):381-388.
- Nguyen T.B.T., Ketsa S., and Van Doorn W.G. (2000). Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyasa in banana peel, during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* **30**:187-193.
- Nilsen E. T., and Orcutt D. M. (1996). The physiology of plants under stress abiotic factors. Jonh Wiley & Sons Inc. United States of America. 486-514 pp.
- Nishimura N., J. Zhang, M. Abo, A. Okubo and S. Yamazaki. (2001). Application of capillary electrophoresis to the simultaneous determination of betaines in plants. *Analytical Sciences. Jap. Soc. Anal. Chem.* **17**: 103-106.
- Nyysola A. (2001). Pathways of glycine betaine synthesis in two extremely halophilic bacteria, *Actinopolyspora halophila* and *Ectothiorhodospira halochloris*. Thesis Doctoral. University de Technologie D'helsinki. 64p.
- Papageorgiou G.C., and Murata N. (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynth. Res.* **44**: 243–252.
- Prasad K.V.S.K., and Pardha Saradhi P. (2004). Enhance tolerance to photoinhibition in transgenic plants through targeting of glycinebetaine biosynthesis into chloroplasts. *Plant Sci.* **166**: 1197–1212.
- Purvis, A. (1980). Sequence of chloroplasts degreening in calamondin fruit as influence by ethylene and AgNO₃. *Plant. Physiol.* **6**:624-627.

- Quan R., Shang M., Zhang H., Zhao Y., and Zhang J. (2004). Improved chilling tolerance by transformation with *betA* gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. *Plant Sci.* **166**: 141–149.
- Raison J.K., Champman E.A., Wriath L.C., and Jacobs S.W.L. (1979). Membrane lipid transitions: their correlation with the climatic distribution of plants. In: J.M. Lyons, D. Graham J.L. Lyons (Eds). Low temperature Stress in Crop Plant. The role of the membrane. *Academic Press*. New York. 177-186.
- Rajasekaran L.R., Kriedemann P.E., Aspinall D., and Paleg L.G. (1997). Physiological significance of proline and glycinebetaine maintaining photosynthesis during NaCl stress in wheat. *Photosyn.* **34**: 357–366.
- Rathinasabapathi B., Burnet M., Russell B.L., Gage D. A., Liao P. C., Nye G. J., Scott P., Golbeck J. H., and Hanson A. D. (1997). Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 3454-3458.
- Rhodes D., and Hanson A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **44**: 357–384.
- Rhodes M. J. C., Wooltorton L. S. C., and Hill A. C. (1981). Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. In: Friend J., and Rhodes M.J.C (Eds). Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. *Academic press*. New York. 193-220 pp.
- Sakamoto A., and Murata N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant. Cell Environ.* **25**: 163-171.
- Sakamoto A., and Murata N.. (2000). Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **51** (342): 81-88.
- Salunkhe D.K., and Desai B.B. (1984). Posharvest Biotechnology of fruits. Library of Congress. Florida, United State. I: 43-58.
- Sanchez B. (2004). Bajas temperaturas afectan al banano. *Sica/Mag.* www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Ing%20Rizzo/banano/bajas_temperaturas.htm. (consultado: 3 de marzo del 2005)
- Santoro M. M., Liu Y., Khan S. M. A., Hou L. X., and Bolen D. W. (1992). Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochem.* **31**: 5278–5283.
- Shinozaki k., and Yamaguchū-Shinozaki K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Cur. Opin. Plant. Biol.* **3**: 217-223.
- Styrvoid O. B., Falkenberg P., Landfald B., Eshoo M. W., Bjornsen T., and Strom A. R. (1986). Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.* **165**: 856-863.

- Taiz L. and Zeiger E. (1991). Plant Physiology. The Benjamin/Comings Publishing Company, Inc. California, E. U. 346-368 pp.
- Thomashow M. F. (1999). Plant Cold Acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* **50**:571-599.
- Valls J., Lampreave M., Nadal M., y Arola L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza- Alimentación Equipos y Tecnología. *Enología*. Catalunya, España. 119-124 pp.
- Wang C.Y., and Adams D.O. (1982). Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativa* L.). *Plant Physiol.* **69**:424-427.
- Weretilnyk E. A., and Hanson A. D. (1988). Betaine aldehyde dehydrogenase polymorphism in spinach: genetic and biochemical characterization. *Biochem. Genet.* **26**: 143-151.
- Wills R., Lee T., McGlasson B. y Graham D. (1984). Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas postcosecha. Ed. Acriba. Zaragoza (España). 195 p.
- Wood F.M., Garner J.O., Silva J.L. Phromtong C. (1991). Estimation of chilling sensitivity in leaves of sweet potato by chlorophyll fluorescence and electrolyte leakage. *Phyton.* **52**:33-37.
- Xing W., and Rajashekar C.B. (2001). Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* **46**(1):21-28.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., and Somero G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**: 1214-1222.
- Yang C-P., Nong Z-R., Lu J-L., Lu L., Xu J-S., Han Y-Z., Li Y-J., and Fujita S. (2004). Bananas polyphenol oxidase: occurrence and change of polyphenol oxidase activity in some banana cultivars during development. *Food Sci. Technol. Res.* **10** (1): 75-78

