

**Efecto del 1-Metilciclopropeno (1-MCP) en el
comportamiento poscosecha de banano
bocadillo (*Musa acuminata* AA, Simmonds).**

Juan Camilo García

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá D.C., Colombia
2015

**Efecto del 1-Metilciclopropeno (1-MCP) en el
comportamiento poscosecha de banano bocadillo
(*Musa acuminata* AA, Simmonds).**

Juan Camilo García

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias.

Director
Aníbal Herrera Arévalo

Codirector
Esperanza Torres Rojas

Línea de profundización: **Fisiología de Cultivos**

Grupo de Investigación: **Horticultura**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá D.C., Colombia
2015

Dedicatoria.

*(...) “Siempre confiaste en todo lo que soñé,
me cuidaste y me guiaste asta aquí” (...) Zoe*

A Ivonne, mi familia, mi guía, mi camino, mi sueño.

A mi Madre y Abuela, porque son la motivación de seguir este camino.

A la Señora Yolanda y Juan Fernando por hacer realidad este sueño.

(...) Tú que cambiaste tu curso para vernos soñar

Tú que viajaste desde el otro mundo hasta aquí

Tú que dejaste tu estrella para sentir el mar

Tú que te quitaste las alas para vernos crecer,

Junto a ti (...) Jaguares

Agradecimientos

A los profesores Aníbal Herrera Arévalo y Esperanza Torres por su guía y valioso apoyo en el desarrollo de la investigación.

Al personal de diferentes laboratorios por el apoyo técnico y académico brindado durante el desarrollo de la tesis:

Laboratorio de Poscosecha de Productos Agrícolas:

Lady Manrique; Helber Balaguera; Carlos Gómez; Laura Ramírez.

Laboratorio de Agrobiotecnología:

Diana Zabala; Felipe Sandoval; Jesús Castaño y Rosa Mejía.

Laboratorio de Microbiología:

Víctor Manuel Tibata; Judith Figueroa.

Facultad de Biología

Paola Hurtado

A COLCIENCIAS y la Universidad Nacional de Colombia por el programa de Semilleros y Jóvenes Investigadores, convocatoria 617 de 2013.

A las demás personas que directa e indirectamente han contribuido en que este sueño esté más cerca de realizarse.

Resumen

El banano bocadillo o bananito (*Musa acuminata* AA, Simmonds) es considerado un fruto tropical exótico con alto potencial para ser exportado por Colombia, sin embargo, es altamente perecedero y no cuenta con prácticas adecuadas de manejo de poscosecha, lo que disminuye su potencial de comercialización. Su corta vida en poscosecha está relacionada con el carácter climatérico y con una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos que aceleran su proceso de maduración. Dichos procesos son regulados principalmente por la hormona vegetal etileno, la cual a su vez, puede ser inhibido mediante el uso de diferentes compuestos químicos como el 1-metilciclopropeno (1-MCP), disminuyendo la velocidad de maduración y permitiendo prolongar la vida poscosecha de diferentes frutas y hortalizas. El 1-MCP se une a los receptores celulares del etileno y bloquea y/o retrasa la señalización de la maduración, afectando la expresión de genes, la velocidad de los procesos bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante la maduración. De manera general, el 1-MCP retrasa el desarrollo de color, el ablandamiento, el metabolismo de azúcares y ácidos, la respiración, entre otros. Además, el 1-MCP disminuye la producción de etileno, debido a la inhibición de la expresión de los genes que codifican para la biosíntesis de etileno (*ACS* y *ACO*). Existen pocos estudios reportados en bananito relacionados con el efecto del 1-MCP ó etileno en la poscosecha de esta fruta, además, hasta la fecha no se ha reportado ningún estudio sobre la expresión de los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de etileno en bananito. Por esta razón, se evaluó el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de 1-MCP en el comportamiento poscosecha de estos frutos, además, se determinó el efecto de la aplicación de etileno y su interacción con el 1-MCP, para finalmente caracterizar la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de etileno, como consecuencia de la aplicación de etileno y 1-MCP. Este trabajo pretende contribuir al entendimiento de los procesos de maduración del bananito como un primer paso para lograr aumentar su vida poscosecha y mejorar su potencial de exportación.

Palabras clave: maduración, poscosecha, climatérico, etileno, inhibidor, expresión de genes.

Abstract

Baby banana or banana “Sucrier” (*Musa acuminata* AA, Simmonds) is considered an exotic tropical fruit with high potential to be exported by Colombia, however, it is highly perishable and has no proper postharvest handling practices, reducing their potential for marketing. Its short postharvest life is related to the climacteric character and a series of physiological and biochemical processes that accelerate the ripening process. Much of these processes are mainly regulated by the plant hormone ethylene, which in turn, can be inhibited by using different chemical compounds such as 1-methylcyclopropene (1-MCP), resulting in decreased ripening rate and allowing extend postharvest life of different fruits and vegetables. 1-MCP binds to cellular ethylene receptors and delays and/or blocks ripening signaling, affecting genes expression levels involved in the ripening and therefore the speed of biochemical and physiological processes. In general, the 1-MCP delays the development of color, softening, sugars and acids metabolism, and respiration, among others. Furthermore, 1-MCP reduces ethylene production due to the inhibition of genes expression encoding for ethylene biosynthesis (*ACS* and *ACO*). Few studies has been reported in baby banana related to the effect of 1-MCP or ethylene in the fruit postharvest, and also nowadays it has not been reported any studies on the regulation of expression of genes encoding biosynthesis ethylene in baby banana. For this reason, we evaluated the effect of the application of different concentrations of 1-MCP in the postharvest behavior of this fruit. Besides, the effect of the application of ethylene and its interaction with 1-MCP was also studied. Finally, the changes in the expression of some ethylene biosynthesis genes as a result of the application of ethylene and 1-MCP were characterized. This work will contribute to the understanding of the ripening processes in baby banana, as a first step to achieve extend postharvest life and increase their export potential.

Keywords: ripening, postharvest, climacteric, ethylene, inhibitor, gene expression.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	15
1.1. Planteamiento del problema.....	17
1.2. Preguntas de investigación.....	18
2. Objetivos.....	19
2.1. General.....	19
2.2. Específicos.....	19
3. Revisión de la literatura.....	20
3.1. Bananito (<i>Musa AA</i> , Simmonds).....	20
3.2. Fisiología de la maduración.....	21
3.3. Etileno.....	22
3.4. Biosíntesis de etileno.....	23
3.5. Enzimas ACS (EC 4.4.1.14) y ACO (EC 1.4.3).....	25
3.6. Señalización celular por el etileno.....	28
3.7. Antagonistas del etileno.....	31
3.8. 1-Metilciclopropeno.....	32
3.8.1. Factores que afectan la eficacia del 1-Metilciclopropeno.....	34
3.8.2. Algunos estudios de caso.....	35
3.9. Cuantificación de la Expresión de genes usando PCR en tiempo real.....	36
3.10. Literatura citada.....	39
4. Metodología General.....	49
4.1. Ubicación.....	49
4.2. Material vegetal.....	49
4.3. Materiales.....	49
4.4. Objetivo específico 1.....	50
4.5. Objetivo específico 2.....	51
4.6. Objetivo específico 3.....	52
<i>Extracción de ARN</i>	53
<i>PCR en tiempo real.</i>	54
4.7. Variables evaluadas.....	55
5. Resultados objetivo específico 1: Efecto de la concentración y tiempo de tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP) en la poscosecha de bananito (<i>Musa AA</i> Simmonds)...	59
5.1. Introducción.....	60

5.2.	Resultados y discusión.....	63
5.3.	Conclusiones.....	77
5.4.	Literatura citada.....	77
6.	Resultados objetivo específico 2: El 1-MCP disminuye los efectos inducidos por el etileno en la maduración de frutos de bananito (<i>Musa AA Simmonds</i>).....	87
6.1.	Introducción.....	88
6.2.	Resultados.....	90
6.3.	Conclusiones.....	104
6.4.	Literatura citada.....	105
7.	Resultados Objetivo específico 3. Caracterización de la expresión de genes <i>MA-ACSI</i> , <i>MA-ACO1</i> y <i>MA-ACO2</i> como respuesta a la aplicación de etileno y 1-MCP (<i>Musa AA, Simmonds</i>).....	110
7.1.	Introducción.....	111
7.2.	Resultados y discusión.....	115
7.3.	Conclusiones.....	129
7.4.	Literatura citada.....	130
8.	Conclusiones y recomendaciones generales.....	136

Lista de figuras

Figura 1. Ruta de biosíntesis de etileno en plantas. Tomado de Taiz y Zeiger, (2006).	26
Figura 2. Estructura de las subfamilias de receptores de etileno en <i>Arabidopsis</i> . Tomado de Lacey y Binder, (2014).....	29
Figura 3. Modelo de la señalización de etileno, en donde se muestra el papel de CTR1. Tomado de Ju <i>et al.</i> (2012).....	31
Figura 4. Estructura molecular del 1-MCP.....	33
Figura 5. Curva de amplificación por PCR en tiempo real, mostrando la relación entre el Ct y el q_0 . Tomado de (Evrard <i>et al.</i> , 2009).	38
Figura 6. Ángulo h del color.....	56
Figura 7. Carta de los estados de madurez de banano. (1) Frutos verdes; (2) frutos verdes con trazas de amarillo; (3) frutos con predominancia de color verde; (3.5) Frutos mitad verdes y mitad amarillos; (4) frutos más verdes que amarillo; (5) frutos verdes con trazas de color verde; (6) frutos amarillos y (7) frutos amarillo con desarrollo de manchas en la epidermis.	57
Figura 8. Efecto de (A) diferentes concentraciones y (B) tiempos de tratamiento con 1-MCP en la pérdida de peso de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio (n=12 para concentración y n=16 para tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$).	64
Figura 9. Efecto de (A) diferentes concentraciones y (B) tiempos de tratamiento con 1-MCP en la Intensidad respiratoria (IR) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio (n=12 para concentración y n=16 para tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$)......	66
Figura 10. Efecto de (A) diferentes concentraciones y (B) tiempos de tratamiento con 1-MCP en el color (Valor de $^{\circ}h$) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio (n=12 para concentración y n=16 para tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$).	68
Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones (A y C) y tiempos de tratamiento (B y D) con 1-MCP, en la firmeza (A y B) y la extensibilidad de la epidermis (C y D) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio (n=12 para concentración y n=16 para	

tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P < 0.05$)..... 69

Figura 14. Efecto de diferentes tratamientos (concentración * tiempo de tratamiento con 1-MCP) en: (A) pérdida de peso; (B) intensidad respiratoria; (C) color; (D) firmeza; (E) extensibilidad; (F) SST; (G) ATT y (H) relación de madurez en frutos de bananito cuando se alcanzó el estado de madurez 7 (C7, en el control a los 21 d y en los demás tratamientos a los 28 d). Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al control (T) según la prueba Dunnett ($P < 0.05$)..... 76

Figura 14. Producción de etileno (PE) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P < 0.05$)..... 91

Figura 15. Intensidad respiratoria (IR) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P < 0.05$)..... 95

Figura 16. Pérdida de peso en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P < 0.05$). 96

Figura 17. Estados de madurez de bananito según el índice de maduración propuesto por el Departamento de Servicios al Cliente de Chiquita Brands, Inc., y (Paull, 1996)..... 97

Figura 18. Color en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P < 0.05$). 98

Figura 19. Firmeza (A) y extensibilidad de la epidermis (B) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error

estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P < 0.05$).....	100
Figura 20. Sólidos solubles totales (SST) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P < 0.05$).....	102
Figura 21. Acidez total titulable (ATT) (A) y relación de madurez (RM) (B) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P < 0.05$).....	103
Figura 22. Efecto de la aplicación de Etileno y 1-MCP en (A) la intensidad respiratoria (IR) y (B) producción de etileno (PE) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo. La barra corresponde al error estándar. Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba Tukey ($P < 0.05$), mientras que ns, indica que no existen diferencias.....	117
Figura 23. Efecto de la aplicación de Etileno y 1-MCP en (A) color (valor de °h); (B) firmeza; (C) sólidos solubles totales (SST) y (D) acidez total titulable (ATT) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo. La barra corresponde al error estándar. Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba Tukey ($P < 0.05$), mientras que ns, indica que no existen diferencias.....	120
Figura 24. Efecto de la aplicación de Etileno y 1-MCP en el color y desarrollo de la maduración de frutos de bananito. Los frutos bajo tratamiento con etileno y el control alcanzaron un estado de maduración C7 a los 16 d, mientras que en frutos tratados con 1-MCP el estado fue C4-5.	121
Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa del ARN extraído a partir de la pulpa de frutos verdes (V) y maduros (M), bajo dos metodologías: CTAB (López <i>et al.</i> , 2006) y TRizol®. En la figura se pueden observar las dos bandas de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal.	123
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa (1,2%) del ARN extraído (4 μ L) de la pulpa de bananito, bajo la aplicación de etileno (ET) y 1-MCP (MCP). Se pueden observar las dos bandas de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal.	124

Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR con diferentes primers: *MA-ACT*, *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI*, amplificados por PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) (A) y PCR en tiempo real (RT-qPCR) (B)..... 125

Figura 28. Expresión relativa de los genes *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* en la pulpa de bananito como consecuencia de la aplicación de Etileno y 1-MCP. Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo. La barra representa al error estándar. Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba Tukey ($P < 0.05$). 126

Lista de tablas

Tabla 1: Nombres comunes del bananito dependiendo del país. Tomado de Lim (2012) ...	20
Tabla 2. Producción de etileno y sensibilidad en diversos productos agrícolas.....	24
Tabla 3. Tratamientos del objetivo 1 aplicados a los frutos de bananito.....	50
Tabla 4. Tratamientos del objetivo 2 aplicados a los frutos de bananito.....	51
Tabla 5. Secuencias de primers utilizados en éste estudio. Tomado de Huber <i>et al.</i> (2010).	55
Tabla 6. Evaluación de la calidad del ARN extraído de la pulpa de bananito en estado de madurez verde y maduro, utilizando dos metodologías de extracción.....	122
Tabla 7. Evaluación de la calidad del ARN extraído de la pulpa de bananito, a partir de los diferentes tratamientos aplicados.....	123

Abreviaturas

1-MCP: 1-methylciclopropene

MA: Modified atmosphere

CA: Controlled atmosphere

ACS: 1-aminociclopropane-1-carboxylate synthase

MA-ACS: Musa acuminata ACS synthase gene

ACO: Amino cyclopropane carboxylate oxidase

MA-ACS: Musa acuminata ACO oxidase gene

SAM: S-adenosyl methionine

MTA: 5'-Methylthioadenosine Nucleosidase

MTR: 5-Methylthioribose Kinase

ETR: ethylene resistant/ethylene receptor

ERS: Ethylene response sensor

NR: Never ripening

EIN: Ethylene insensitive

CTR1: Constitutive triple response 1

EIL1: EIN-Like 1

ERF: Ethylene response factor

RAN1: copper-transporting P-type ATPase

CDPK: Calcium dependent protein kinase

EBF: EIN3-Binding factor

PERE: Primary ethylene response element

AVG: Aminoethoxy vinyl glycine

AOA: Amino oxyacetic acid

STS: silver thiosulfate

NBD: 2,5-norboARNdiene

DACP: diazocyclopentadiene

KMnO₄: Potassium permanganate

GRAS: Generally recognized as safe

TFs: Transcription Factors

PAO: Pheophorbide a Oxygenase

NYC: Non-Yellow Colouring

NOL: NYC1-like

SGR1: Stay-Green 1

CHL1: Chlorophyllase 1

PSY1: Phytoene Synthase 1

PME: Pectin methylesterase

PG: Polygalacturonase

PL: Pectate liase

SAGE: Serial analysis of gene expression

PCR: Polymerase chain reaction

1. Introducción

El banano bocadillo o bananito (*Musa acuminata* AA, Simmonds) es considerado un fruto tropical exótico con alto potencial para ser exportado por Colombia (Espinal *et al.*, 2005). Los principales destinos de las exportaciones son: Francia (50%), Estados Unidos (34%), Italia (6%), Suiza (6%) y otros (4%) (Legiscomex, 2008). Para el año 2013, el bananito ocupó el segundo lugar en las exportaciones de frutas, después del plátano (excluyendo el banano), con un volumen exportado de 8.100 t y un valor cercano a los 5,3 millones de dólares (Asohofrucol, 2014). Las exportaciones se realizan por vía aérea, debido a que es un fruto altamente perecedero, con corta vida en poscosecha (Gutiérrez, 1997). Los principales problemas que afectan el aprovechamiento del potencial de exportación de bananito son las altas pérdidas y la corta vida en poscosecha (Pardo y Rubio, 2004; MADR, 2006); lo cual está relacionado con prácticas inadecuadas en la poscosecha, y con la fisiología propia del fruto (Valenzuela y Bohórquez, 2002; Parra y Hernández, 2007). Los frutos de bananito son climatéricos (Castro y Restrepo, 2004), es decir, que después de la madurez fisiológica aumentan la respiración y la producción de etileno, siendo el etileno la hormona vegetal que induce diferentes cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos relacionados con el proceso de maduración (Castro *et al.*, 2008; Kesari *et al.*, 2007).

Existen diferentes tecnologías reportadas para retardar el proceso de maduración y disminuir las pérdidas en poscosecha de productos agrícolas, dentro de las cuales se pueden citar: la refrigeración, las atmósferas modificadas y controladas (AM y AC), los absorbentes (KMnO_4) y antagonistas del etileno (STS, DACP, 2-NBD y 1-MCP), entre otras (Sáenz, 2004). El 1-metilciclopropeno (1-MCP) es considerado una herramienta eficiente en la conservación de frutas, hortalizas y flores de corte (Reid y Staby, 2008). Su mecanismo de acción es el bloqueo de los receptores celulares del etileno, con lo cual se inhibe la respuesta a éste y se retrasan los procesos fisiológicos y bioquímicos de la maduración (Blankenship y Dole, 2003). Diversos estudios han mostrado que el 1-MCP retrasa la maduración de banano (*Musa* AAA) (Jiang *et al.*, 1999a; Moradinezhad *et al.*, 2006; Botondi *et al.*, 2014; entre otros), no obstante, la información del efecto del 1-MCP en bananos diploides, incluyendo al bananito, es limitada. A pesar de esto, los mecanismos relacionados con la maduración de estos miembros de la familia Musáceae se consideran similares (Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, 2012), por lo tanto se espera que la aplicación de 1-MCP en bananito también retrase la maduración.