Capítulo V. Conclusiones generales

La maduración a 23±1°C causó en la epidermis del fruto:

1. Un aumento en el contenido de fenoles.
2. Una disminución en el contenido de proteínas.
3. Una disminución en el contenido de clorofilas y mantenimiento del contenido de carotenoides.
4. La actividad de la polifenol oxidasa (PPO) presenta un pico al tercer día y luego disminuye conforme avanza el proceso de maduración.
5. La producción de CO₂ aumenta hasta alcanzar el climaterio.
6. La producción de etileno sigue un patrón similar al de la respiración.
7. Una aumento en la fuga de electrolitos.
8. Una disminución de la eficiencia del fotosistema II.

La exposición al frío causó en la epidermis del fruto:

1. Un aumento en la actividad de la PPO respecto al control y por consiguiente una disminución en la concentración de fenoles, que al oxidarse debieron haber aumentado los pigmentos causantes del pardeamiento.
2. Un aumento en la degradación de proteínas, pues su contenido se vio reducido cuando el tiempo de exposición al frío fue mayor.
3. Una reducción en el contenido de carotenoides y un aumento de las clorofilas con respecto al control, por la maduración irregular que presentaron los frutos.
4. Que se adelantara la producción de etileno y se redujera el contenido con respecto al control, provocando la maduración prematura de los frutos.
5. Que se redujera la concentración de CO₂ (respiración).
6. Que se aumentara la fuga de electrolitos, lo que sugiere que está habiendo daño en la membrana.
7. Que se redujera la eficiencia de fotosistema II, lo que sugiere que está habiendo daño en este fotosistema, probablemente en la proteína D1 del fotosistema II, provocando que sea interrumpido el transporte de electrones y que provoque un estrés oxidativo.

La aplicación foliar de GB causó en la epidermis del fruto:

En la maduración a 23±1°C

1. Un aumento en el contenido de fenoles, lo que podría indicar que GB está promoviendo la síntesis de estos compuestos o evitando su degradación conforme el fruto madura.
2. Que se atenuara la degradación de proteínas conforme avanza la maduración.
3. Que se atenuara la degradación de clorofilas y que se mantuviera el contenido de carotenoides.
4. Un aumento en la actividad de la polifenol oxidasa con respecto al control, lo cual quizá esté indicando que la PPO está participando en otro mecanismo de protección.
5. Que no se alterara la fuga de electrolitos con respecto al control.
6. Que se mantuviera por más tiempo la eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm).

En la exposición a frío:

1. Un menor daño por frío (pardeamiento) de los frutos con respecto a aquellos de plantas sin GB. El menor pardeamiento en plantas tratadas con GB parece correlacionar con una menor actividad de la PPO (solo en la concentración intermedia de GB), aunque la concentración de fenoles no se afectó.
2. Promovió la síntesis de proteínas.
3. No tuvo efecto en la degradación de clorofilas, aunque sí causó una mayor síntesis de carotenoides.
4. Protegió al fruto de posible daño por frío en la membrana resultando en una menor fuga de electrolitos.
5. Atenuó la caída de respiración y de la producción de etileno.
6. Protegió marginalmente al fruto de posible daño por frío en el centro activo del fotosistema II. Resultando en una menor caída en Fv/Fm (la eficiencia de transporte electrónico de fotosistema II).

Cuando las plantas fueron tratadas con GB en precosecha, se redujeron algunos de los efectos del estrés por frío en postcosecha, aumentando su vida de anaquel, por lo que la aplicación precosecha de GB en la planta, tiene efecto protector en los frutos a nivel de postcosecha.

Capítulo VI. Perspectivas

Los resultados presentados en este trabajo aportan evidencias fisiológicas y bioquímicas de cuales son los efectos de GB en frutos de banano expuestos a frío. Sin embargo faltan muchos aspectos por conocer, en este sentido se proponen las siguientes perspectivas:

1. Repetir el experimento de la aplicación foliar de GB, cuantificando la concentración endógena de GB en los frutos de banano, con la finalidad de observar si realmente se trasloca de las hojas a los frutos y en que cantidad.
2. Hacer un experimento de dosis respuesta con la finalidad de conocer que cantidad de GB mínimo se debe aplicar foliarmente para tener una respuesta en frutos y cuál es la dosis que podría constituir un problema para la planta.
3. Aplicar GB en plantas con frutos de diferentes estados de desarrollo y darle seguimiento hasta su maduración en la planta, ya que no es el mismo comportamiento cuando los frutos están en la planta o en postcosecha.
4. Realizar un experimento en la cual se analice la respuesta de la aplicación foliar de GB en la plantación de banano bajo condiciones naturales de frío durante el invierno o bien bajo condiciones controladas en campo. Esto es con la finalidad de verificar si el efecto protector de GB reportada en la presente tesis se mantiene cuando el daño por frío ocurre en los frutos cuando éstos están todavía en la planta.
5. Si GB tiene un efecto positivo en contra de los disturbios metabólicos ocasionados por frío, puede ser factible que se utilice la ingeniería genética. Con la finalidad de obtener plantas de banano modificadas genéticamente con la capacidad para acumular GB y poder conferir tolerancia ante el estrés por baja temperatura.

Anexos

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PRACTICADO PARA CADA PARÁMETRO. LA DIFERENCIA ENTRE TRATAMIENTO SE ANALIZÓ POR LSD (P=0.05) CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.

Fenoles solubles (mg. g PF⁻¹)

0 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	0.525 ± 0.063 a	0.218 ± 0.026 a	0.274 ± 0.033 a	0.145 ± 0.017 a
2	1.131 ± 0.136 b	0.929 ± 0.111 b	0.373 ± 0.045 a	0.416 ± 0.050 a
3	1.330 ± 0.160 b	1.133 ± 0.136 b	0.533 ± 0.064 a	0.828 ± 0.099 a
4	1.395 ± 0.167 b	1.331 ± 0.160 c	0.710 ± 0.085 a	0.847 ± 0.102 b
5	1.432 ± 0.172 b	1.377 ± 0.165 c	0.964 ± 0.116 b	0.917 ± 0.110 b
6	1.650 ± 0.198 c	1.392 ± 0.167 c	0.979 ± 0.118 b	1.109 ± 0.133 b
7	1.950 ± 0.234 d	1.498 ± 0.180 c	1.013 ± 0.122 b	1.244 ± 0.149 b
8	2.250 ± 0.270 d	1.826 ± 0.219 d	1.224 ± 0.147 b	1.310 ± 0.157 c

50 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	0.387 ± 0.046 a	0.630 ± 0.076 a	0.079 ± 0.010 a	0.345 ± 0.041 a
2	0.677 ± 0.081 a	0.906 ± 0.109 b	0.825 ± 0.099 b	0.380 ± 0.046 a
3	1.622 ± 0.195 b	0.933 ± 0.112 b	0.828 ± 0.099 b	0.454 ± 0.055 a
4	2.535 ± 0.304 c	1.221 ± 0.147 b	0.859 ± 0.103 b	0.477 ± 0.057 a
5	2.630 ± 0.316 c	1.947 ± 0.234 c	0.870 ± 0.104 b	0.714 ± 0.086 a
6	2.846 ± 0.342 c	2.157 ± 0.259 c	0.998 ± 0.120 c	0.904 ± 0.109 b
7	2.898 ± 0.348 c	2.254 ± 0.271 c	1.226 ± 0.147 c	0.966 ± 0.116 b
8	3.316 ± 0.398 c	2.426 ± 0.291 c	1.558 ± 0.187 d	1.260 ± 0.151 c

100 mM de GB

Día	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	0.523 ± 0.063 a	0.738 ± 0.089 a	0.251 ± 0.030 a	0.162 ± 0.019 a
2	1.294 ± 0.155 b	1.368 ± 0.164 b	0.650 ± 0.078 a	0.372 ± 0.045 a
3	1.444 ± 0.173 b	1.556 ± 0.187 b	0.864 ± 0.104 b	0.453 ± 0.054 a
4	1.733 ± 0.208 c	2.069 ± 0.248 c	1.035 ± 0.124 b	0.733 ± 0.088 b
5	1.739 ± 0.209 c	2.147 ± 0.258 c	1.093 ± 0.131 b	0.827 ± 0.099 b
6	2.194 ± 0.263 d	2.361 ± 0.283 c	1.253 ± 0.150 b	1.014 ± 0.122 c
7	2.284 ± 0.274 d	2.361 ± 0.283 c	1.276 ± 0.153 b	1.271 ± 0.152 c
8	3.072 ± 0.369 e	2.528 ± 0.303 c	2.145 ± 0.257 c	1.311 ± 0.157 c