Diferentes factores influyen en la respuesta de los frutos al tratamiento con 1-MCP, los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: (1) aquellos relacionados directamente con el fruto como especie, variedad, cultivar, estado de madurez, entre otros y (2) aquellos relacionados con las condiciones de la aplicación, como concentración, tiempo de tratamiento, temperatura, etc. (Paul y Pandey, 2013). En banano, los factores más

estudiados que influyen en la respuesta de los frutos al 1-MCP, son el estado de madurez y la interacción entre la concentración de 1-MCP y el tiempo de tratamiento (Jiang y Joyce, 2003). Las concentraciones de 1-MCP reportadas para la aplicación en frutas varían desde $0,02 \mu\text{L L}^{-1}$ hasta $100 \mu\text{L L}^{-1}$, mientras que los tiempos de tratamiento, oscilan entre 2 y 36 h (Blankenship y Dole, 2003). En general, existe una relación entre la concentración de 1-MCP y la prolongación de la vida poscosecha de banano, no obstante, también se ha reportado que las concentraciones demasiado altas ($>30 \mu\text{L L}^{-1}$) afectan de manera irreversible el proceso de maduración y por tanto la calidad organoléptica de la fruta (Harris et al., 2000; Moradinezhad *et al.*, 2008a), lo cual, al menos en parte puede ser solucionado con la aplicación de etileno exógeno (Golding *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2010). En bananito, es escasa la información y sólo se ha reportado un estudio realizado por Pardo y Rubio (2004), quienes encontraron que las concentraciones mayores de $1,8 \mu\text{L L}^{-1}$ afectan negativamente las características sensoriales de los frutos, por lo tanto, en el presente estudio se profundizó en el efecto de la concentración, tiempo de tratamiento y la interacción entre la aplicación de etileno exógeno y 1-MCP para retardar el proceso de maduración en bananito.

Por otro lado, el 1-MCP también ha permitido el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta de los frutos climatéricos al etileno durante el proceso de maduración (Huber, 2008; Lurie y Paliyath, 2008), debido a que dicha molécula bloquea una vía de señalización celular, con lo cual se afecta la expresión de genes que son etileno-dependientes (Seymour *et al.*, 2013; Hiwasa-Tanase y Ezura, 2014). En este sentido, se han reportado numerosos genes que son inducidos por el etileno durante la maduración y por tanto, son inhibidos por el 1-MCP. Dentro de dichos genes se encuentran aquellos que codifican para las enzimas de la biosíntesis de etileno como ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO) (Pathak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2007). Dichas enzimas son codificadas por una familia multigénica que varía en sus niveles de expresión durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Barry and Giovannoni, 2007; Bouzayen *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha encontrado que los únicos genes responsables de la biosíntesis de etileno durante la maduración de banano son: *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACS1* (López-Gómez *et al.*, 1997), los cuales a su vez, también parecen ser conservados en bananos diploides (Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, 2012).

Como se había mencionado anteriormente, la mayoría de los estudios de fisiología y biología molecular se han realizado en bananos triploides, mientras que en bananos diploides como el bananito, la información es limitada, por tanto, en el presente estudio se realizó un análisis preliminar de la expresión de los genes percursores del etileno (*MA-ACS1*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2*) como respuesta a la aplicación de etileno y 1-MCP. Ésta información es de gran relevancia debido a que se desconoce el proceso de regulación génica involucrado en la biosíntesis de etileno en bananito, además, se espera que la información obtenida pueda brindar las bases para plantear una tecnología de conservación

con 1-MCP en bananito, además de avanzar en la comprensión de la regulación de la maduración a nivel molecular, en frutos tropicales.

1.1. Planteamiento del problema

Los frutos de bananito son altamente perecederos (Gutiérrez, 1997), con bajas posibilidades de almacenamiento bajo condiciones ambientales normales, debido a que durante la maduración ocurren una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos estimulados por el etileno que llevan al rápido deterioro (Castro *et al.*, 2008; Kesari *et al.*, 2007), ocasionando un alto porcentaje de pérdidas en la etapa de poscosecha (28 a 50%) y afectando el potencial de exportación (Pardo y Rubio, 2004; MADR, 2006). Por lo anterior, es necesario buscar alternativas que permitan prolongar la vida de anaquel de este producto. En éste sentido, el 1-MCP constituye una de las herramientas más eficientes en la conservación poscosecha de productos agrícolas (Reid y Staby, 2008). En bananito, los resultados no son consistentes y por lo tanto, en este estudio, se profundizó en aspectos relacionados con algunos de los factores (concentración, tiempos de tratamiento y etileno exógeno) que intervienen en la eficacia del 1-MCP.

La mayoría de los estudios en poscosecha se han realizado en banano triploide (*Musa* AAA), mientras que en bananos diploides la información es limitada (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006; Ketsa *et al.*, 2000;). En general, el 1-MCP disminuye o retrasa los cambios en las variables poscosecha de banano, inducidos durante la maduración por el etileno (Jiang *et al.*, 1999a; Jiang *et al.*, 1999b; Jiang y Fu, 2000; Pathak *et al.*, 2003), sin embargo, la aplicación de 1-MCP previa o posterior a la aplicación de etileno, puede llevar a una regulación del proceso de maduración diferente (Golding *et al.*, 1998; Inaba *et al.*, 2007). En bananito se desconoce el efecto de la aplicación exógena de etileno y de la interacción con el 1-MCP en la poscosecha. Por último, en banano, se ha reportado que la aplicación exógena de etileno induce la expresión de genes que codifican para su propia biosíntesis, mientras que el 1-MCP la inhibe o la disminuye (Nakatsuka *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2012; Yamane *et al.*, 2007; López-Gómez *et al.*, 1997). En bananito no existe información al respecto, por lo cual, en este trabajo también se propone la caracterización preliminar de la expresión de los genes *MA-ACSI*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2*, bajo condiciones normales y con la aplicación de etileno y 1-MCP.

1.2. Preguntas de investigación

- ¿Cuál es el efecto de la aplicación de 1-metilciclopropano (1-MCP) en el comportamiento poscosecha de banano bocadillo? La cual se plantea con el fin de encontrar la concentración y tiempo de tratamiento más adecuados para retrasar la maduración de esta fruta. Para ello, se evaluaron diferentes variables de poscosecha como: pérdida de peso, firmeza del fruto, color, acidez total titulable, sólidos solubles totales, intensidad respiratoria y relación de madurez.
- ¿Cuál es el efecto de la aplicación exógena de etileno y 1-MCP, además de su interacción en el desarrollo de la maduración de bananito? La cual se plantea con el objetivo de conocer si la aplicación de 1-MCP retrasa los efectos inducidos por la aplicación previa de etileno exógeno, además, también para conocer si la aplicación de etileno posterior al 1-MCP induce la maduración o si el 1-MCP sigue siendo eficiente en inhibir los efectos inducidos por el etileno. Para ello, se evaluó la producción de etileno, intensidad respiratoria y las demás variables mencionadas anteriormente.
- ¿Cómo ocurre la expresión de los genes *MA-ACS1*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2*, en frutos de bananito, bajo condiciones normales y en respuesta a la aplicación de 1-MCP y etileno? Lo anterior se plantea, debido a que el 1-MCP al ocupar los receptores de etileno bloquea la secuencia de transducción de señales que conllevan a la expresión de genes relacionados con la maduración, dentro de los cuales se encuentra los genes *MA-ACS* y *MA-ACO*, que codifican para las enzimas ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), respectivamente. Se determinó la producción de etileno, intensidad respiratoria, expresión relativa de dichos genes y algunas variables físico-químicas.

2. Objetivos

2.1. General

Evaluar el efecto de la aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP) en el comportamiento poscosecha de banano bocadillo (*Musa acuminata* AA, Simmons) a nivel fisiológico y molecular durante el proceso de maduración.

2.2. Específicos

- Determinar el efecto diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento con el 1-MCP en la poscosecha de frutos de bananito, con el fin de seleccionar el tratamiento óptimo de conservación.
- Evaluar el efecto de la aplicación de etileno y su interacción con la aplicación previa y posterior de 1-MCP en algunas variables poscosecha de frutos de bananito.
- Realizar un estudio de la expresión de los genes *MA-ACSI*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2* bajo condiciones normales y en respuesta a la aplicación de 1-MCP y etileno, en frutos de bananito para conocer su efecto a nivel molecular.

3. Revisión de la literatura

3.1. Bananito (*Musa AA*, Simmonds).

El bananito (*Musa acuminata* AA, Simmonds), recibe diferentes nombres dependiendo de la región del mundo (Tabla 1). Es el único diploide comestible importante dentro del grupo Acuminata (genoma A) de la familia *Musaceae* (Robinson y Galán, 2012). Es originario de Malasia y se ha reportado como el cultivar AA más cultivado a nivel mundial (Lim, 2012). La planta de banano bocadillo inicia su producción entre las 12 y 16 semanas después de la siembra, dependiendo de la variedad y condiciones agroecológicas (Amortegui, 2001; Ramos, 2010). La cosecha con destino a la exportación se inicia desde la séptima semana después de la floración (ddf) (Amórtégui, 2001).

Tabla 1: Nombres comunes del bananito dependiendo del país. Tomado de Lim (2012)

<i>Musa acuminata</i> (Grupo AA)	
País	Nombre común
Australia	Sucrier
Brasil	Oruro
Colombia	Bananito, Banano bocadillo
Costa Rica	Lady Finger
Ecuador	Orito
Estados Unidos	Nino, Sucrier
Filipinas	Amas, Caramelo, Kamoros
Guyanas	Parika
Hawaii	Lady Finger
India	Surya Kadali
Indonesia	Mow Mei, Sarmi, Pisang Mas, Pisang Susu
Malasia	Pisang Mas, Pisang Susu
Polinesia	Peru, Fig, Tinito
Tailandia	Kluai khai
Venezuela	Titiaro
Vietnam	Choi Trung
West Indies	Sucrier, Sucrier Fig, Fig, Dátil

El área sembrada del cultivo en Colombia reportada para el 2013, fue de 2.635 ha, con una producción de 16.746 t y un rendimiento de 6,4 t ha⁻¹ año⁻¹, siendo los principales departamentos productores Chocó, Valle del Cauca, Putumayo y Tolima, los cuales en

conjunto representan más del 85 % del área sembrada en el país (Agronet, 2015). El banano bocadillo es considerado un producto exótico promisorio para ser exportado por Colombia, razón por la cual la mayoría de la producción se destina a la exportación (Castellanos *et al.*, 2011). Los principales mercados de éste producto son Francia (50% de las exportaciones), Estados Unidos (34%), Italia (6%), Suiza (6%) y otros (4%) (Legiscomex, 2008). El valor en volumen, de las exportaciones reportado para el 2013 fue de 8.100 t, siendo el segundo producto frutícola en importancia, después del plátano (sin incluir banano), a su vez, en los primeros 4 meses del año 2014, el volumen aumentó a 11.200 t (Asohofrucol, 2014).

Las exportaciones se realizan por vía aérea debido a que es un fruto altamente perecedero (Gutiérrez, 1997). Lo cual, entre otras cosas está relacionado con el carácter climatérico del fruto (Castro y Restrepo, 2004) y con la susceptibilidad a sufrir daños en la epidermis, lo cual en conjunto hace difícil su almacenamiento y transporte (Vargas-Calvo y Sandoval-Fernández, 2005), generando altas pérdidas en poscosecha (28 a 50 %) y afectando el aprovechamiento del potencial de exportación (Pardo y Rubio, 2004; MADR, 2006).

A nivel nutricional, los frutos de bananito son ricos en minerales, carbohidratos y vitaminas, haciéndolos un alimento altamente energético (Amortegui, 2001). Morales (2002) reporta que 100 g de pulpa contienen 74 % humedad; 22 % de carbohidratos; 1 % de fibra; 1,2 % de proteínas; 0,1 % de grasas; 0,7 mg de Niacina; 10 mg de ácido ascórbico; 300-450 mg de K y 8 mg de Ca. Por su parte, la pulpa del fruto es de color blanco-amarillo, con sabor suave, dulce, y con un aroma diferente al banano Cavendish, lo cual le confiere un carácter exótico en el mercado extranjero.

3.2. Fisiología de la maduración

La maduración de los frutos se puede definir como “el conjunto de procesos que se producen en las últimas etapas de crecimiento y las primeras etapas de senescencia, los cuales incluyen: cambios de color, textura, sabor, aroma, entre otros, todos relacionados con la estética y/o calidad para el consumo humano” (Kader y Yahia, 2011). La maduración es un proceso genéticamente irreversible, es decir, que no se puede revertir, sino sólo retrasar (Ayoub *et al.*, 1976). El fin evolutivo de la maduración de los frutos es la atracción de animales para la dispersión de semillas (Hiwasa-Tanase y Ezura, 2014), sin embargo, a nivel comercial la maduración está relacionada con el desarrollo de las características organolépticas requeridas para la alimentación humana (Jiang *et al.*, 2004; Hiwasa-Tanase y Ezura, 2014).

Los principales cambios que ocurren durante la maduración varían entre especies, pero de manera general incluyen: cambios de color, textura, sabor, aroma, contenido nutricional y aumento de la susceptibilidad a patógenos (Adams-Phillips *et al.*, 2004; Paliyath y Murr,

2008). Los principales cambios que ocurren en los frutos de banano durante la maduración son: aumento de la respiración y producción de etileno; ablandamiento del fruto; conversión masiva de almidón a azúcares en la pulpa; incremento de la actividad polifenoloxidasa (pardeamiento enzimático); aumento de la síntesis de compuestos aromáticos y degradación de clorofilas, con desenmascaramiento de carotenoides (Kesari *et al.*, 2007). No obstante, la información de los cambios fisiológicos y bioquímicos durante la poscosecha de bananito son limitados (Castro Benítez *et al.*, 2005; Pardo y Rubio, 2004), aunque, de manera general, se pueden considerar similares a los presentados en banano (Hubert *et al.*, 2010). Dichos cambios están relacionados con la expresión de genes que codifican enzimas que participan en los procesos metabólicos anteriormente citados (Bouzayen *et al.*, 2010). La expresión de estos genes es estimulada por el etileno, ya sea endógeno o exógeno (Bapat *et al.*, 2010).

La maduración en banano puede ser dividida en los cambios que ocurren en la pulpa y en la epidermis. Bajo condiciones normales empieza en la pulpa, debido a que la mayoría de procesos relacionados con la maduración como: aumento de la respiración, producción de etileno, ablandamiento y expresión de genes, entre otros, empieza en dicho tejido (López-Gómez *et al.*, 1997; Inaba *et al.*, 2007). A nivel molecular, se ha reportado que cerca de 250 genes son regulados durante la maduración de banano, los cuales a su vez, están relacionados con procesos fisiológicos como: biosíntesis de etileno, respiración, metabolismo de azúcares, degradación de la pared celular, entre otros (Medina-Suárez *et al.*, 1997). Dentro de dichos genes, Gupta *et al.* (2006) y Jin *et al.* (2009) identificaron en banano, 22 genes específicos de la maduración, es decir, que sólo se expresan en esta etapa fenológica, de los cuales 6 genes son regulados negativamente (*down-regulated*) y 16 positivamente (*up-regulated*) por el etileno. Lo cual implica que el etileno no sólo induce la expresión de genes durante la maduración, sino que también la puede inhibir.

3.3. Etileno

Los frutos pueden ser clasificados en dos grupos, climatéricos o no climatéricos, en donde aquellos que incrementan la producción de etileno y la respiración después de la madurez fisiológica son frutos climatéricos, mientras que aquellos que no lo hacen, son frutos no climatéricos. No obstante, existen frutos que pueden ser tanto climatéricos, como no climatéricos, como algunos miembros del género *Capsicum* (Barry y Giovannoni, 2007; Seymour *et al.*, 2013). El etileno (C₂H₄) es una hormona gaseosa que afecta diversos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo la germinación de semillas, el crecimiento, la formación de meristemos apicales, la senescencia, el desarrollo floral, la maduración de frutos climatéricos, la abscisión de órganos, el gravitropismo y diferentes respuestas al estrés biótico y abiótico (Fluhr, 1998; Yoo *et al.*, 2009). En general, todos los tejidos de la planta que respiran, producen etileno, no obstante, la cantidad producida varía

significativamente dependiendo de la especie, órgano y edad del órgano (Salisbury y Ross, 2000), además la producción de etileno se ve estimulada por los daños causados a los tejidos o por situaciones de estrés biótico y abiótico (Palomer *et al.*, 2005).

El etileno es biológicamente activo a concentraciones bajas ($<0,1 \mu\text{L L}^{-1}$), sin embargo, la cantidad de etileno producida y la cantidad necesaria para inducir la maduración o senescencia varía entre frutos climatéricos (Martínez-Romero *et al.*, 2007) (Tabla 2). En éste sentido, los frutos de banano presentan una producción de etileno (PE) moderada (Hernández *et al.*, 2010), sin embargo, la sensibilidad de los frutos al etileno es muy alta, es decir, que bajas concentraciones ($0,03$ y $0,1 \mu\text{L L}^{-1}$) son suficientes para inducir la maduración de los frutos (Martínez-Romero *et al.*, 2007). La máxima PE reportada en banano es de alrededor de $9 \mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ (López-Gómez *et al.*, 1997), mientras que para el banano diploide IDN 110 se reportó una PE de $11,5 \mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a los 10 días de almacenamiento (Hubert *et al.*, 2010) y en bananito de $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a los 10 días de almacenamiento (Castro Benítez *et al.*, 2005).

El etileno juega un papel importante en la maduración de frutos climatéricos, mientras que en frutos no climatéricos, su papel no es claro (Adams-Phillips *et al.*, 2004), aunque se ha reportado su uso en el desverdizado de cítricos, debido al estímulo de la síntesis de carotenoides (Rodrigo y Zacarias, 2007) y también en la disminución de los daños por frío (Wang *et al.*, 2010). Esta hormona regula la maduración de los frutos climatéricos a nivel fisiológico, bioquímico y molecular. Los pasos descritos en la respuesta al etileno incluyen, su biosíntesis; el reconocimiento por parte de la célula mediante receptores; y la transducción de la cascada de señales (señalización), que conlleva a la regulación de la expresión de genes que codifican para las enzimas que participan en la maduración (Adams-Phillips *et al.*, 2004; Bapat *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista agrícola, el etileno juega un papel doble, debido a que presenta efectos benéficos, en frutos climatéricos, como el estímulo de la maduración y desarrollo de las características sensoriales requeridas por los consumidores, sin embargo, también acelera la velocidad de ésta y de la senescencia, haciendo difícil el almacenamiento; además, aumenta la susceptibilidad de los frutos al ataque de patógenos (Martínez-Romero *et al.*, 2007).

3.4. Biosíntesis de etileno

La biosíntesis de etileno es regulada por diversos factores como, hormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinosteroides), condiciones de estrés abiótico (inundación, sequía, salinidad) y biótico (ataque de insectos y patógenos), entre otros (Taiz y Zeiger, 2006; Sang-Dong *et al.*, 2009).

Tabla 2. Producción de etileno y sensibilidad en diversos productos agrícolas.

Producto	Producción de etileno ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Sensibilidad ($\mu\text{L L}^{-1}$)
Frutos climatéricos		
Chirimoya, Pasifloras, Zapote	(>100)***	(0,03-0,1)***
Manzana, Kiwi, Pera, Aguacate, Melón, Uchuva	(10-100)***	(>0,4)**
Banano, Plátano Albaricoque, Mango, Feijoa, Arazá	(1-10) **	(0,03-0,1) ***
Nectarina, Papaya, Durazno, Ciruela, Tomate	(1-10) **	(>0,4)**
Hortalizas y frutos no climatéricos		
Brócoli, Col, Repollo, Zanahoria	(<0,1)*	(0,01-0,02)***
Coliflor, Pepino cohombro, Lechuga, Caqui	(<0,1)*	(0,01-0,02)***
Papa, Espinaca, Fresa	(<0,1)*	(0,04-0,2)**
Esparrago, Frijol, Apio, Cítricos, Berenjena	(<0,1)*	(0,04-0,2)**
Cereza, Uva, Piña	(<0,1)*	(>0,2)*
Pimienta	(<0,1)*	(>0,2)*

*** Alta, ** moderada y * baja producción de etileno y sensibilidad. Adaptado de (Martínez-Romero *et al.*, 2007) y (Hernández *et al.*, 2010).

La ruta de biosíntesis de etileno se inicia a partir del aminoácido metionina en tres pasos (Figura 1): el primero, es la conversión de metionina a S-adenosil-L-metionina (SAM) catalizado por la enzima SAM sintetasa; el segundo, la formación de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) a partir de SAM mediante la enzima ACC sintasa (ACS) y el tercero, la conversión de ACC a etileno, catalizado por la ACC oxidasa (ACO), siendo éstas dos últimas las enzimas claves en el proceso de biosíntesis (Barry y Giovannoni, 2007; López-Gómez *et al.*, 1997) (Figura 1). La formación de ACC también lleva a la producción de 5'-metiltioadenosina (MTA), la cual es transformada a 5'-metiltioribosa (MTR) mediante la enzima MTA nucleosidasa, posteriormente MTR se fosforila por MTR quinasa para formar 5-metiltioribosa 1-fosfato, finalmente, se produce α -keto- γ ácido metiltiobutírico y metionina nuevamente (Bradford, 2008). Lo anterior se conoce como el ciclo de la metionina o ciclo de Yang por su descubridor (Shang Fa Yang), a través del cual, la metionina es reciclada, llevando a altas tasas de producción de etileno sin necesidad de contar con altos niveles de metionina intracelular (Barry y Giovannoni, 2007; Taiz y Zeiger, 2006).

En las plantas angiospermas se han reportado dos sistemas de biosíntesis de etileno: el sistema 1, funciona durante el crecimiento normal, en respuestas al estrés, en el estado pre-climatérico de frutos climatéricos y en todo el desarrollo de frutos no climatéricos. Éste sistema es el encargado de producir niveles basales de etileno en los tejidos y es considerado autoinhibitorio, es decir que la aplicación exógena de etileno mediante un mecanismo de retroalimentación negativa inhibe su propia biosíntesis. El sistema 2, ocurre durante la senescencia floral y la maduración de frutos climatéricos, éste sistema requiere de la expresión de nuevas isoformas de *ACS* y *ACO*, es un sistema autocatalítico y estimulado por el etileno exógeno mediante un mecanismo de retroalimentación positivo, así que antagonistas del etileno inhiben su producción (Mcmurchie *et al.*, 1972; Barry y Giovannoni, 2007; Bouzayen *et al.*, 2010; Bapat *et al.*, 2010). Las diferencias en los sistemas de producción de etileno, están relacionadas con la expresión de diferentes isoformas de los genes *ACS* y *ACO*, según el programa genético de la maduración, donde, algunas de estas, son expresadas en estados inmaduros (en tomate *Le-ACS1A* y *Le-ACS6*), mientras que otras, en estados de maduración avanzados (*Le-ACS4* y *Le-ACS2*), es decir que el etileno puede estimular la expresión (retroalimentación positiva) de algunos genes, mientras que inhibe la expresión de otros (retroalimentación negativa) (Seymour *et al.*, 2013).

3.5. Enzimas ACS (EC 4.4.1.14) y ACO (EC 1.4.3)

Las enzimas claves en la biosíntesis de etileno son ACS y ACO, las cuales se han estudiado extensamente en ámbitos bioquímicos y moleculares en diferentes especies. La enzima ACS representa el paso limitante de la velocidad de la reacción, mientras que ACO es conocida como la enzima que forma etileno (EFE) (Bleecker y Kende, 2000). La enzima ACO pertenece al grupo de enzimas oxidasas/oxigenasas dependientes de Fe-II que utilizan ascorbato como cofactor para su funcionamiento (Liu *et al.*, 1999). Por su parte, la enzima ACS, requiere como sustrato al fosfato de piridoxal (PLP) (Gapper *et al.*, 2013).

Estas dos enzimas son codificadas por una familia multigénica de 5 a 9 miembros que se expresan diferencialmente durante el desarrollo y la maduración del fruto, además en respuesta a diversas señales ambientales y hormonales (Bouzayen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). En banano (*Musa AAA*) se han reportado al menos 9 genes que codifican para ACS (*MA-ACSI-9*: *Musa acuminata* ACC sintasa), los cuales están ubicados en diferentes regiones del genoma (Huang *et al.*, 2006); además, se han descrito 3 genes que codifican para ACO (*MA-ACO1-3*; *Musa acuminata* ACC oxidasa) (Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, 2012). Diversos estudios han reportado a los genes *MA-ACO1* y *MA-ACSI* como los genes claves involucrados en la biosíntesis de etileno en banano (Xiao *et al.*, 2013), de hecho, Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié (2012), reportaron que en banano, los únicos genes responsables de la biosíntesis de etileno durante maduración son: *MA-ACSI*, *MA-ACO1* y

MA-ACO2, mientras que los demás, no juegan un papel importante. Por otro lado, en tomate existen al menos 8 genes *Le-ACS* y 6 *Le-ACO* (Nakatsuka *et al.*, 1997; Klee y Giovannoni, 2011) y en manzana 3 genes *Md-ACO* y *Md-ACS* (Costa *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013).

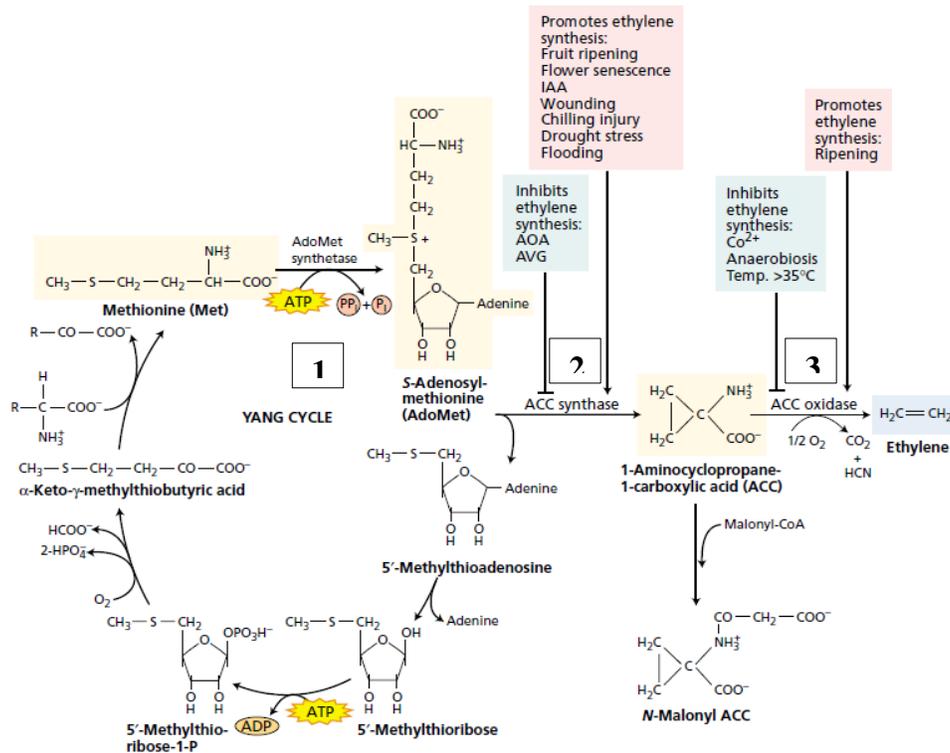


Figura 1. Ruta de biosíntesis de etileno en plantas. Tomado de Taiz y Zeiger, (2006).

Estudios filogenéticos han permitido afirmar que los miembros de la enzima ACO son altamente conservados, mientras que los miembros de la familia multigénica de ACS son estructurados en 3 tipos de acuerdo a los motivos (*motifs*) presentes en el dominio C-terminal de la proteína (Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, 2012). Tipo 1: proteínas con dominio C-terminal extendido con 3 residuos de serina conservados, los cuales son blancos para la fosforilación por proteínas kinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase 6*, MPK6) y kinasas dependientes de Ca (*Calcium dependent protein kinase*, CDPK), estas isoformas son activas cuando están fosforiladas, mientras que aquellas que no lo están, son degradadas por el proteosoma ubiquitina 26S. Algunos ejemplos son: en *Arabidopsis*: AtACS1, AtACS2, AtACS6; en Tomate: LeACS1A, LeACS1B, LeACS2, LeACS6; el tipo 2: son proteínas con dominio C-terminal corto con un solo sitio para CDPK (*Arabidopsis*: AtACS9, AtACS8, ACS5, AtACS4; Tomate: LeACS8, LeACS7,

LeACS3); el tipo 3: tienen el dominio C-terminal muy corto y carece de los sitios de fosforilación (*Arabidopsis*: AtACS11, AtACS7; Tomate: LeACS5, LeACS4) (Argueso *et al.*, 2007; Seymour *et al.*, 2013).

La secuencia de *MA-ACO1* en banano es de cerca de 900 pb, donde la región corriente abajo de la caja TATA en posición 851pb, presenta alta homología con secuencias de genes *ACO* en tomate y clavel, además la posición y el número de intrones (tres) del gen *MA-ACO1* en banano son idénticos a los encontrados en clavel y tomate (López-Gómez *et al.*, 1997). Por su parte, análisis filogenéticos han permitido clasificar a los genes *ACS* en tres grupos, uno compuesto por 3 miembros regulados por el etileno (*MA-ACS1*, *MA-ACS5* y *MA-ACS8*); otro compuesto por 4 miembros regulados por auxinas y/o por daños (*MA-ACS2*, *MA-ACS3*, *MA-ACS4* y *MA-ACS9*) y otros de regulación desconocida (*MA-ACS6* y *MA-ACS7*) (Huang *et al.*, 2006; Hubert y Mbégué-A-Mbégué, 2012). A su vez, los genes *ACS* pueden ser clasificados en 4 clases dependiendo del número y posición de los intrones, en donde *MA-ACS1* y *MA-ACS2*, presentan el mismo número (3) y posición de intrones, comparado con *At-ACS1* en *Arabidopsis* y *Le-ACS2* y *Le-ACS3* en tomate (Huang *et al.*, 2006; Karmawan, 2009). Con lo anterior, se puede afirmar que las diferencias en los genes *ACS* están asociadas a diferentes funciones en las plantas, por ejemplo, el gen *MA-ACS2* es inducido por daños, mientras que *MA-ACS4* es expresado constitutivamente durante la maduración, por lo cual su papel en este proceso parece no ser importante (Liu *et al.*, 1999; Inaba *et al.*, 2007).

La expresión de los genes *ACS* y *ACO* es regulada positiva o negativamente por factores bióticos y abióticos, dentro de los cuales se pueden citar: estrés, CO₂, etileno, auxinas, fotoperiodo (Choudhury *et al.*, 2008), concentración de O₂ (Asif *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010), tejido del fruto, estado de maduración (Liu *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2013) y antagonistas del etileno, como 1-Metoxiciclopropeno (1-MCP). Por ejemplo, en estado preclimático, el gen *MA-ACS1* no se expresa, mientras que *MA-ACO1* presenta un nivel basal de expresión constitutiva que aumenta con la maduración (Liu *et al.*, 1999; Pathak *et al.*, 2003). En general, la aplicación de etileno exógeno incrementa los niveles de transcritos (ARNm) de *ACS* y *ACO* en frutos climatéricos como: tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) (Nakatsuka *et al.*, 1997), manzana (*Malus domestica*) (Yang *et al.*, 2013), durazno (*Prunus persica*) (Mathooko *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012), banano triploide (*Musa* AAA) (López-Gómez *et al.*, 1997; Choudhury *et al.*, 2008; Inaba *et al.*, 2007), banano diploide (*Musa* AA) (Hubert *et al.*, 2010) pera (*Pyrus communis*) (Yamane *et al.*, 2007), gulupa (*Passiflora edulis* Sims) (Mita *et al.*, 1998) y en hortalizas como brócoli (*Brassica oleraceae*) (Ma *et al.*, 2008).

Por su parte, Barry y Giovannoni (2007) y Bouzayen *et al.* (2010) indicaron que la expresión de *LE-ACS2*, *LE-ACS4*, *LE-ACO1* y *LE-ACO4* en tomate incrementa en el pico climatérico (sistema 2), mientras que Nakatsuka *et al.* (1997) reportan que en estado pre-

climaterio (sistema 1: frutos verdes), existe una mayor expresión de *LE-ACS6* y *LE-ACS1A*. A su vez en manzana, el pico climaterio está acompañado por incremento de los niveles de transcritos de *ACO* y *ACS* (DalCin *et al.*, 2006), donde *Md-ACS1* parece ser el responsable del climaterio, mientras que *MdACS3* y *Md-ACS5A* parecen no estar asociados (Li *et al.*, 2010). Por su parte, en durazno, el gen *PP-ACO1* incrementa su expresión durante la maduración (Mathooko *et al.*, 2004). En aguacate la expresión de *PA-ACS1* alcanza su máximo valor antes del pico climaterio, mientras que *PA-ACO* solo se incrementa después del climaterio (Owino *et al.*, 2002).

En banano, *MA-ACS1*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2* son los únicos genes responsables de la maduración (Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, 2013). López-Gómez, *et al.* (1997) reportaron que la maduración en banano inicia en la pulpa, lo cual está correlacionado con mayor expresión de *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACS1* en éste tejido. Estos autores aseguran que los niveles de transcritos de *ACO* en la epidermis de banano, sólo son detectados en el estado climaterio y de post-climaterio, pero no en etapa pre-climaterio. Hubert *et al.* (2010) reportaron para el banano diploide IDN 110 que el gen *MA-ACS1* incrementa continuamente desde el estado verde-inmaduro hasta el estado de sobremaduración, luego de lo cual disminuye su expresión. A su vez, los genes *MA-ACO1* y *MA-ACO2* presentan máxima expresión en estado maduro, en donde *MA-ACO1* es expresado 100 veces más comparado con *MA-ACO2*.

3.6. Señalización celular por el etileno

El tomate y el melón han sido los frutos modelo para estudiar la maduración a nivel molecular (Owino y Ezura 2008; Ezura y Owino, 2008). La señalización inicia con la unión del etileno a un grupo de receptores proteicos (con diferentes isoformas), lo cual induce una secuencia de señales que conllevan a la expresión de genes relacionados con enzimas implicadas en la maduración (Kesari *et al.*, 2007). Los receptores de etileno son proteínas transmembranales del retículo endoplasmático codificadas por una familia multigénica estructuralmente diferentes pero funcionalmente redundantes (Hall *et al.*, 2007; Binder, 2008; Lacey y Binder, 2014). En *Arabidopsis* se han reportado 5 receptores de etileno, ETR1-2, ERS1-2 y EIN4 (Klee y Giovannoni, 2011); en tomate 7 receptores (LeETR1-7, NR (también referido como LeETR3) (Barry y Giovannoni, 2007); en manzana 5 (MdETR1, MdETR2, MdETR5, MdERS1, MdERS2) (Yang *et al.*, 2013) y en brócoli 3 (Bo-ERS1, Bo-ETR1 y Bo-ETR2 (Ma *et al.*, 2008).