Proteínas solubles (mg. g PF⁻¹)

0 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	0.921 ± 0.005 a	0.800 ± 0.013 a	0.640 ± 0.002 a	0.859 ± 0.098 a
2	1.093 ± 0.147 b	1.345 ± 0.136 b	1.642 ± 0.340 b	1.004 ± 0.102 b
3	1.740 ± 0.144 b	1.656 ± 0.114 b	2.067 ± 0.340 c	1.281 ± 0.109 b
4	1.995 ± 0.194 b	1.618 ± 0.224 b	2.372 ± 0.355 c	0.808 ± 0.106 a
5	0.627 ± 0.314 a	2.078 ± 0.370 c	3.175 ± 0.420 d	0.617 ± 0.289 a
6	0.290 ± 0.189 a	1.566 ± 0.256 b	3.061 ± 0.298 d	0.209 ± 0.056 a
7	0.202 ± 0.111 a	1.449 ± 0.212 b	0.288 ± 0.090 a	0.080 ± 0.005 a
8	0.140 ± 0.091 a	1.266 ± 0.440 b	0.203 ± 0.073 a	0.042 ± 0.004 a

50 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	0.979 ± 0.024 a	1.003 ± 0.044 b	0.957 ± 0.035 a	0.712 ± 0.011 a
2	1.450 ± 0.261 b	1.819 ± 0.168 b	1.403 ± 0.151 b	1.742 ± 0.188 b
3	1.615 ± 0.365 b	1.801 ± 0.097 b	1.678 ± 0.145 b	2.071 ± 0.280 c
4	1.684 ± 0.285 b	1.279 ± 0.293 b	1.933 ± 0.115 b	2.454 ± 0.264 c
5	3.102 ± 0.298 c	0.514 ± 0.164 a	3.246 ± 0.346 d	2.837 ± 0.073 c
6	1.481 ± 0.261 b	0.327 ± 0.077 a	2.524 ± 0.223 c	2.379 ± 0.278 c
7	1.320 ± 0.273 b	0.237 ± 0.179 a	1.605 ± 0.307 b	2.309 ± 0.290 c
8	0.969 ± 0.216 a	0.220 ± 0.083 a	2.094 ± 0.189 c	2.034 ± 0.137 c

100 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	1.157 ± 0.015 a	1.202 ± 0.016 b	0.902 ± 0.052 a	0.835 ± 0.103 a
2	1.430 ± 0.364 b	1.873 ± 0.360 b	1.413 ± 0.134 b	1.133 ± 0.087 b
3	1.418 ± 0.267 b	1.390 ± 0.179 b	1.324 ± 0.096 b	2.386 ± 0.225 c
4	1.576 ± 0.169 b	1.597 ± 0.244 b	2.252 ± 0.299 c	2.805 ± 0.265 c
5	2.918 ± 0.210 c	2.372 ± 0.091 c	3.129 ± 0.123 d	3.165 ± 0.308 d
6	2.259 ± 0.227 c	1.547 ± 0.216 b	2.171 ± 0.169 c	2.849 ± 0.071 c
7	1.555 ± 0.162 b	0.995 ± 0.175 a	2.184 ± 0.258 c	2.879 ± 0.230 c
8	1.433 ± 0.128 b	0.887 ± 0.102 a	2.205 ± 0.077 c	2.510 ± 0.204 c

Actividad Específica de PPO ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$)

0 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	64.094 ± 2.509 a	484.768 ± 47.358 a	309.792 ± 17.714 b	549.08 ± 98.908 b
2	209.103 ± 13.955 b	566.670 ± 37.707 b	516.744 ± 17.717 b	356.09 ± 97.328 b
3	523.530 ± 83.203 c	542.425 ± 13.623 b	5431.54 ± 904.031 c	5614.4 ± 898.597 c
4	23.669 ± 4.823 a	0.171 ± 0.037 a	0.649 ± 0.264 a	12.609 ± 1.447 a
5	0.930 ± 0.030 a	0.076 ± 0.004 a	126.691 ± 7.690 a	0.429 ± 0.141 a
6	3.386 ± 0.206 a	0.941 ± 0.067 a	17.223 ± 5.178 a	10.877 ± 0.312 a
7	7.344 ± 0.642 a	0.806 ± 0.349 a	27.757 ± 1.667 a	9.863 ± 0.862 a
8	0.044 ± 0.002 a	0.065 ± 0.027 a	24.496 ± 2.079 a	84.069 ± 7.637 a