Los receptores se han clasificado en 2 subfamilias de acuerdo a su estructura, donde la subfamilia I presenta 3 elementos transmembranales cerca al dominio N-terminal (sensor), mientras que la subfamilia II tiene cuatro elementos. Los demás dominios (GAF; *Histidine kinase* HK y receptor) son conservados, no obstante, dentro del dominio HK, la subfamilia

I presenta 4 elementos, mientras que la subfamilia II sólo presenta algunos (Owino y Ezura, 2008; Lacey and Binder, 2014) (Fig 2). En cuanto a la estructura de los genes que codifican para los receptores, Theologis (1998) reportó que los intrones son conservados en su posición dentro de cada familia pero no entre las 2 subfamilias. La unión del etileno es mediada por un cofactor cúprico (Cu(I)), el cual es llevado a los receptores por medio del transportador RAN1 (Cervantes, 2002; Lacey y Binder, 2014).

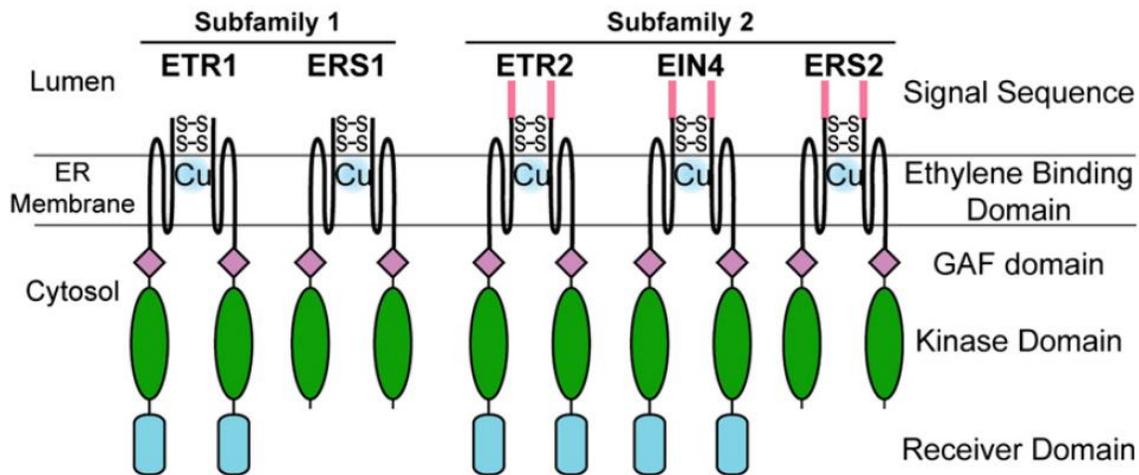


Figura 2. Estructura de las subfamilias de receptores de etileno en *Arabidopsis*. Tomado de Lacey y Binder, (2014).

Con lo anterior se puede afirmar que existen diferencias estructurales en las proteínas de los receptores, sin embargo, su función se considera redundante. En éste sentido, Binder, (2008) afirman que todos los receptores contribuyen a la señalización del etileno, existiendo un solapamiento funcional entre las diferentes isoformas. Por ejemplo, los receptores ETR1, ETR2, EIN4 y ERS2 tienen funciones redundantes en la señalización del etileno, por lo cual, mutaciones simples en dichos genes no ocasionan pérdida de la sensibilidad al etileno (Theologis, 1998). A pesar de que existen funciones redundantes entre receptores, se ha encontrado que dichos genes son inducidos diferencialmente por el etileno, lo que sugiere que cada receptor tiene una afinidad diferente por esta hormona (Theologis, 1998). Por su parte, Binder, (2008) afirman que todos los receptores no son redundantes en su totalidad, debido a algunas mutaciones dobles en estos genes no pueden ser compensadas con otros genes de receptores, lo que sugiere que algunos receptores presentan mayor importancia durante la maduración que otros.

Corriente abajo de los receptores se encuentra CTR1, la cual es una proteína quinasa Raf-like ser/thr con similitud en su dominio C-terminal a la proteína encontrada en mamíferos

MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) (Chen *et al.*, 2005; Czarny *et al.*, 2006). CTR1 se localiza en el retículo endoplasmático interactuando con los receptores (Barry y Giovannoni, 2007), CTR1 tiene todos los subdominios conservados para la actividad quinasa, por tanto la homología de CTR1 a MAPKKK implica que la señalización ocurre mediante una cascada de fosforilaciones MAP-quinasa (Adams-Phillips *et al.*, 2004). CTR1 es un regulador negativo de la señalización de etileno, es decir que cuando está activo, se produce una cascada de fosforilaciones que impiden la activación del factor de transcripción EIN2 ubicado corriente debajo de CTR1 (Chen *et al.*, 2005), no obstante, cuando el etileno se une al receptor se genera un cambio conformacional que impide la interacción receptor-CTR1, resultando en la inhibición de la cascada de fosforilaciones de CTR1, activando la vía de señalización (Stepanova y Alonso, 2009; Ju *et al.*, 2012) (Fig 3). A pesar de ser un regulador negativo, su presencia es indispensable para la respuesta al etileno, por ejemplo, en banano, se ha reportado que la expresión de *MhCTR1* aumenta justo antes del aumento de la producción de etileno, lo cual corrobora la indispensabilidad de CTR1 para activar la señalización por el etileno (Hu *et al.*, 2012).

EIN2 es una proteína de membrana transportadora de metales con similitud a la familia portadores de iones metálicos Nramp (Adams-Phillips *et al.*, 2004). EIN2 es un regulador positivo clave en la vía de transducción de señal de etileno (Czarny *et al.*, 2006), el cual puede ser considerado un punto de convergencia común de múltiples vías de señalización, incluyendo la del ácido abscísico, auxinas, citoquininas y jasmonatos (Adams-Phillips *et al.*, 2004). En presencia de etileno, la proteína CTR1 presenta un cambio conformacional que impide la cascada de fosforilaciones, lo cual resulta en la escisión del dominio C-terminal de EIN2, el cual a su vez, es transportado al núcleo, en donde actúa como un factor de transcripción (EIN3/EIL1) que induce la expresión de numerosos genes relacionados con la maduración (Ju *et al.*, 2012) (Fig 3).

EIN3 es un factor de transcripción, regulador positivo de las respuestas al etileno (Barry y Giovannoni, 2007). En respuesta al etileno, EIN3 y EIL1 son estabilizados y acumulados en el núcleo para la expresión de los factores de transcripción ERF1 y EBF2 (Sang-Dong *et al.*, 2009). EIN3 se une a un motivo (*motif*) conocido como elemento primario de respuesta al etileno (PERE) que está presente en los promotores de los genes *ERF1* y varios genes relacionados con la senescencia y maduración de frutos (Barry y Giovannoni, 2007). Es decir, que EIN3 puede inducir directamente la expresión de algunos genes relacionados con la maduración o la expresión de otros genes que codifican para factores de transcripción (ERF1). En éste sentido, para banano, se han reportado 15 genes que codifican para ERF (*MaERF1* a *MaERF15*), algunos de los cuales pueden unirse directamente a los promotores de los genes *MA-ACS* y *MA-ACO* induciendo su expresión durante la maduración (Xiao *et al.*, 2013).

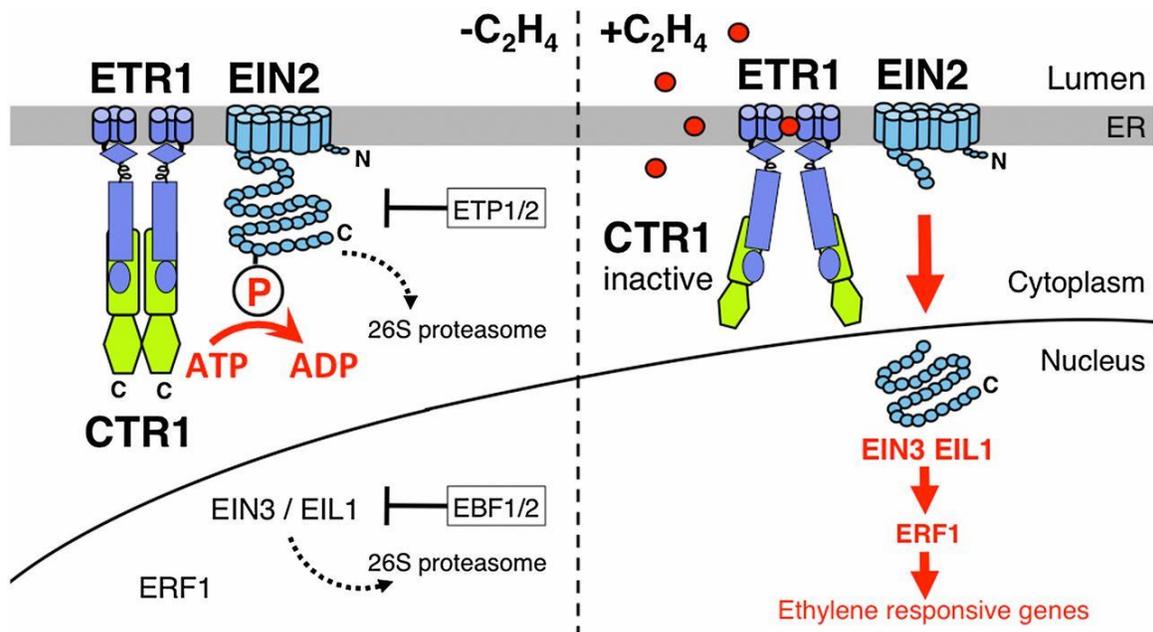


Figura 3. Modelo de la señalización de etileno, en donde se muestra el papel de CTR1. Tomado de Ju *et al.* (2012).

3.7. Antagonistas del etileno

La principal estrategia de conservación en poscosecha es el manejo del etileno, ya sea disminuyendo los niveles en la atmósfera, bloqueando su síntesis o su acción elicitora (Ayoub *et al.*, 1976; Martínez-Romero *et al.*, 2007). Existen una serie de compuestos que disminuyen los efectos del etileno, como, citoquininas, CO₂, óxido nítrico, óxido nitroso, rhizobitoxina y diferentes alquenos cíclicos (Alexieva *et al.*, 2004). Además, la literatura reporta diferentes compuestos inhibidores de la biosíntesis de etileno, como: inhibidores de ACS (AVG y AOA); compuestos que afectan la actividad de ACO (CO₂, etanol, acetaldehído) y compuestos que compiten por el aminoácido metionina (Poliaminas) (Martínez-Romero *et al.*, 2007). A nivel de receptor se reportan al STS (tiosulfato de plata), NBD (2,5 - norbornadieno), DACP (diazociclo pentadieno), olefinas cíclicas como el 1-MCP (1-metilciclopropeno) como bloqueadores de la acción elicitora del etileno (Arora, 2008; Paul y Pandey, 2013), sin embargo, los primeros 3 no se pueden usar en alimentos por ser altamente tóxicos. Otra opción para disminuir los efectos inducidos por el etileno, es el uso de agentes oxidantes como KMnO₄, no obstante, éste no puede estar en contacto directo con los alimentos (Martínez-Romero *et al.*, 2007).

Una de las principales limitantes del uso de dichos compuestos en poscosecha de frutas y hortalizas es su toxicidad, en éste sentido el STS es altamente tóxico para el ambiente y

para los humanos (Grichko, 2006); el DACP es altamente reactivo, poco estable y tóxico; el NBD presenta un olor altamente desagradable (Reid y Staby, 2008). Por el contrario el 1-MCP dispone de un modo de acción no tóxico y es químicamente similar a las sustancias de origen natural (Blankenship y Dole, 2003). El 1-MCP no es tóxico para el ser humano ni para el ambiente, además, fue registrado como un químico GRAS (*generally recognized as safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) en el 2004 y como un compuesto seguro “*safer*” por la EPA (*Environmental Protection Agency*) en el 2002. Los productos comerciales de 1-MCP son EthylBloc[®], SamartFresh[™], SmartTabs[™] y EthylBloc[™], los cuales contienen 0, 14, 3,3, 0,43 y 0.014 % de 1-MCP respectivamente. Cuando estos productos son mezclados con agua u otras soluciones tampón, liberan el 1-MCP en forma de gas (FAO, 2010). Además, recientemente se ha reportado la aplicación en pre-cosecha y poscosecha de 1-MCP en forma de aspersión con el producto Harvista[™] (Varanasi *et al.*, 2013) y para el tratamiento por inmersión de los frutos con la formulación ‘AFxRD-300’ (2 % de 1-MCP) (Paul y Pandey, 2013).

Varias investigaciones han demostrado que 1-MCP no es tóxico para los seres humanos y su residualidad es insignificante, debido a que actúa a concentraciones muy bajas, del orden de partes por billón (ppb) (Lurie y Paliyath, 2008). La toxicidad en animales y seres humanos, son bajas, en donde, la DL50 por ingestión en ratas fue mayor a 5 kg kg⁻¹, ubicándolo en la categoría toxicológica IV. Además, el 1-MCP no es un agente mustagénico. Por lo cual se aprobó para la aplicación en más de 20 países, incluyendo, Austria, Bélgica, Francia y España, entre otros, (EPA, 2002).

3.8. 1-Metilciclopropeno

Los estudios del 1-MCP parten de la investigación realizada por Edward Sisler en la Universidad de Carolina del Norte desde 1984. Sisler sintetizó varias olefinas (compuestos con propiedades parecidas al etileno) como el 2,5-norboARNdieno, DACP y 1-MCP inicialmente llamado SIS-X, encontrando un mejor comportamiento del 1-MCP (Reid y Staby, 2008). El papel del 1-MCP en la ciencia y la tecnología poscosecha es doble, debido a que por un lado proporciona una tecnología eficiente y simple para preservar la calidad de frutas y hortalizas, aumentando la vida útil y manteniendo la calidad de los productos agrícolas frescos (Nanthachai *et al.*, 2007). Además, el 1-MCP es una herramienta en la investigación de los mecanismos moleculares fundamentales que intervienen en la regulación de la maduración y senescencia de los frutos, debido a que bloquea la vía de señalización del etileno (Blankenship y Dole 2003; Lurie y Paliyath, 2008).

A nivel estructural el 1-MCP (C₄H₆) es una olefina cíclica (Fig 4), análoga al producto de la descomposición del DACP, teniendo una función similar, pero menos tóxica y más estable bajo condiciones normales (Serek *et al.*, 1995). Bajo condiciones ambientales el 1-MCP es

un gas, razón por la cual se utiliza α -ciclodextrina para realizar formulaciones comerciales en polvo que liberan el 1-MCP cuando se mezclan con el agua (Blankenship y Dole, 2003).

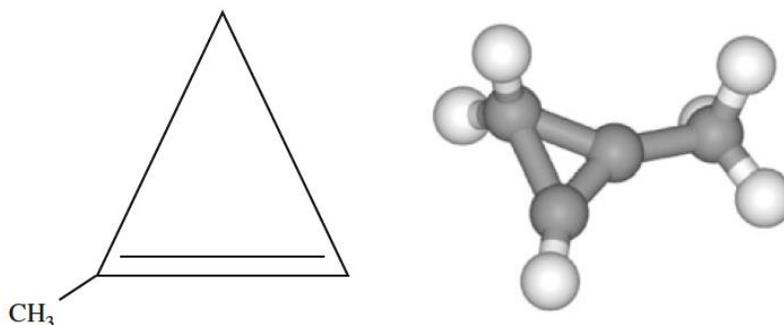


Figura 4. Estructura molecular del 1-MCP.

El mecanismo de acción del 1-MCP se realiza mediante el bloqueo de los receptores de etileno, con lo cual se inhiben o retrasan las respuestas inducidas por ésta hormona en los tejidos de la planta, por largos periodos de tiempo (Jiang y Joyce, 2003), reduciendo las pérdidas en poscosecha de frutos climatéricos e incluso en frutos no climatéricos (Valero *et al.*, 2004). Sisler *et al.* (1996), reportan que el 1-MCP se une de manera irreversible a los receptores de etileno, bloqueando la cascada de transducción de señales que conllevan a la expresión de genes relacionados con la respuesta al etileno (Pathak *et al.*, 2003; Blankenship y Dole 2003). El 1-MCP es una molécula con un grupo metilo unido a un doble enlace, con estructura de aleno, y es probable que esta sea la razón de la capacidad de unirse al Cu(I) presente en los receptores (Sisler y Serek, 1997).

La efectividad del bloqueo de los receptores por el 1-MCP está dada por la muy baja constante de inhibición ($K_i = 2-8 \text{ nL L}^{-1}$), comparado con la constante del etileno ($K_d = 36 \text{ nL L}^{-1}$) (Serek *et al.*, 1995), es decir que el 1-MCP presenta al menos 10 veces mayor afinidad por los receptores comparado con el etileno (Sisler y Serek 1997). Si bien, la unión del 1-MCP a los receptores es irreversible (Sisler *et al.*, 1996; Blankenship y Dole, 2003), también se ha reportado que los tejidos pueden sintetizar nuevos receptores a los que puede unirse el etileno y desencadenar la secuencia de señales que llevan a la expresión de genes durante la maduración (Sisler *et al.*, 1996; Cameron y Reid, 2001; Blankenship y Dole, 2003); es decir, que el 1-MCP sólo inhibe temporalmente la síntesis de receptores (In *et al.*, 2013). La síntesis de nuevos receptores lleva a la recuperación de la sensibilidad de los tejidos al etileno, por lo tanto, en teoría los frutos recuperan la capacidad de madurar normalmente. Se ha reportado que el tratamiento con 1-MCP inhibe la maduración por 10 días en aguacate (Blankenship y Dole, 2003), 5-10 días en tomate y 12 días en clavel y

banano (Sisler y Serek, 1997), sin embargo, posteriormente los frutos maduran normalmente.