50 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	98.518 ± 9.503 a	97.037 ± 12.108 a	511.728 ± 12.003 c	2.131 ± 0.583 a
2	273.557 ± 72.627 b	880.057 ± 53.153 c	175.075 ± 6.216 b	863.25 ± 35.546 c
3	1361.622 ± 43.362 c	3040.003 ± 380.936 d	4321.24 ± 146.559 d	2424.9 ± 370.665 d
4	17.988 ± 0.919 a	198.082 ± 7.194 b	2.555 ± 0.052 a	8.275 ± 0.275 a
5	4.752 ± 0.263 a	0.269 ± 0.020 a	3.255 ± 0.255 a	109.83 ± 33.615 b
6	8.709 ± 0.837 a	1.013 ± 0.083 a	3.284 ± 0.298 a	24.846 ± 2.675 a
7	44.463 ± 8.811 a	4.921 ± 0.564 a	0.549 ± 0.049 a	4.003 ± 1.462 a
8	19.541 ± 2.245 a	7.225 ± 0.416 a	8.561 ± 2.596 a	34.574 ± 11.682 a

100 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	210.261 ± 22.737 c	810.891 ± 30.794 c	22.727 ± 0.483 a	16.884 ± 1.285 a
2	191.059 ± 33.323 b	271.819 ± 41.516 b	553.783 ± 48.702 b	578.99 ± 95.347 b
3	649.652 ± 81.373 d	2730.013 ± 36.328 d	6403.51 ± 707.58 c	6140.2 ± 25.672 c
4	2.440 ± 0.193 a	2.626 ± 0.104 a	12.529 ± 1.625 a	68.308 ± 23.888 a
5	3.551 ± 0.674 a	14.572 ± 3.662 a	1.397 ± 0.183 a	47.765 ± 1.062 a
6	3.067 ± 0.755 a	2.942 ± 0.702 a	1.029 ± 0.211 a	6.381 ± 0.493 a
7	6.846 ± 0.412 a	0.197 ± 0.026 a	0.156 ± 0.052 a	91.238 ± 16.397 a
8	7.870 ± 0.715 a	0.920 ± 0.408 a	0.352 ± 0.906 a	91.035 ± 13.762 a

Contenido de clorofilas totales (µg. g PF⁻¹)

0 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	55.263 ± 8.29 d	49.121 ± 7.37 e	77.495 ± 11.6 g	62.74 ± 9.41 e
2	21.722 ± 3.26 c	34.648 ± 5.2 d	53.419 ± 8.01 f	47.12 ± 7.07 d
3	16.852 ± 2.53 b	27.72 ± 4.16 c	42.536 ± 6.38 e	42.29 ± 6.34 d
4	15.075 ± 2.26 b	22.453 ± 3.37 c	38.345 ± 5.75 d	34.69 ± 5.2 c
5	11.333 ± 1.7 b	12.774 ± 1.92 b	30.801 ± 4.62 c	29.96 ± 4.49 c
6	9.371 ± 1.41 a	11.029 ± 1.65 b	22.174 ± 3.33 c	15.89 ± 2.38 b
7	8.128 ± 1.22 a	7.63 ± 1.14 a	11.949 ± 1.79 b	14.97 ± 2.25 b
8	0 ± 0 a	0 ± 0 a	3.365 ± 0.5 a	7.03 ± 1.05 a

50 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	81.646 ± 12.2 f	86.322 ± 12.9 f	62.666 ± 9.4 e	50.77 ± 7.62 e
2	54.825 ± 8.22 e	74.79 ± 11.2 e	41.194 ± 6.18 d	46.04 ± 6.91 d
3	34.964 ± 5.24 d	50.848 ± 7.63 d	39.13 ± 5.87 c	32.85 ± 4.93 c
4	26.333 ± 3.95 c	25.273 ± 3.79 c	37.275 ± 5.59 c	31.09 ± 4.66 c
5	25.494 ± 3.82 c	14.292 ± 2.14 b	34.122 ± 5.12 c	26.56 ± 3.98 b
6	11.339 ± 1.7 b	11.2 ± 1.68 b	24.059 ± 3.61 b	26.12 ± 3.92 b
7	6.298 ± 0.94 a	7.001 ± 1.05 a	22.53 ± 3.38 b	19.97 ± 3 a
8	4.991 ± 0.75 a	1.397 ± 0.21 a	12.984 ± 1.95 a	16.5 ± 2.47 a