3.8.1. Factores que afectan la eficacia del 1-Metilciclopropeno

Existen diferentes factores que influyen en la respuesta al tratamiento con 1-MCP, los cuales incluyen: cultivar, estado de desarrollo, tiempo de la cosecha al tratamiento, múltiples aplicaciones y temperatura durante el tratamiento, entre otros (Blankenship y Dole, 2003; Park, 2012). Paul y Pandey, (2013) clasificaron los factores en dos grupos: (1) aquellos relacionados directamente con el fruto (especie, variedad, cultivar, estado de madurez, velocidad de maduración, nivel interno de etileno, características morfológicas y anatómicas, cantidad de receptores, sitios no blanco de unión al 1-MCP, capacidad de regeneración de receptores) y (2) aquellos relacionados con el ambiente (tiempo entre la cosecha y el tratamiento con 1-MCP, temperatura durante la aplicación, duración del tratamiento, concentración del 1-MCP). En banano, los factores más importantes que influyen en la respuesta al 1-MCP son estado de madurez y la interacción entre la concentración de 1-MCP y tiempo de tratamiento (Jiang y Joyce, 2003), en donde a mayor concentración, menor es el tiempo de tratamiento requerido (Jiang *et al.*, 1999b). La importancia del estado de madurez, cultivar y las variables de exposición (tiempo, temperatura y concentración) son complejas y siguen siendo el foco de muchas investigaciones (Watkins, 2006).

La concentración de 1-MCP óptima para bloquear la acción de etileno, varía entre especies, pero normalmente se encuentra en el rango de 1 nL L^{-1} a $100 \text{ }\mu\text{L L}^{-1}$, mientras que el tiempo de tratamiento oscila entre 2 y 36 h (Blankenship y Dole, 2003). En banano, no se reporta una dosis óptima y las investigaciones realizadas muestran aplicaciones desde 3 nL L^{-1} hasta $30 \text{ }\mu\text{L L}^{-1}$, con diferencias en la respuesta durante la maduración, a su vez, el tiempo de tratamiento varía entre 0 y 24 h. Jiang *et al.*, (1999b) reportan que una dosis de $1 \text{ }\mu\text{L L}^{-1}$ es efectiva para reducir los efectos negativos del etileno y prolongar la vida en poscosecha de banano, aunque se observa una respuesta favorable a concentraciones inferiores. Sin embargo, concentraciones demasiado altas ($30 \text{ }\mu\text{L L}^{-1}$) afectan de manera irreversible la maduración (Bagnato *et al.*, 2003), llevando a una coloración desuniforme de la epidermis. Resultados similares fueron reportados por Pardo y Rubio, (2004) con concentraciones de $1,89 \text{ }\mu\text{L L}^{-1}$.

3.8.2. Algunos estudios de caso.

A partir del descubrimiento del 1-MCP se han realizado diversos estudios que han mostrado un efecto significativo en la disminución de la maduración de diversos productos agrícolas. Las concentraciones óptimas varían entre especies, Blankenship y Dole (2003) realizaron una revisión, en donde se muestra que las concentraciones oscilan entre $0,01 \mu\text{L L}^{-1}$ y $100 \mu\text{L L}^{-1}$ con un tiempo de tratamiento entre 2 y 36 horas. Entre los frutos se puede citar estudios realizados en banano por Jiang *et al.* (1999), Jiang y Joyce, (2003); Chang-Yuen y Sáenz (2005) y Zhang *et al.* (2006), encontrando disminución de la maduración, del ablandamiento, de la emisión de volátiles, del pico respiratorio, de la actividad de ACO y ACS, y aumento de la vida en poscosecha. En mango, Singh *et al.* (2007) reportaron que con la aplicación de 1-MCP se logró el mantenimiento de la firmeza del fruto y la inhibición de la actividad de las enzimas catalasa, súper oxido dismutasa y ascorbato peroxidasa, lo cual afectó el balance en el metabolismo del oxígeno.

En pera Mahajan *et al.* (2010), reportan disminución de la pérdida de peso, mantenimiento de la firmeza y calidad, aumentando la vida poscosecha. En fresa (Tian *et al.*, 2000) se detectó una disminución de la respiración. En papaya, Thumdee *et al.* (2010) reportaron que el 1-MCP retrasa la producción de etileno, la respiración climatérica, el desarrollo de color de la epidermis, y el ablandamiento, sin afectar el contenido de sólidos solubles totales y la pérdida de peso. En melón el uso de 1-MCP inhibió la actividad de las enzimas poligalacturonasa (PG), β -galactosidasa (β -gal) y β -galactanasa, manteniendo la firmeza de los frutos (Supapvanich y Tucker, 2011). En flores de corte (Serek *et al.*, 1995) hubo un incremento de la vida en florero. En granadilla, Dussan *et al.* (2011) reportaron un incremento de la vida útil con el uso de 1-MCP, conservando las características organolépticas como sabor y color. En mangostino, se logró aumentar la vida en poscosecha, disminuyendo los niveles de producción de etileno y niveles de ACC y ACO en la epidermis, pero no en la pulpa (Piriyavinit *et al.*, 2011).

A nivel molecular se ha encontrado que el 1-MCP afecta la expresión de genes relacionados con la maduración. El 1-MCP disminuye la acumulación de transcritos (ARNm) de genes relacionados con la biosíntesis de etileno ACS y ACO, con lo cual se disminuye la producción de etileno y se retrasa la maduración. Por ejemplo en manzana, el 1-MCP disminuyó la expresión de los genes *MdACS1*, *MdACO1* y *MdACO2* (Yang *et al.*, 2013); en banano, de los genes *MA-ACS1* y *MA-ACO* (Golding *et al.*, 1999; Inaba *et al.*, 2007); en tomate, de *LeACS2* y *LeACS4* (Klee y Giovannoni, 2011); en durazno, de *PpACO* (Zhang *et al.*, 2012); en nectarinas, de *ACS*, *ACO1* y *PaACO2* (Bregoli *et al.*, 2005), incluso en brócoli, de *BoACS2* (Ma *et al.*, 2009). Además, el 1-MCP también afecta la expresión de genes que codifican para receptores de etileno, como *BoERS*; *BoETR1*; *BoETR2* en brócoli (Ma *et al.*, 2009); *PaERS1* en aguacate (Owino *et al.*, 2002). Otros estudios muestran que el 1-MCP también reduce el ablandamiento de los frutos, debido a que disminuye la expresión

de genes relacionados con enzimas que degradan paredes celulares, por ejemplo, *AcXET* (xyloglucano endotrans glicosilasas) y *AcEXP* (expansinas) en chirimoya (Li *et al.*, 2009).

Hasta la fecha no se han reportado estudios del efecto del 1-MCP en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis del etileno en frutos de bananito durante la etapa poscosecha, lo cual supone una oportunidad importante para el estudio a nivel molecular de la maduración de estos frutos, teniendo en cuenta que son altamente perecederos.

3.9. Cuantificación de la Expresión de genes usando PCR en tiempo real

La expresión génica es un proceso esencial de los virus y todas las formas de vida, incluyendo las células eucariotas y procariotas, para generar productos macromoleculares indispensables para la vida y regular el metabolismo celular, entre otros procesos (Farsani y Mahdavi, 2011). La expresión de genes se refiere a los niveles de transcriptos de ARN mensajero (ARNm) presentes en la células (VanGuilder *et al.*, 2008), los cuales varían en tiempo, espacio y dependen de los diferentes tipos de células y de las condiciones ambientales (Farsani y Mahdavi, 2011). Existen diferentes métodos para determinar cuantitativamente la expresión de genes, dentro de los cuales se pueden citar: el *northern blot*, el análisis serial de expresión génica (SAGE), el análisis rápido de expresión génica (RAGE), los microarreglos (*microarrays*) y las variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), conocidos como PCR semicuantitativo (qPCR) y PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (Real Time-quantitative PCR o RT-qPCR) (Roth, 2002).

La PCR tradicional o de punto final (*End Point*) es una técnica de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos que se basa en tres pasos: denaturación, anillamiento y extensión, los cuales se realizan de manera cíclica y a través de cambios de temperatura y tiempos definidos en un termociclador (Bowyer, 2007). En general, la PCR puede ser dividida en cuatro fases: fase de ruido de fondo, fase exponencial, fase lineal y fase de meseta. La fase exponencial presenta una cinética exponencial, en la cual, la cantidad de molde (ADN o ADN complementario, ADNc) es duplicado en cada ciclo de PCR, siempre y cuando la eficiencia de la PCR sea del 100 % (Evrard *et al.*, 2010). Cuando se parte de ARN es necesario primero realizar una reacción de transcripción reversa para obtener ADNc, esta variante se conoce como PCR reverso, la cual permite detectar los transcriptos y por tanto analizar la expresión génica (Farsani y Mahdavi, 2011).

En la PCR de tiempo final como en la qPCR, los productos de la PCR son sometidos a gel de electroforesis y tinción con bromuro de etidio para determinar la concentración de ADN final con radiación UV. Sin embargo, ésta metodología no es muy adecuada, debido a que

implica manipulación del ADN posterior a la PCR, además la cuantificación no es altamente fiable, puesto que al final de la PCR (meseta) diferentes muestras alcanzan el mismo nivel de concentración, aun cuando la cantidad inicial de molde es diferente (Roth, 2002; VanGuilder *et al.*, 2008).

La RT-qPCR permite no solo detectar e identificar sino también cuantificar el producto amplificado a través del uso de agentes fluorescentes que interactúan con el ADN/ADNc mientras éste amplifica, por lo tanto, la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto producido (Evrard *et al.*, 2010). Ésta técnica requiere de un termociclador especial, capaz de registrar en tiempo real la fluorescencia emitida, producto de la amplificación del molde, lo cual la hace que sea una técnica costosa de implementar (Giulietti *et al.*, 2001). Existen diferentes tecnologías de fluorescencia usadas para la cuantificación durante la RT-qPCR. Dependiendo de la tecnología, la señal de fluorescencia es generada en diferentes etapas de la PCR (VanGuilder *et al.*, 2008). – Algunos de los compuestos fluorescentes utilizados en la RT-qPCR son: bromuro de etidio, Sybr Green I (SG), PicoGreen (PG), sondas de hidrolisis Taqman, sondas fluorescentes de oligonucleótidos, sondas de hibridación, *beacons* moleculares, entre otros (Evrard *et al.*, 2010).

Los compuestos más utilizados son el SYBR Green y las sondas Taqman (VanGuilder *et al.*, 2008). El colorante SYBR Green se une al surco menor de todos los DNA de doble cadena (dsDNA) cada 10pb, generando fluorescencia que es absorbida a 530nm. Con lo anterior, a medida que la polimerasa amplifica las secuencias de DNA blanco, los productos de PCR de dsDNA incrementan, por tanto se incrementa la señal fluorescente (Evrard *et al.*, 2010). El SYBR Green es fácil de usar y es económico, sin embargo, la unión al DNA no es selectiva y pueden generar falsos positivos cuando se presentan dímeros de Primers (Bowyer, 2007). Por su parte, la sonda 5' nucleasa Taqman, tiene un reportero fluorescente unido al terminal 5' y un quencher (extintor) al extremo 3'. La sonda se une a una secuencia específica del DNA molde entre el primer sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*), con lo cual, cuando ocurre la polimerización por la Taq polimerasa, con su actividad exonucleasa ocasiona la liberación del reportero, generando una señal de fluorescencia (Roth, 2002).

La cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real, consiste en determinar el ciclo umbral (C_t) o punto de cruce de (C_p), que corresponde al número del ciclo en el cual la señal de fluorescencia es significativamente más fuerte que el ruido de fondo, es decir ocurre en la fase exponencial temprana (Evrard *et al.*, 2010). El C_t es inversamente proporcional a la concentración inicial del molde (q_0) (cADN), por lo tanto, el número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar el C_t será bajo cuando el q_0 sea alto, es decir, a mayor cantidad de transcritos (ARNm) del gen de interés, mayor expresión del gen (Fig 5) (Evrard *et al.*, 2009). Hasta el momento, se han reportado dos formas de cuantificación:

absoluta y relativa. En la cuantificación absoluta, se determina el q_0 utilizando curvas de diluciones seriadas de ARN o cADN, y se conoce el número de copias exacto de un gen de interés (Pfaffl, 2006). La cuantificación comparativa o relativa, utiliza un gen de referencia “house keeping”, en donde su expresión es relativa a un gen blanco o de interés (Livak y Schmittgen, 2001). Este último tipo de cuantificación no requiere de una curva de calibración, sin embargo, se debe asegurar que la expresión del gen de referencia sea constitutiva y que no cambie con las condiciones experimentales, ni a través del tiempo (Pfaffl, 2006). Los genes de referencia más utilizados son Actina, β -actina, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), 16S ARNr, entre otros (Roth, 2002; Platts *et al.*, 2008). En estudios de expresión génica en banano, el gen de referencia más utilizado es *ACT* (Zhang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Inaba *et al.*, 2007; Hubert *et al.*, 2010).

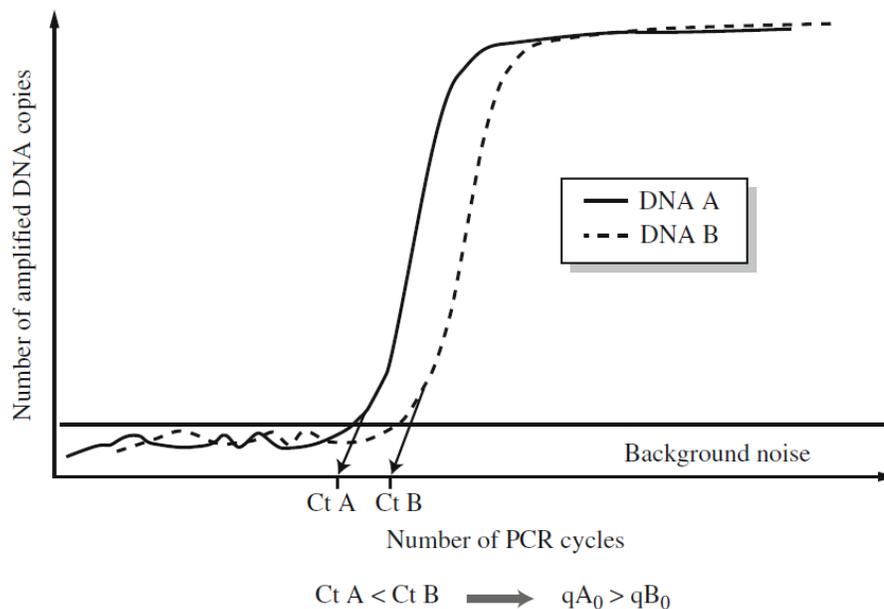


Figura 5. Curva de amplificación por PCR en tiempo real, mostrando la relación entre el Ct y el q_0 . Tomado de (Evrard *et al.*, 2009).

Los métodos de cuantificación relativa pueden ser resumidos como métodos ΔC_p , es decir la diferencia entre el Ct del gen de interés y el gen de referencia. Una variación del método, es el $\Delta\Delta C_p$ ó $\Delta\Delta C_t$, el cual contempla otros aspectos, como el uso de calibradores (punto cero, inicio de maduración, y muestras sin tratamiento, entre otros) (Livak y Schmittgen, 2001). Existen diferentes métodos matemáticos para determinar la relación de expresión relativa (R), en donde, las unidades utilizadas son irrelevantes, y pueden ser comparadas a través de múltiples experimentos que involucren RT-qPCR (Pfaffl, 2006). Los modelos matemáticos más utilizados, son los reportados por Pfaffl (2001), el cual contempla la corrección de la eficiencia de la PCR y el método propuesto por Livak y Schmittgen (2001), que asume que la eficiencia de la PCR es cercana al 100 % y que las muestras no tienen diferencias de eficiencia de más del 10 %.

3.10. Literatura citada

- Adams-Phillips, L., C. Barry y J. Giovannoni. 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 9(7), 331-338.
- Agronet. 2014. Estadísticas de área, producción y rendimiento del cultivo de bananito en Colombia. www.agronet.gov.co.
- Alexieva, V., I. Sergiev., D. Todorova., E. Karanov y A. Smith. 2004. Effect of ethylene and its antagonist 1-MCP on the senescence of detached leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*. 48 (4), 593-595.
- Amortegui, I. 2001. El cultivo del bocadillo. Modulo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural. PROHACIENDO. Ibague. Colombia. 21p.
- Argueso, C., M Hansen y J. Kieber. 2007. Regulation of Ethylene Biosynthesis. *J Plant Growth Regul.* 26, 92–105.
- Arora, A. 2008. Biochemistry of Flower Senescence. . En: Paliyath, G., D. Murr., A. Handa y S. Lurie. 2008. *Postharvest Biology and Technology of fruits, vegetables, and flowers*. Ed: Wiley-Blackwell Publishing. New Delhi, India. 51-85p.
- Asif, M., P. Dhawan y P. Nath. 2000. A Simple Procedure for the Isolation of High Quality ARN from Ripening Banana Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*. 18, 109-115.
- Asif, M., N. Pathak, T. Solomos y P. Trivedi. 2009. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in Apple Manzana Granny Smith. *S. Afr. J. Bot.* 75, 137-144.
- Asohofrucol. 2014. Análisis de las importaciones y exportaciones hortifrutícolas durante el año 2013. *Revista de la Asociación Hortofrutícola de Colombia, ASOHOFrucol*. 22-23p.
- Ayoub, J., M, Driver., H, Kim., A, Barret y Taub, I. 1976. Use of ethylene absorbers in extending produce shelf life.
- Bagnato, N., Barrett, R., Sedgley, M., Klieber, A., 2003. The effects on the quality of Cavendish bananas, which have been treated with ethylene, of exposure to 1-methylcyclopropene. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38, 745–750.
- Bapat, V., P. Trivedi. A. Gosh. V. Sane. T. Ganapathi y P. Nath. 2010. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*. 28, 94–107.
- Barry, C y J. Giovannoni. 2007. Ethylene and Fruit Ripening. *J Plant.Growth.Regul.* 26,143–159.
- Binder, 2008. The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. *Plant Science* 175 (2008) 8–17.
- Blankenship, S y J. Dole. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*. 28, 1-25.