100 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	43.082 ± 6.46 f	62.236 ± 9.34 e	88.85 ± 13.3 f	79.62 ± 11.9 e
2	35.574 ± 5.34 e	57.063 ± 8.56 d	63.277 ± 9.49 e	66.57 ± 9.98 d
3	26.228 ± 3.93 c	50.079 ± 7.51 d	52.998 ± 7.95 d	54.6 ± 8.19 c
4	24.137 ± 3.62 c	38.931 ± 5.84 c	38.234 ± 5.74 c	41.61 ± 6.24 b
5	20.969 ± 3.15 c	30.814 ± 4.62 c	28.648 ± 4.3 b	27.11 ± 4.07 a
6	18.26 ± 2.74 b	22.952 ± 3.44 b	22.163 ± 3.32 b	26.07 ± 3.91 a
7	5.197 ± 0.78 a	9.645 ± 1.45 a	15.403 ± 2.31 a	26.16 ± 3.92 a
8	0 ± 0 a	0 ± 0 a	12.539 ± 1.88 a	21.65 ± 3.25 a

Contenido de carotenoides ($\mu\text{g. g PF}^{-1}$)

0 mM de GB

Días	23 \pm 1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	20.775 \pm 3.12 a	19.054 \pm 2.86 a	19.302 \pm 2.9 a	19.22 \pm 2.88 a
2	27.055 \pm 4.06 a	24.164 \pm 3.62 b	24.514 \pm 3.68 b	19.15 \pm 2.87 a
3	43.865 \pm 6.58 c	34.98 \pm 5.25 c	25.554 \pm 3.83 b	17.06 \pm 2.56 a
4	33.742 \pm 5.06 b	32.099 \pm 4.81 c	25.345 \pm 3.8 b	21.71 \pm 3.26 b
5	26.747 \pm 4.01 a	26.848 \pm 4.03 b	33.536 \pm 5.03 c	24.55 \pm 3.68 b
6	25.592 \pm 3.84 a	22.696 \pm 3.4 b	28.61 \pm 4.29 b	25.88 \pm 3.88 b
7	24.158 \pm 3.62 a	21.71 \pm 3.26 b	23.956 \pm 3.59 b	30.03 \pm 4.5 c
8	23.314 \pm 3.5 a	21.929 \pm 3.29 b	20.07 \pm 3.01 a	27.17 \pm 4.08 b

50 mM de GB

Días	23 \pm 1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	23.661 \pm 3.55 a	31.687 \pm 4.75 b	21.671 \pm 3.25 b	18.7 \pm 2.8 a
2	28.109 \pm 4.22 a	31.404 \pm 4.71 b	21.273 \pm 3.19 b	20.08 \pm 3.01 b
3	29.052 \pm 4.36 a	36.122 \pm 5.42 b	23.325 \pm 3.5 b	22.44 \pm 3.37 b
4	43.853 \pm 6.58 c	46.89 \pm 7.03 c	27.099 \pm 4.06 b	25.99 \pm 3.9 b
5	33.101 \pm 4.97 b	30.867 \pm 4.63 b	23.706 \pm 3.56 b	28 \pm 4.2 b
6	31.585 \pm 4.74 b	30.703 \pm 4.61 b	22.16 \pm 3.32 b	25.68 \pm 3.85 b
7	25.32 \pm 3.8 a	25.323 \pm 3.8 a	20.977 \pm 3.15 b	20.17 \pm 3.03 b
8	24.737 \pm 3.71 a	22.987 \pm 3.45 a	18.634 \pm 2.8 a	21.62 \pm 3.24 b

100 mM de GB

Días	23±1°C	Tiempo mantenido a 10°C (horas)		
		2	4	6
1	25.501 ± 3.83 b	27.64 ± 4.15 a	22.2 ± 3.33 b	18.48 ± 2.77 a
2	30.914 ± 4.64 c	32.34 ± 4.85 b	25.96 ± 3.89 b	20.49 ± 3.07 b
3	39.953 ± 5.99 c	32.03 ± 4.8 b	28.9 ± 4.33 b	31.69 ± 4.75 c
4	36.978 ± 5.55 c	40.62 ± 6.09 c	32.86 ± 4.93 c	38.26 ± 5.74 c
5	32.326 ± 4.85 c	37.69 ± 5.65 b	25.53 ± 3.83 b	36.29 ± 5.44 c
6	32.154 ± 4.82 c	27.02 ± 4.05 a	22.44 ± 3.37 b	35.56 ± 5.33 c
7	27.22 ± 4.08 b	25.99 ± 3.9 a	21.96 ± 3.29 b	30.8 ± 4.62 c
8	18.033 ± 2.7 a	23.18 ± 3.48 a	19.87 ± 2.98 a	27.32 ± 4.1 b

Eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm)

Días	0mM de GB		100 mM de GB	
	23±1°C	6 hrs a 10°C	23±1°C	6 hrs a 10°C
0	0.844 ± 0.127 a	0.843 ± 0.127 a	0.817 ± 0.123 a	0.82 ± 0.123 a
1	0.845 ± 0.127 a	0.843 ± 0.127 a	0.827 ± 0.124 a	0.83 ± 0.125 a
2	0.834 ± 0.125 a	0.841 ± 0.126 a	0.823 ± 0.124 a	0.84 ± 0.125 a
3	0.847 ± 0.127 a	0.834 ± 0.125 a	0.828 ± 0.124 a	0.83 ± 0.125 a
4	0.847 ± 0.127 a	0.834 ± 0.125 a	0.828 ± 0.124 a	0.83 ± 0.125 a
5	0.835 ± 0.125 a	0.61 ± 0.092 b	0.821 ± 0.123 a	0.83 ± 0.124 a
6	0.727 ± 0.109 b	0.46 ± 0.069 c	0.782 ± 0.117 b	0.65 ± 0.097 b
7	0.631 ± 0.095 c	0.405 ± 0.061 c	0.76 ± 0.114 b	0.53 ± 0.080 c
10	0.295 ± 0.044 d	0.137 ± 0.021 d	0.361 ± 0.054 b	0.21 ± 0.032 d

Fuga de electrolitos (%)

Días	0mM de GB		100 mM de GB	
	23±1°C	6 hrs a 10°C	23±1°C	6 hrs a 10°C
0	11.17 ± 1.676 a	14.46 ± 2.169 a	19.09 ± 2.864 a	12.3 ± 1.845 a
1	12.94 ± 1.941 a	14.68 ± 2.202 a	16.07 ± 2.411 a	15.1 ± 2.265 a
2	15.92 ± 2.388 a	26.43 ± 3.965 b	20.13 ± 3.02 a	17.3 ± 2.591 a
3	16.98 ± 2.547 a	30.45 ± 4.568 c	22.68 ± 3.402 b	22.4 ± 3.359 b
4	18.64 ± 2.796 a	34 ± 5.1 c	27.18 ± 4.077 b	26.7 ± 4.005 b
5	16.98 ± 2.547 a	39.08 ± 5.862 c	25.21 ± 3.782 b	25.9 ± 3.878 b
6	21.47 ± 3.221 b	38.04 ± 5.706 c	28.72 ± 4.308 b	25.4 ± 3.809 b
7	32.25 ± 4.838 c	38.61 ± 5.792 c	32.11 ± 4.817 c	24.4 ± 3.654 b
10	38.35 ± 5.753 c	51.2 ± 7.68 d	37.56 ± 5.634 c	29.5 ± 4.418 b

Respiración (ml CO₂. kg⁻¹.hr⁻¹)

Días	0mM de GB		100 mM de GB	
	23±1°C	6 hrs a 10°C	23±1°C	6 hrs a 10°C
0	9.387 ± 1.408 a	9.063 ± 1.360 a	8.764 ± 1.317 a	8.888 ± 1.333 a
1	11.349 ± 1.702 b	8.538 ± 1.281 a	8.463 ± 1.270 a	9.089 ± 1.363 a
2	13.372 ± 2.006 b	12.489 ± 1.873 b	9.069 ± 1.361 a	14.174 ± 2.126 b
3	11.705 ± 1.756 b	10.1967 ± 1.530 b	10.503 ± 1.576 b	13.598 ± 2.040 b
4	16.326 ± 2.449 b	16.667 ± 2.500 b	12.227 ± 1.834 b	13.503 ± 2.026 b
5	30.659 ± 4.599 d	16.363 ± 2.454 b	28.198 ± 4.230 c	31.984 ± 4.798 c
6	29.206 ± 4.381 c	20.323 ± 3.048 c	32.303 ± 4.846 d	49.694 ± 7.454 d
7	36.161 ± 5.424 d	41.312 ± 6.197 d	94.934 ± 14.240 f	58.277 ± 8.742 e
9	95.611 ± 14.342 f	49.298 ± 7.395 d	20.940 ± 3.141 c	75.614 ± 11.342 f

Producción de etileno ($\mu\text{l C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)

Días	0mM de GB		100 mM de GB	
	23±1°C	6 hrs a 10°C	23±1°C	6 hrs a 10°C
0	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
1	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
2	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
3	0 ± 0 a	3.752 ± 0.563 c	0.946 ± 0.142 a	0 ± 0 a
4	0 ± 0 a	1.343 ± 0.202 b	1.255 ± 0.188 b	1.392 ± 0.209 a
5	0 ± 0 a	0.637 ± 0.096 a	1.932 ± 0.290 b	2.047 ± 0.307 b
6	0 ± 0 a	0.649 ± 0.098 a	2.603 ± 0.390 c	2.127 ± 0.319 b
7	0.731 ± 0.110 b	0.658 ± 0.099 a	3.982 ± 0.597 d	2.216 ± 0.332 b
9	8.245 ± 1.237 c	0 ± 0 a	8.485 ± 1.273 e	2.461 ± 0.370 b