- Bleecker, A y H. Kende. 2000. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 1–18.
- Botondi, R., De Sanctis, F., Bartoloni, S., Mencarelli, F., 2014. Simultaneous application of ethylene and 1-MCP affects banana ripening features during storage. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2170–2178.
- Bouzayen, M., A. Latché. P. Nath y J. Pech. 2010. Mechanism of Fruit Ripening. Capítulo 16. En: Pua, E y M. Davey. 2010. *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*. Volume 1. Ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 319-339p.
- Bowyer, V. 2007. Real-Time PCR. *Forensic Science, Medicine, and Pathology.* 3(1), 61-63.
- Bradford, K. 2008. Shang Fa Yang: Pioneer in plant ethylene biochemistry. *Plant Science.* 175, 2–7.
- Bregoli, A. V. Ziosi. S. Biondi. A. Rasori. M. Ciccioni. G. Costa. P. Torrigiani. 2005. Postharvest 1-methylcyclopropene application in ripening control of ‘Stark Red Gold’ nectarines: Temperature-dependent effects on ethylene production and biosynthetic gene expression, fruit quality, and polyamine levels. *Postharvest Biology and Technology.* 37, 111–121.
- Castellanos, D., N. Algeciray C. Villota. 2011. Aspectos relevantes en el almacenamiento de banano en empaques con atmósferas modificadas. *Rev. Iber. Postcosecha.* 12(2), 114-134.
- Cameron, A.C., Reid, M.S., 2001. 1-MCP blocks ethylene-induced petal abscission of *Pelargonium peltatum* but the effect is transient. *Postharvest Biol. Technol.* 22, 169–177.
- Castro, B y Restrepo, L. 2004. Efectos de tratamientos postcosecha sobre la prolongación de la maduración del baby banano. (*Musa accuminata*). XVI reunión internacional ACORBAT. 273- 274.
- Castro Benítez, M., Restrepo Sánchez, L.P., Narváez Cuenca, C.E., 2005. Actividad de clorofilasa durante la maduración del banano bocadillo (*Musa accuminata*) (Simons). *Actual. Biológicas* 27, 151–158.
- Castro, B., G. Jerz, P. Winterhalter y R. Restrepo. 2008. Degradación de la clorofila en la corteza del baby banano (*Musa acuminata*) durante diferentes estados de maduración. *Memorias VIII Congreso Nacional del Color.* 19-21 Septiembre, 2007. Madrid.
- Cervantes, E. 2002. Ethylene: new interactions, still ripening. *Trends in plant science.* Meeting report. 2p.
- Chang-Yuen, K y Sáenz, V. 2005. Efecto del 1-Metil-ciclopropeno (1-MCP) en la maduración de banano. *Agronomía Costarricense* 29(3): 211-220.
- Chen, Y., N. Etheridge y E. Schaler. 2005. Ethylene signal transduction. *Annals of Botany* 95, 901–915.
- Choudhury, S.R., Roy, S., Sengupta, D.N., 2008. Characterization of transcriptional profiles of MA-ACS1 and MA-ACO1 genes in response to ethylene, auxin,

- wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. *J. Plant Physiol.* 165, 1865–1878.
- Costa, F., S. Stella. W. Van de Weg. W. Guerra. M. Cecchin. J. Dallavia. B. Koller y S. Sansavini. 2005. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica.* 141, 181–190.
- Czarny, J., V. Grichko y B. Glick. 2006. Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants. *Biotechnology Advances.* 24, 410–419.
- DalCin, V., F. Rizzini. A. Botton y P. Tonutti. 2006. The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 42, 125–133.
- Dussan, S., L. Serna y A. Perenguez. 2011. Efecto de la aplicación de 1-Metilciclopropeno sobre algunas propiedades físico-químicas y organolépticas del fruto de la granadilla. *Acta agronómica.* 60(3), 237-244.
- Espinal, C., H. Martínez y Y. Peña. 2005. La cadena de los frutales de exportación en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrociudades Colombia. En: <http://www.fondohortifruticola.com.co>. 67 p.; consulta: noviembre de 2011.
- Evrard, A., N. Boulle y G. Lutfalla. 2010. Real-Time PCR. En: Boisseau, P., P. Houdy. M. Lahmany. 2010. *Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology.* Springer. Heidelberg. 841- 870p.
- Ezura, H y W. Owino. 2008. Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. *Plant Science.* 175, 121–129.
- Epa, 2002. 1- Methylcyclopropene. (PC Code 224459). Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division. 24p.
- FAO. 2010. 1-methylciclopropene. FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides. 26p.
- Farsani, S y M. Mahdavi. 2011. Quantification of Gene Expression Based on Microarray Experiment. En: Farsani, S y M. Mahdavi. *Bioinformatics - Trends and Methodologies.* Intech. 577-608p.
- Fluhr, R., 1998. Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci.* 3, 141–146.
- Gapper, N.E., McQuinn, R.P., Giovannoni, J.J., 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 82, 575–591.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods San Diego Calif* 25, 386–401.
- Golding, J.B., Shearer, D., Wyllie, S.G., McGlasson, W.B., 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 87–98.

- Grichko, V. 2006. New Volatile and Water-Soluble Ethylene Antagonists. *Russian Journal of Plant Physiology*. 53(4), 523–52.
- Gupta, S., S. Srivastava, A. Sane y P. Nath. 2006. Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: Presence of distinct fruit specific, ethylene induced and ethylene repressed expression. *Postharvest Biol. Technol.* 42, 16-22.
- Gutiérrez, J. 1997. Efecto del uso del absorbente de etileno en el almacenamiento de banano bocadillo (*Musa acuminata*). Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Agrícola. 110p.
- Hall, B., S. Shakeel y G. Shaller. 2007. Ethylene receptors: Ethylene perception and signal transduction. *J plant Growth Regul.* 26, 118-130.
- Harris, D.R., Seberry, J.A., Wills, R.B.H., Spohr, L.J., 2000. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 303–308.
- Hernández, M., J. Barrera y L. Melgarejo. 2010. Fisiología poscosecha. En: Melgarejo, L. 2010. Experimentos en Fisiología Vegetal. ISBN: 978-958-719-668-9. 167-186p.
- Hiwasa-Tanase, K y H. Ezura. 2014. Climacteric and Non-climacteric Ripening. En: Nath, P., M. Bouzayen, A. Matoo y J. Pech. 2013. *Fruit Ripening Physiology, Signalling and Genomics*. CABI publishinh. 1-14p.
- Hu, H.-L., Do, Y.-Y., Huang, P.-L., 2012. Expression profiles of a MhCTR1 gene in relation to banana fruit ripening. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* 56, 47–55.
- Huang, F.-C., Do, Y.-Y., Huang, P.-L., 2006. Genomic Organization of a Diverse ACC Synthase Gene Family in Banana and Expression Characteristics of the Gene Member Involved in Ripening of Banana Fruits†. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3859–3868.
- Huber, D.J., 2008. Suppression of Ethylene Responses Through Application of 1-Methylcyclopropene: A Powerful Tool for Elucidating Ripening and Senescence Mechanisms in Climacteric and Nonclimacteric Fruits and Vegetables. *HortScience* 43, 106–111.
- Hubert, O y D. Mbéguié-A-Mbéguié. 2012. Expression patterns of ethylene biosynthesis genes from bananas during fruit ripening and in relationship with finger drop. *AoB Plants Advance Access published*. 28p.
- Hubert, O., M. Chillet., P. Juliannus., B. Fils-Lycaon y D. Mbéguié-A-Mbéguié. 2010. Effect of Mode of Ripening on Ethylene Biosynthesis during Ripening of Diploid Banana (*Musa spp.*) Fruit. *Acta Hort.* 879, 385-392.
- In, B.C., Strable, J., Binder, B.M., Falbel, T.G., Patterson, S.E., 2013. Morphological and molecular characterization of ethylene binding inhibition in caARNt ions. *Postharvest Biol. Technol.* 86, 272–279.
- Inaba, A., Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W.-J., Nakano, R., Kubo, Y., 2007. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J. Exp. Bot.* 58, 1047–1057.

- Jansasithorn, R., Kanlayanarat, S., 2006. Effect of 1-MCP on physiological changes in banana “Khai,” *Acta Horticulturae*.
- Jiang, Y y D. Joyce. 2003. Softening response of 1-methylcyclopropene-treated banana fruit to high oxygen atmospheres. *Plant Growth Regulation*. 41, 225–229.
- Jiang, Y y J. Fu. 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regulation*. 30, 193–200.
- Jiang, Y., D. Joyce y A. Macnish. 1999a. Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation*. 28, 77–82.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999b. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biol. Technol.* 16, 187–193.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biol. Technol.* 16, 187–193.
- Jiang, Y., D. Joyce., W. Jiang y W. Lu. 2004. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. *Plant Growth Regulation*. 43, 109–115.
- Jin, Z.-Q., Xu, B.-Y., Liu, J.-H., Su, W., Zhang, J.-B., Yang, X.-L., Jia, C.-H., Li, M.-Y., 2009. Identification of genes differentially expressed at the onset of the ethylene climacteric in banana. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 307–309.
- Ju, C., Yoon, G.M., Shemansky, J.M., Lin, D.Y., Ying, Z.I., Chang, J., Garrett, W.M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M.L., Cooper, B., Kieber, J.J., Chang, C. 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *PNAS*. 109(47), 6p.
- Kader, A.A., Yahia, E.M., 2011. 3 - Postharvest biology of tropical and subtropical fruits, in: Yahia, E.M. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 79–111.
- Karmawan, S.S., 2009. Isolation of MA-ACS Gene Family and Expression Study of *MA-ACSI* Gene in *Musa acuminata* Cultivar Pisang Ambon Lumut. *HAYATI J. Biosci.*
- Kesari, R., P, Trivedi y Nath, P. 2007. Ethylene-induced ripening in banana evokes expression of defense and stress related genes in fruit tissue. *Postharvest Biology and Technology* 46:136–143p.
- Ketsa, S., Wongs-aree, C., Klein, J.D., 2000. Storage life and quality of “Kluai Khai” banana fruit affected by modified atmosphere using bulk packaging. *Thai J. Agric. Sci.* 33, 37–44.
- Klee, H y J. Giovannoni. 2011. Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. *Annu.Rev. Genet.* 45, 41–59.
- Lacey, R.F., Binder, B.M., 2014. How plants sense ethylene gas — The ethylene receptors. *J. Inorg. Biochem.* 133, 58–62.

- Legiscomex. 2008. Exportaciones de bananito. En: www.legiscomex.com. 16 p.; consulta: marzo de 2012.
- Li, J., H. Zhu y R. Yuan. 2010. Profiling the Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Ethylene Perception, and Cell Wall Degradation during Fruit Abscission and Fruit Ripening in Apple. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 135(5), 391–401.
- Lim, D.T.K., 2012. *Musa acuminata* (AA Group) “Sucrier,” in: *Edible Medicinal And Non Medicinal Plants*. Springer Netherlands, pp. 498–501.
- Liu, Y., S. Shiomi. A. Nakatasuka. Y. Kubo. R. Nakamura y A. Inaba. 1999. Characterization of Ethylene Biosynthesis Associated with Ripening in Banana Fruit. *Plant Physiology*. 121, 1.257–1.265.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- López-Gómez, R., A, Campbell., J, Dong., S, Yang y Gomez-Lim, M. 1997. Ethylene biosynthesis in banana fruit: isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. *Plant Science* 123: 123-131.
- Lurie, S y G. Paliyath. 2008. Enhancing Postharvest Shelf Life and Quality in Horticultural Commodities Using 1-MCP Technology. En: Paliyath, G., D. Murr., A. Handa y S. Lurie. 2008. *Postharvest Biology and Technology of fruits, vegetables, and flowers*. Ed: Wiley-Blackwell Publishing. New Delhi, India. 139-162p.
- Ma, G., Wang, R., Wang, C.-R., Kato, M., Yamawaki, K., Qin, F., Xu, H.-L., 2008. Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli. *Plant Growth Regul.* 57, 223–232.
- MADR, (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural), 2006. Plan Frutícola Nacional. Asohofrucol. Calí. Colombia. 62p.
- Mahajan, B., K. Singh y W. Dhillon. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on storage life and quality of pear fruits. *J Food Sci Technol.* 47(3): 351–354.
- Martínez-Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillén, F., Valverde, J.M., Zapata, P., Castillo, S., Valero, D., 2007. Tools to Maintain Postharvest Fruit and Vegetable Quality through the Inhibition of Ethylene Action: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 543–560.
- Mathooko, F., Y. Tsunashima. Y. Kubo y A. Inaba. 2004. Expression of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus persica* L.) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1- methylcyclopropene: possible role of ethylene. *African Journal of Biotechnology.* 3(10), 497-502.
- Mcmurchie, E.J., Mcglasson, W.B., Eaks, I.L., 1972. Treatment of Fruit with Propylene gives Information about the Biogenesis of Ethylene. *Nature* 237, 235–236.
- Medina-Suárez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aked, J., Bird, C.R., Seymour, G.B., 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl

- sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115, 453–461.
- Mita, S., Kawamura, S., Yamawaki, K., Nakamura, K., Hyodo, H., 1998. Differential expression of genes involved in the biosynthesis and perception of ethylene during ripening of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Physiol.* 39, 1209–1217.
- Moradinezhad, F., Able, A.J., Klieber, A., Sedgley, M., 2006. Concentration and duration of ethylene treatment influences the response of banana to 1-methylcyclopropene, *Acta Horticulturae*.
- Morales, N. 2002. Comportamiento fisiológico, químico y sensorial de banana bocadillo (*Musa acuminata* L.) producido en algunas zonas del departamento del Tolima. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Química. 50p.
- Nakatsuka, A., S. Shiomi. Y. Kubo y A. Inaba. 1997. Expression and InteARNI Feedback Regulation of ACC Synthase and ACC Oxidase Genes in Ripening Tomato Fruit. *Plant Cell Physiol.* 38(10), 1.103-1.110.
- Nanthachai, N., B. Ratanachinakorn. M. Kositrakun y R. Beaudry. 2007. Absorption of 1-MCP by fresh produce. *Postharvest Biology and Technology.* 43: 291–297.
- Owino, W y H. Ezura. 2008. Ethylene perception and gene expression. En: Paliyath, G., D. Murr., A. Handa y S. Lurie. 2008. *Postharvest Biology and Technology of fruits, vegetables, and flowers.* Ed: Wiley-Blackwell Publishing. New Delhi, India. 125-138p.
- Owino, W., R. Nakano. Y. Kubo y A. Inaba. 2002. Diferencial regulation of genes encoding ethylene biosynthesis enzymes and ethylene response sensor ortholog during ripening and response to wounding avocados. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(4), 520-527.
- Paliyath, G y D. Murr, 2008. Common Fruits, Vegetables, Flowers, and Their Quality Characteristics. En: Paliyath, G., D. Murr., A. Handa y S. Lurie. 2008. *Postharvest Biology and Technology of fruits, vegetables, and flowers.* Ed: Wiley-Blackwell Publishing. New Delhi, India. 125-138p.
- Palomer, X., I. Roing-Villanova., D. Grima-Calvo y Venderll, M. 2005. Effects of nitrous oxide (N₂O) treatment on the postharvest ripening of banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* 36:167–175p.
- Pardo, Y y E. Rubio. 2004. Efecto del inhibidor de etileno 1-Metilciclopropeno (1-MCP) en la maduración del banano bocadillo. V seminario nacional e internacional de frutales. 250-260p.
- Park, Y.-M., 2012. 1-MCP application for horticultural commodities in Korea: Practical potential and future task. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53, 441–446.
- Parra, A y Hernández, J. 2007. Fisiología poscosecha de frutas y hortalizas. Cuarta edición. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 67p.

- Pathak, N., M. Asif. P. Dhawan., M. Srivastava y P. Nath. 2003. Expression and activities of ethylene biosynthesis enzymes during ripening of banana fruits and effect of 1-MCP treatment. *Plant Growth Regulation*. 40, 11–19.
- Paul, V y Pandey, R., 2013. Delaying tomato fruit ripening by using 1-methylcyclopropene (1-MCP) for better postharvest management: current status and prospects in India. *Indian J. Plant Physiol*. 18, 195–207.
- Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9), 2003-2007.
- Pfaffl, M. 2006. Relative quantification. En: Dorak. T. *Real-time PCR*. Taylor y Francis group. 63-82p.
- Piriyavinit, P., S. Ketsa y G. Doorn. 2011. 1-MCP extends the storage and shelf life of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 6, 15–20.
- Platts, A., G. Johnson. A. Linnemann. S. Krawetz. 2008. Real-time PCR quantification using a variable reaction efficiency model. *Analytical Biochemistry*. 380, 315–322.
- Ramos, H. 2010. El sistema de producción de musáceas en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias agropecuarias. Sede Palmira. 62p.
- Reid, M y G. Staby. 2008. A Brief History of 1-Methylcyclopropene. *Hortscience*. 43(1), 83-85.
- Robinson, C y V. Galán. 2012. Plátanos y bananas. Editorial Paraninfo. 320p.
- Rodrigo, M.J., Zacarias, L., 2007. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biol. Technol*. 43, 14–22
- Roth, C. 2002. Quantifying Gene Expression. *Curr. Issues Mol. Biol*. 4, 93-100.
- Sáenz, M. 2004. Situación internacional y perspectivas para el manejo poscosecha de fruta de banano: un enfoque de tecnología comercial. XVI reunión internacional ACORBAT. 161-171.
- Salisbury F.B., Ross C.W. "Fisiología de las Plantas". Tomo 2. Bioquímica Vegetal. Ed. Thomson-Paraninfo, 2000.
- Sang-Dong, Y., C. Younghee y S. Jen. 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends in Plant Science*. 14(5), 270-279.
- Serek, M., E. Sisler y M. Reid. 1995. Effects of 1-MCP on the base life and ethylene response of cut flowers. *Plant Growth Regulation*. 16, 93-91.
- Seymour, G.B., Poole, M., Giovannoni, J.J., Tucker, G.A., 2013. *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*, The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening. ISBN: 978-0-8138-2039-2.
- Singh, R., P. Singh, N. Pathak, V. Singh y U. Dwivedi. 2007. Modulation of mango ripening by chemicals: physiological and biochemical aspects. *Plant Growth Regul*. 53, 137–145.

- Sisler, E., E. Dupille y M. Serek. 1996. Effect of 1-methylcyclopropene and methylene cyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut caARNtions. *Plant Growth Regulation*. 18, 79-86.
- Sisler, E.C., Serek, M., 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant*. 100, 577–582.
- Stepanova, A y J. Alonso. 2009. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 548–555.
- Supapvanich, S y G. Tucker. 2011. The Effect of 1-Methylcyclopropene (1-MCP) on Quality and Cell Wall Hydrolases Activities of Fresh-Cut Muskmelon (*Cucumis melo var reticulatus* L.) During Storage. *Food Bioprocess Technol*. 6p.
- Taiz, L y E. Zeiger. *Plant physiology*. Third Edition. 674p.
- Theologis, A. 1998. Ethylene signalling: Redundant receptors all have their say. *Current Biology*. 1998, R875–R878.
- Thumdee, S., A. Manenoi.N. Chen y R. Paull. 2010. Papaya Fruit Softening: Role of Hydrolases. *Tropical Plant Biol*. 3, 98–109.
- Tian, M., S. Prakash. H. Elgar. H. Young. D. Burmeister y G. Ross. 2000. Responses of strawberry fruit to 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. *Plant Growth Regulation*. 32, 83–90.
- Valenzuela, P y Bohórquez, Y. 2002. Manejo postcosecha y procesamiento de frutas y hortalizas. Universidad del Tolima. 101p.
- Valero, D., D. Martínez-Romero. J. Valverde. F. Guillén. S. Castillo y M. Serrano. 2004. Could the 1-MCP treatment effectiveness in plum be affected by packaging?. *Postharvest Biology and Technology*. 34, 295–303.
- VanGuilder, H. K. Vrana y W. Freeman. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Bio Techniques*. 44, 619-626.
- Varanasi, V., Shin, S., Johnson, F., Mattheis, J.P., Zhu, Y., 2013. Differential Suppression of Ethylene Biosynthesis and Receptor Genes in “Golden Delicious” Apple by Preharvest and Postharvest 1-MCP Treatments. *J. Plant Growth Regul*. 32, 585–595.
- Vargas-Calvo, A., Sandoval-Fernández, J.A., 2005. Agronomic evaluation of production and quality of Yangambi km 5 AAA and Dátil AA. *Infomusa* v. 14, no. 1, p. 6-10.
- Wang, P., Zhang, B., Li, X., Xu, C., Yin, X., Shan, L., Ferguson, I., Chen, K., 2010. Ethylene signal transduction elements involved in chilling injury in non-climacteric loquat fruit. *J. Exp. Bot*. 61, 179–190.
- Watkins, C.B., 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.*, Ethylene biology: A tribute to Edward C. Sisler 24, 389–409.
- Xiao, Y., Chen, J., Kuang, J., Shan, W., Xie, H., Jiang, Y., Lu, W., 2013. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes. *J. Exp. Bot*. 64, 2499–2510.

- Yamane, M., D. Abe. S. Yasui. N. Yokotani. W. Kimata. K. Ushijima. R. Nakano. Y. Kubo y A. Inaba. 2007. Differential expression of ethylene biosynthetic genes in climacteric and non-climacteric Chinese pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 44, 220–227.
- Yang, X., J. Song. L. Campbell-Palmer. S. Fillmore y Z. Zhang. 2013. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 78, 55–66.
- Yoo, S.-D., Cho, Y., Sheen, J., 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci*. 14, 270–279.
- Zhang, L., L. Jiang. Y. Shi. H. Luo. R. Kang y Z. Yu. 2012. Post-harvest 1-methylcyclopropene and ethephon treatments differently modify protein profiles of peach fruit during ripening. *Food Research International*. 48, 609–619.
- Zhang, M., Y. Jiang. W. Jiang y X. Liu. 2006. Regulation of Ethylene Synthesis of Harvested Banana Fruit by 1-Methylcyclopropene. *Food Technol. Biotechnol*. 44(1), 111–115.

4. Metodología General

4.1. Ubicación

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Poscosecha y en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias y en el laboratorio de Microbiología de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Las muestras de frutos se tomaron del municipio de Fresno Tolima, vereda Bajo Guali, Finca la Betulia (1.220 msnm).

4.2. Material vegetal

Se utilizaron frutos de bananito (*Musa acuminata*, grupo “Sucrier” (genoma AA), cv Orito) en madurez fisiológica, cosechados entre las 7 (objetivos 1 y 2) y 8 semanas (objetivo 3) después de la floración (emergencia de la inflorescencia o bacota). Se seleccionaron manos con 4 frutos homogéneos sin presencia de daños mecánicos o presencia de síntomas de enfermedades. No fue necesaria la desinfección en el laboratorio, debido a que los frutos fueron pre-tratados con alumbre al 5 % y fungicida Thiabendazol, según los procedimientos implementados en la finca.

4.3. Materiales

El 1-MCP utilizado fue EthylBloc[®], Floralife Inc (0,43 % de 1-MCP). La aplicación del 1-MCP se realizó en cámaras herméticas de 2 L, según la metodología propuesta por Herrera, (2007), en donde el producto en polvo (EthylBloc[®]) se pesó según el tratamiento y se aplicó en tubos Vacutainer de 10 mL también sellados herméticamente. Posteriormente, se inyectaron 5 mL de agua caliente (40-50 °C) para disolver y volatilizar el 1-MCP, e inmediatamente se cerró la cámara que contenía los frutos, finalmente, se permitió la exposición de los frutos al 1-MCP por el tiempo necesario según el tratamiento.

Para la aplicación de etileno se utilizó Ethrell[®] 480 SL (Etephon) de Bayer Crop Science. Se realizó una solución a una concentración de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, se sumergieron los frutos por 10 min y posteriormente, se permitió que estos se secan a temperatura ambiente.

4.4. Objetivo específico 1

Determinar el efecto de la concentración y del tiempo de tratamiento con el 1-MCP en la poscosecha de frutos de bananito.

Diseño experimental: Se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) con arreglo factorial de tratamientos (4x3+1), donde el factor 1 correspondió a las concentraciones de 1-MCP, con 4 niveles: 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$; 0,5 $\mu\text{L L}^{-1}$; 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$. El factor 2 fue el tiempo de exposición al 1-MCP, con 3 niveles, 2, 6 y 24 h. Por último, se incluyó un control (sin aplicación de 1-MCP). Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones, y cada unidad experimental estuvo compuesta por 4 frutos (entre 200 y 300 g en total). Posterior a la aplicación de los tratamientos, los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente (19-21 °C) y a 55-65 % de humedad relativa. Se realizaron muestreos de variables no destructivas y destructivas cada 2 y 7 días respectivamente.

Tabla 3. Tratamientos del objetivo 1 aplicados a los frutos de bananito

Factores	Concentración 1-MCP ($\mu\text{L L}^{-1}$)				
	0,1	0,5	1	1,5	
Tiempo (h)	Número del Tratamiento				
2	1	4	7	10	
6	2	5	8	11	Control
24	3	6	9	12	

Tratamiento 1: Concentración de 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 2 h

Tratamiento 2: Concentración de 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 6 h

Tratamiento 3: Concentración de 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 24 h

Tratamiento 4: Concentración de 0,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 2 h

Tratamiento 5: Concentración de 0,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 6 h

Tratamiento 6: Concentración de 0,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 24 h

Tratamiento 7: Concentración de 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 2 h

Tratamiento 8: Concentración de 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 6 h

Tratamiento 9: Concentración de 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 24h

Tratamiento 10: Concentración de 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 2 h

Tratamiento 11: Concentración de 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 6 h

Tratamiento 12: Concentración de 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 24 h

Tratamiento 13: Control (Sin tratamiento con 1-MCP)

VARIABLES EVALUADAS: Intensidad respiratoria; pérdida de peso, color; firmeza; extensibilidad; sólidos solubles totales; acidez total titulable; relación de madurez.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) con arreglo factorial de tratamientos (4x3+1). El factor primer factor correspondió a las concentraciones de 1-MCP, con 4 niveles: (0,1; 0,5; 1,0 y 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$) y el segundo fue el tiempo de exposición al 1-MCP, con 3 niveles, 2, 6 y 24 h, adicionalmente se agregó un control absoluto, para un total de 13 tratamientos (Tabla 3). Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones y cada repetición estuvo compuesta por una mano de 4 frutos. Los datos cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Se realizó un análisis de varianzas de dos vías (ANOVA) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) para determinar diferencias entre niveles de los factores evaluados, además se realizó la prueba Dunnett ($P < 0.05$) para comparar el control con respecto a los tratamiento, cuando los frutos alcanzaron el estado de madurez 7 (C7). Todo lo anterior se realizó con el software SAS 9,2 (Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008).

4.5. Objetivo específico 2

Evaluar el efecto de la aplicación de etileno y su interacción con la aplicación previa y posterior de 1-MCP en algunas variables poscosecha de frutos de bananito.

Diseño experimental: Se estableció un diseño completamente aleatorio con 5 tratamientos y 4 repeticiones (Tabla 4). Se seleccionaron manos con 4 frutos homogéneos sin presencia de daños, a los cuales se aplicaron los siguientes tratamientos: aplicación de etileno a una dosis de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ por 10 min (Ethrell[®] 48 SL, Bayer CropScience-ET); aplicación de 1-MCP a una concentración de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ por 6 h a 20 °C (EthylBloc[®], Floralife Inc) (García *et al.*, 2015 No publicado) (1-MCP); aplicación inicial de 1-MCP y posterior a 5 días, aplicación de etileno (1-MCP+ET); aplicación inicial de etileno y posterior a 5 días, aplicación de 1-MCP (ET+1-MCP), adicionalmente se incluyó un control (sin aplicación de 1-MCP ó etileno). Posterior a la aplicación de los tratamientos, los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente (19-21°C) y a 55-65 % de humedad relativa. Se realizaron muestreos de variables no destructivas y destructivas cada 2 y 7 días respectivamente.

Tabla 4. Tratamientos del objetivo 2 aplicados a los frutos de bananito.

Tratamiento	Dosis	Fuente
--------------------	--------------	---------------

Etileno	(ET)	1,000 $\mu\text{L L}^{-1}$ por 10 min	Ethrell [®] 48 SL
1-MCP	(1-MCP)	1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ por 6 h	EthylBloc [®]
1-MCP+Etileno*	(1-MCP+ET)		
Etileno+1-MCP**	(ET+1-MCP)		
Control	(CON)		

* Aplicación de etileno posterior a 5 días después de la aplicación de 1-MCP.

** Aplicación de 1-MCP posterior a 5 días después de la aplicación de etileno.

Variabes evaluadas: Intensidad respiratoria; producción de etileno, pérdida de peso, color; firmeza; extensibilidad; sólidos solubles totales; acidez total titulable; relación de madurez.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) con 5 tratamientos (Tabla 4) y 4 repeticiones. Los datos cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) para determinar diferencias entre tratamientos. Todo lo anterior se realizó con el software SAS 9,2 (Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008).

4.6. Objetivo específico 3.

Realizar un estudio de la expresión de los genes *MA-ACSI*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2* bajo condiciones normales y en respuesta a la aplicación de 1-MCP y etileno, en frutos de bananito.

Diseño experimental: Se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) con 3 tratamientos y 4 repeticiones. Se seleccionaron manos con 4 frutos homogéneos sin presencia de daños, a los cuales se aplicaron los siguientes tratamientos: aplicación de 1-MCP (EthylBloc[®], Floralife Inc) a una dosis de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ por 6 h a 20 °C (T: 1-MCP); aplicación de etileno a una dosis de 1.000 ppm por 10 min (Ethrell[®] 48 SL, Bayer CropScience) (T: ET-E); tratamiento control (sin la aplicación de 1-MCP o etileno- CON). Los frutos se almacenaron a temperatura ambiente (19-21 °C) y a 60-70 % de humedad relativa.

Se determinaron las variables no destructivas, producción de etileno e intensidad respiratoria cada 2 días. Las variables destructivas firmeza, sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT) y color fueron determinadas a los 0, 9 y 16 días, en el mismo momento se tomaron las muestras para la evaluación de la expresión génica, para lo cual se

congelaron con N₂ líquido discos de pulpa de la parte media del fruto de aproximadamente 3 mm de diámetro y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ARN.

Extracción de ARN

Los materiales necesarios para la extracción de ARN, como: morteros, pistilos, espátulas, tubos falcón, entre otros, así como los utilizados en la electroforesis, fueron sumergidos en una solución con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 3 % por 10 min, de acuerdo a lo propuesto por Invitrogen, (2014), posteriormente dichos materiales fueron autoclavados 3 veces. Los reactivos y soluciones tampón (buffer) fueron preparados con agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0,1%. A su vez, las superficies, pipetas y demás fueron esterilizadas con etanol al 70%, seguido por el uso de ARNasa Zap[®] solution (Invitrogen).

Se realizó la extracción de ARN a partir de la pulpa de los frutos, teniendo en cuenta que la maduración en banano inicia en este tejido (Liu *et al.*, 1997). En el proceso de estandarización se evaluaron 2 metodologías de extracción: la primera correspondió a la utilización del reactivo TRizol[®] (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante; la segunda fue con el uso del buffer de extracción CTAB, de acuerdo al protocolo propuesto López *et al.*, (2006) ajustando la cantidad de tejido y reactivos, de acuerdo a Asif *et al.*, (2000). Los mejores resultados se encontraron con la segunda metodología.

La extracción de ARN se realizó a partir de la pulpa de la fruta, según la metodología propuesta por Asif *et al.*, (2000) y López *et al.*, (2006) con algunas modificaciones. A un tubo falcón de 15 mL que contenía 1 g de pulpa previamente macerada con N₂ líquido, se adicionó 3 mL de buffer de extracción (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA pH 8.0; 1,4 M NaCl, más Na₂SO₃ 1% y PVP-40 2%); posteriormente se mezcló en vortex por 10 s y se incubó en baño de maría por 15 min a 65°C. Después se agregaron 3 mL de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por vortex por 10 s y se centrifugó a 5.000 rpm por 20 min; el sobrenadante (aproximadamente, 2 mL) se transfirió a otro tubo falcón de 15 mL y se agregó 2 mL de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1) repitiendo el paso de centrifugación a 5000 rpm por 20 min; luego se tomó 1 mL de sobrenadante y se llevó a un tubo de microcentrifuga de 2 mL que contenía 1 mL de LiCl₂ 4M frío. Finalmente, el ARN se precipitó toda la noche a 4°C. Al siguiente día se realizó un paso de centrifugación a 12.000 rpm por 30 min a 4°C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con 500 µL de buffer TE-SDS (10 mM Tris HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0 y 1% (p/v) SDS), 200 µL de NaCl 5M y 700 µL de isopropanol frío, se mezcló por pipeteo e incubó por 30 min a -20°C; posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C por 10 min, descartando el sobrenadante y agregando 500 µL de etanol al 70 % frío; se realizó un paso de centrifugación a 12.000 rpm por 3 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y se secó el pellet en cámara de flujo laminar por 15 min. Finalmente, el

pellet con el ARN extraído se resuspendió en 50 μL de agua tratada con DEPC y se almacenó a -20°C .

La pureza y concentración de ARN fueron determinadas espectrofotométricamente con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), a una absorbancia de 230, 260 y 280 nm. Adicionalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % para determinar la integridad del ARN. En cada pozo del gel se sembraron 4 μL de ARN, 1 μL de agua DEPC y 3 μL de ARN EZ-Vision[®] (Amresco). El buffer de corrida utilizado fue TAE 0,1X (Tris; ácido acético; EDTA) y las condiciones fueron 90V por 35 min, en la cámara de electroforesis Mini-Sub[®] Cell GT Systems (BioRad). Posteriormente, el ARN (1 μg) se trato con ADNsa I grado amplificación (Invitrogen) para eliminar el ADN contaminante, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

PCR en tiempo real.

Los primers utilizados en éste estudio fueron los mismos reportados por Hubert *et al.*, (2010) (Tabla 5). Para probar la especificidad de los primers utilizados y el tamaño del fragmento amplificado, se realizó una reacción de PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) a partir de pulpa de frutos verdes, con el kit One Step RT-PCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, en el termociclador C1000[™] (BioRad). Además, lo anterior se comprobó con el kit de PCR en tiempo real (RT-qPCR) Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR Kit Plus ROX Vial (Thermo Scientific), en el termociclador Light Cycler[®] Nano System (Roche). Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como buffer de corrida TBE 0,5X (Tris; Borato; EDTA). En cada pozo se sembraron 4 μL de producto de PCR, 2 μL de agua DEPC y 1 μL de EZ-Vision[®] ADN dye (AMRESCO).

Después de verificar la especificidad de los primers se realizaron las reacciones de RT-qPCR usando el kit anterior, utilizando 100 ng de ARN y 150 nM de concentración final de cada pareja de primers; las demás condiciones se realizaron de acuerdo a lo sugerido por el fabricante. La síntesis de cADN se llevó a cabo por 30 min a 50°C y la inactivación de la transcriptasa reversa por 15 min a 95°C . En total se realizaron 45 ciclos de amplificación a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 45 s; adicionalmente, se realizó una curva de fusión desde 60°C hasta 90°C ($0,1^{\circ}\text{C s}^{-1}$) para verificar la especificidad de la PCR.

Al finalizar cada reacción de PCR se determinaron los valores Ct (*Cycle threshold*) mediante el software Light Cycler[®] (Roche). La expresión relativa de los genes fue calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando el cebador *MA-ACT* como gen de referencia y frutos verdes (estado de maduración C1, $^{\circ}\text{h} = 118,065$) como calibrador para normalizar la expresión. La curva de eficiencia de la PCR para los genes de interés, se realizó mediante diluciones seriadas del ARN extraído en los frutos

verdes (calibrador) (0; 1/10; 1/100; 1/100), cada una con 3 repeticiones. Las condiciones de PCR fueron las mismas mencionadas anteriormente. Finalmente, se registraron los valores de Ct, se realizó una regresión lineal y con la pendiente de la recta (m) se calculó la eficiencia mediante la siguiente ecuación.

$$Eficiencia = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)}$$

Análisis estadístico.