REACTIVOS USADOS

- ✓ 4-Metil Catecol (95%). Sigma Aldrich. No.Catálogo: M34200. Lote: EC 207-214-5.
- ✓ Acetona. Merck. No. Catálogo: Ax0120-9. Lote: 4118428.
- ✓ Ácido Ascórbico (L-ácido ascórbico 99%) ACS Reactivo. Sigma-Aldrich. No. Catálogo: 255564. Lote: EC 200-06-2.
- ✓ Ácido Caféico (3,4-Dihydroxy cinnamic acid). Sigma. No. Catálogo: 0625. Lote: 66H0405.
- ✓ Ácido Fosfórico de Baker. No. Catálogo: 26002.
- ✓ Agua Destilada de Agua Destilada del Sureste.
- ✓ Albúmina Sérica Bovina (BSA). Sigma. No. de Catálogo A-2153. Lote: 62H0154.
- ✓ Aprotinina (Inhibidor de Proteasas). Sigma. No. de Catálogo: A-3428. Lote 21K7018.
- ✓ Cloruro de sodio. Merck. No. Catálogo: 3596. Lote: B21578.
- ✓ Coomassie Brilliant Blue G-250 (98%). Sigma. No. Catálogo: B-0770. Lote: 17H0815.
- ✓ EGTA (Etilenglicol-bis (β -aminoetil eter) N, N, N', N'-ácido tetra acético). Sigma. No. De Catálogo: E4378. Lote: 29F-5625.
- ✓ Etanol (Alcohol Etilico Absoluto). Técnica Química. No. Catálogo: A-1695. Lote: 98308.
- ✓ Folin Ciocalteu (Folin & Ciocalteu's phenol reagent 2N) de Sigma. No. Catalogo:F9252. Lote 013K3692.
- ✓ Fosfato de Sodio Dibásico Heptahidratado. Fluka Chemika. No. Catálogo:71647. Lote: 4462881/1 32403106.
- ✓ Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado (99%). Sigma. No. Catálogo: S-3522. Lote L-80K1153.
- ✓ Glicerol. Fermont Productos Químicos Monterrey. No. Catálogo: 06441. Lote: 123102.
- ✓ Glicina-betaína (Betaine anhydrous axyneurine) 98%. Fluka Biochemika. No. Catálogo. 14290. Lote 421684/123203487.
- ✓ Hexacianoferrato de Potasio III (99%). Fluka Chemika. No. Catálogo: 60300. Lote: 450926/1 42603515.
- ✓ Hidróxido de Sodio. Merck. No. Catálogo: B-966798149. Lote UN 1823.
- ✓ Leupetina (Acetyl-Leu-Leu-Arg-Al) Hemisulfate Salt. Sigma. No. Catálogo: L-2884. Lote 012K86123.

- ✓ Manitol (D-manitol). Productos Químicos Monterrey. No. Catálogo: 07202.
- ✓ Nitrógeno líquido
- ✓ Papel filtro Watman
- ✓ p-Cresol. Fluka Chemika. No. Catálogo: 61035. Lote:441488/1 21903047.
- ✓ Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Rhoche. No. Catálogo: 85849321.
- ✓ Pirocatecol (98%). Fluka Chemika. No. Catálogo: 15890. Lote: 442472/1 44902248.
- ✓ Polivinilpolipirrolidina (PVPP). Sigma. No. Catálogo: P-6755. Lote: 17H1435.
- ✓ Promilo 50 PH (Benomilo). Funguicida Agrícola de Agroquímica Promotora Técnica Industrial S.A de C.V.
- ✓ Sacarosa. Boxon Becton Dickinson de México S.A de C.V. No. Catálogo: 21700. Lote 4300170.
- ✓ Sulfato de Magnesio. Productos Químicos Monterrey S.A de C.V. No. Catálogo. 63622 Lote 917110.
- ✓ Sulfato Férrico de Amonio Dodecahidratado (99%). Fluka Chemika. No. Catálogo: 09731. Lote: 415691/1 34002098.
- ✓ Tris (Electrophoresis purity reagent tris (hidroxymethyl aminomethane). Bio-Rad Laboratories. No. Catálogo 61509B. Lote: 161-0716.