Se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) con 3 tratamientos y 4 repeticiones. Los datos cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) para determinar diferencias entre tratamientos. Todo lo anterior se realizó con el software SAS 9,2 (Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008).

Tabla 5. Secuencias de primers utilizados en éste estudio. Tomado de Huber *et al.* (2010).

Gen	Accesión	Secuencia 5'- 3'	Tm	GC%	Tamaño Fragmento (pb)
MA-ACO1	U55770	F: aagctctacgtcgggcataa	59,9	50	152
		R: gacagcttccaacgcgaag	60,2	55	
MA-ACO2	X95599	F: ccaaggaaccgagatttgaa	60	45	125
		R: tggtagcttccacgatgaca	60,3	50	
MA-ACSI	AB021906	F: agaactcctcctacttcgat	52,2	45	215
		R: atgatagtctgaaagttgg	51,7	40	
MA-ACT	AB022041	F: agatgggggtcagccatacag	60	55	231
		R: ccacgtaagcaagcttctcc	60	55	

4.7. Variables evaluadas

Pérdida de peso (%) (PP): fue calculada como el porcentaje de peso perdido (Pf) con respecto al peso inicial (Pi) de los frutos.

$$PP (\%) = \frac{P2 - Pi}{Pi} * 100$$

Firmeza del fruto ($N\ mm^{-2}$) y Extensibilidad de la epidermis (mm): fueron determinadas mediante el texturómetro LS1 (Lloyd Instruments, USA), acoplado al Software NexyGen PlusTM. El diámetro del penetrador fue de 3 mm. La firmeza correspondió a la máxima

fuerza registrada por el equipo, mientras que la extensibilidad, fue la distancia de deformación de la epidermis desde el momento en que el penetrador toca el fruto, hasta que se alcanza la máxima fuerza.

Color: Fue determinado con el colorímetro Konica Minolta CR-410 en el espacio CIELab* y expresado como valor del ángulo *hue* o “*h*”. El °*h* es un ángulo en una rueda de color de 360°, en donde los ángulos 0, 90, 180 y 270° representan colores rojo, amarillo, verde y azul respectivamente (Fig 5), además se determinó el estado de maduración según el índice de maduración propuesto por el Departamento de Servicios al Cliente de Chiquita Brands, Inc., y (Paull, 1996) (Fig 6).

$$\text{Valor de } h \text{ (}^\circ h\text{)} = \text{Arctan}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Acidez total titulable (ATT; % de ácido málico): se determinó según lo indicado por Dadzie y Orchard (1997), por medio de la siguiente ecuación.

$$\text{ATT (\% ácido málico)} = \left(\frac{A * B * C}{D}\right) * 100 * 3$$

Donde: A: volumen (ml) de NaOH utilizado; B: Normalidad del NaOH (0,1N); C: Peso equivalente del ácido málico (0,067 g meq⁻¹) y D: Peso de la muestra (g). Nótese que se multiplica por 3 debido a que la pulpa fue diluida en agua destilada.

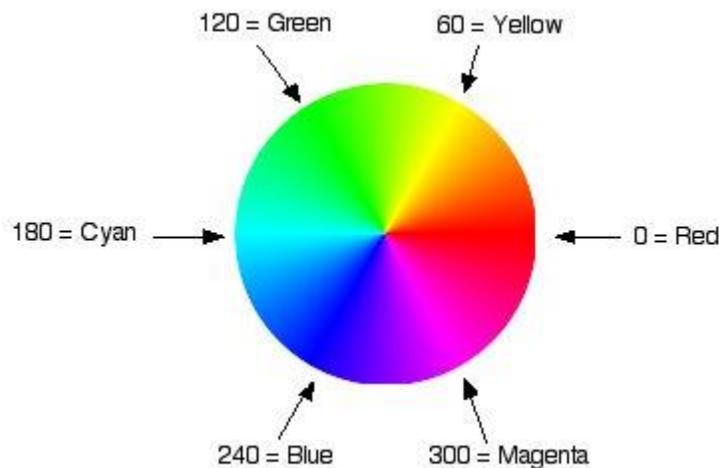


Figura 6. Ángulo *h* del color.

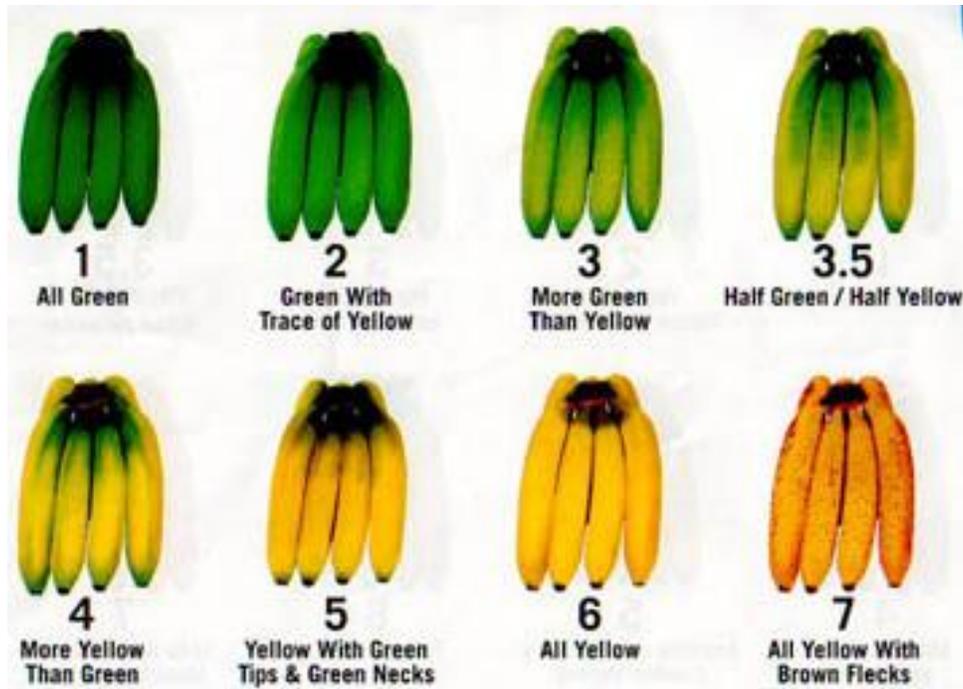


Figura 7. Carta de los estados de madurez de banano. (1) Frutos verdes; (2) frutos verdes con trazas de amarillo; (3) frutos con predominancia de color verde; (3.5) Frutos mitad verdes y mitad amarillos; (4) frutos más verdes que amarillo; (5) frutos verdes con trazas de color verde; (6) frutos amarillos y (7) frutos amarillo con desarrollo de manchas en la epidermis.

Sólidos solubles totales (SST; °Brix): mediante el uso del refractómetro digital HANNA de rango 0 a 85% a 20°C, de acuerdo a Dadzie y Orchard (1997).

Relación de madurez (RM): Fue calculada como la relación entre los sólidos solubles totales y la acidez total titulable.

$$RM = \frac{SST}{ATT}$$

Intensidad respiratoria ($\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$): se determinó con base en la emisión de CO_2 de frutos mantenidos en cámaras herméticas de 2 L, por medio del uso de sensores infrarrojo de CO_2 (Vernier Software and Technology), acoplados a la interfaz Lab Quest[®] utilizando la siguiente ecuación:

$$TR = (m * (Vc - Vf - 47,522) * 3,6 * 1,842 * \left(\frac{1}{Pf}\right))$$

Donde: Vc : Volumen de la cámara (ml); Vf : Volumen de los frutos (ml); m : pendiente determinada con la Lab Quest ($\text{ppm CO}_2 \text{ s}^{-1}$); Pf : Peso de los frutos (g); La constante

47,522 corresponde al volumen del sensor que ingresa en la cámara; 1,842 es la densidad del CO₂ en mg cm⁻³.

Producción de etileno (μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹): La producción de etileno (PE) se determinó por medio de la metodología propuesta por Marc Chillet (2008), colocando los frutos en cámaras herméticas de 1 L por 1 h a 20 °C, posteriormente se tomo una muestra de 1 mL del espacio de cabeza y se inyectó en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890D), equipado con un detector de ionización de llama (*FID: flame ionization detector*) y una columna HP-PLOT (30m x 0,55mm x 40um).

Expresión de genes *MA-ACSI*, *MA-ACOI* y *MA-ACO2*: Se realizó la cuantificación de la expresión relativa de los genes mediante el método 2^{-ΔΔCt} (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando *MA-ACT* como gen de referencia y frutos verdes (Estado de maduración C1 °h= 118,06) como calibrador para normalizar la expresión.

$$\Delta\Delta C_t (MA-ACSI) = (C_{t_{MA-ACSI}} - C_{t_{MA-ACT}})_{\text{muestra de interés}} - (C_{t_{MA-ACSI}} - C_{t_{MA-ACT}})_{\text{calibrador}}$$
$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t (MA-ACOI) = (C_{t_{MA-ACOI}} - C_{t_{MA-ACT}})_{\text{muestra de interés}} - (C_{t_{MA-ACOI}} - C_{t_{MA-ACT}})_{\text{calibrador}}$$
$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t (MA-ACO2) = (C_{t_{MA-ACO2}} - C_{t_{MA-ACT}})_{\text{muestra de interés}} - (C_{t_{MA-ACO2}} - C_{t_{MA-ACT}})_{\text{calibrador}}$$
$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

5. Resultados objetivo específico 1: Efecto de la concentración y tiempo de tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP) en la poscosecha de bananito (*Musa AA Simmonds*).

Resumen

El bananito es un producto tropical exótico exportado por Colombia a diferentes mercados internacionales. Las exportaciones se realizan por vía aérea, debido a que es un fruto climatérico altamente perecedero con corta vida en poscosecha. Por lo tanto, es necesaria la investigación en tecnologías que permitan retrasar el proceso de maduración y prolongar su vida útil. El 1-MCP es considerado una alternativa prometedora en la conservación de frutas y hortalizas. El presente estudio evaluó el efecto de diferentes concentraciones (0,1; 0,5; 1,0 y 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$) y tiempos de exposición (2, 6 y 24 h) del 1-MCP en frutos de bananito. Los resultados obtenidos mostraron que la duración de poscosecha (hasta el estado de maduración C7) de los frutos control (sin aplicación de 1-MCP) fue de 21 días, mientras que aquellos tratados con 1-MCP alcanzaron 28 días, es decir, que el 1-MCP, independiente de la concentración o tiempo de tratamiento, retrasó por 7 días con respecto al control, el desarrollo de algunas variables poscosecha relacionadas con la maduración de bananito, como: cambio de color, intensidad respiratoria (TR), firmeza, extensibilidad, sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT) y relación de madurez. La concentración de 1-MCP más adecuada para retrasar la maduración de bananito fue 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, sin embargo, se observaron resultados favorables con dosis inferiores. En contraste, no se observaron diferencias significativas con respecto a los tiempos de tratamiento con 1-MCP en las variables evaluadas. Este estudio demuestra por primera vez que el desarrollo normal de la maduración del bananito no fue afectado negativamente por la aplicación de 1-MCP, por lo tanto puede ser aplicado en tratamientos con 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 2 a 24 h, para retrasar la maduración y aumentar el tiempo de almacenamiento. Para posteriores estudios se recomienda evaluar el efecto de múltiples aplicaciones para incrementar más tiempo la vida en poscosecha de este frutal.

Palabras claves. Bananito, concentración, tiempo, 1-MCP, maduración, poscosecha.

Abstract

Bananito or baby banana is an exotic tropical product exported by Colombia to various international markets. Exports are carried by air, because it is an extremely perishable climacteric fruit, with short postharvest life. Therefore, research into technologies to delay the ripening process and prolong its life is required. The 1-MCP is considered a promising alternative in the conservation of fruit and vegetables. This study evaluated the effect of different concentrations (0,1; 0,5; 1,0 and 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$) and exposure times (2, 6 and 24 h) of 1-MCP in fruits of bananito . The results showed that the duration of postharvest life (to the ripeness C7) of the control fruits (without application of 1-MCP) was 21 days, whereas those treated with 1-MCP reached 28 days. The 1-MCP, independent of concentration and exposure time, delayed by 7 days compared to the control, the development of some variables related with ripening of bananito, such as color change, respiratory rate (RR), firmness, extensibility, total soluble solids (TSS), total titratable acidity (TTA) and maturity ratio. The best concentration of 1-MCP to delay ripening of bananito was 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, however, favorable results are observed with lower doses. In contrast, no significant differences were observed with respect to the time of treatment with 1-MCP in the variables evaluated. This study demonstrated that the normal ripening of bananito was not affected negatively by the application of 1-MCP, and therefore can be applied in treatments with 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ of 1-MCP for 6 h, to delay ripening and enhance storage time. For further studies we recommended evaluate the effect of multiple applications to further increase the storage time of bananito.

Keywords: Baby banana, concentration, time, 1-MCP, ripening, postharvest.

5.1. Introducción

El bananito (*Musa AA*) también conocido como banano Sucrier, bocadillo, Pisang Mas, Kluai khai, Lady finger, etc., es el único diploide comestible importante dentro del grupo Acuminata (genoma A) de la familia *Musaceae* (Robinson y Galán, 2012). Es originario de Malasia y se ha reportado como el cultivar AA más cultivado a nivel mundial (Lim, 2012). El bananito es considerado un producto exótico promisorio para ser exportado por Colombia, de hecho en el 2013, ocupó el segundo lugar en las exportaciones de frutales sin incluir el banano (*Musa AAA*) (Asohofrucol, 2014). Las exportaciones se realizan por vía aérea debido a que es un fruto altamente perecedero (Gutiérrez, 1997), lo cual está relacionado con el carácter climatérico (Castro Benítez *et al.*, 2005), con la susceptibilidad de sufrir daños en la epidermis (Vargas-Calvo y Sandoval-Fernández, 2005) y con el rápido desarrollo de manchas en la epidermis comparado con otros cultivares (Promyou *et al.*,

2007). Todo lo anterior hace difícil el almacenamiento y transporte, pudiendo afectar negativamente las exportaciones de este frutal (Vargas-Calvo y Sandoval-Fernández, 2005).

El etileno regula la maduración de frutos climatéricos mediante la activación de una vía de señalización que lleva a la expresión de genes relacionados con enzimas que actúan durante la maduración (Bapat *et al.*, 2010). La señalización inicia con la unión del etileno a un grupo de receptores en el retículo endoplasmático (Hall *et al.*, 2007; Binder, 2008; Lacey y Binder, 2014) y termina con la activación de factores de transcripción (TFs) tipo EIN3 y EIL1 (Yoo *et al.*, 2009), los cuales interactúan con promotores de factores de respuesta a etileno (ERF), que a su vez, son factores de transcripción que llevan a la transcripción de otros genes relacionados con la maduración (Barry y Giovannoni, 2007). Xiao *et al.* (2013) reportaron que los ERFs pueden funcionar como represores o activadores de la transcripción, en éste sentido MaERF11 actúa como represor de la transcripción de genes de la biosíntesis de etileno (*MA-ACSI* y *MA-ACOI*), mientras que MaERF9 funciona como un activador. Lo anterior ocasiona la expresión de numerosos genes relacionados con cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos en los tejidos de los frutos. En banano los principales cambios, incluyen: alteraciones en la composición de carbohidratos, degradación de pectinas en la pared celular, síntesis de compuestos volátiles, degradación de clorofila en la epidermis (Medina-Suárez *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 2014).

La principal estrategia en la poscosecha de productos agrícolas es el manejo del etileno, lo cual puede ser logrado en diferentes niveles, incluyendo bloqueo de la biosíntesis, acción a nivel de receptor y remoción de etileno de la atmósfera (Martínez-Romero *et al.*, 2007). El 1-meticiclopropeno (1-MCP) (C_4H_6) es una olefina cíclica que bloquea la acción del etileno, debido a que ocupa los receptores mediante la unión al metal Cu(I) y afecta la señalización durante la maduración de los frutos o la senescencia de las flores (Serek *et al.*, 1995). Se ha reportado que la unión del 1-MCP a los receptores es irreversible (Sisler *et al.*, 1996), presentando 10 veces mayor afinidad por estos comparado con el etileno (Blankenship y Dole, 2003), por lo cual se considera una estrategia eficiente para prolongar la vida en poscosecha de frutas y hortalizas (Sisler *et al.*, 2003; Reid y Staby, 2008). Los frutos tratados con 1-MCP pueden madurar normalmente debido a la síntesis de nuevos receptores (Cameron y Reid, 2001; In *et al.*, 2013), lo cual ocurre más rápido a temperaturas entre 30 y 40 °C (Jiang *et al.*, 2002a) y a concentraciones elevadas de O_2 (Jiang y Joyce, 2003). En éste sentido, Sisler *et al.* (2003) reportan que la generación de nuevos receptores varía entre especies, pero es cercana a 12 días en banano.

En banano (*Musa AAA*) se han reportado numerosos estudios, en donde la aplicación de 1-MCP retrasa los cambios físico-químicos y fisiológicos que ocurren durante la maduración (Jiang *et al.*, 1999a; Jiang *et al.*, 1999b; Golding *et al.*, 1998; Bagnato *et al.*, 2003) Moradinezhad *et al.*, 2006; , sin embargo, se ha reportado que el efecto del 1-MCP depende

del estado de madurez de los frutos (Harris *et al.*, 2000), de tal forma que la aplicación de 1-MCP después del inicio de la producción climatérica de etileno (PE), no tiene efecto en la maduración, incluso la puede acelerar (Golding *et al.*, 1998; Moradinezhad *et al.*, 2008; Pelayo *et al.*, 2003; Inaba *et al.*, 2007; De Martino *et al.*, 2007; Phebe Ding y Darduri, 2009). La mayoría de los estudios han sido realizados en banano triploide (*Musa* AAA), mientras que pocos se han reportado en otros cultivares, de hecho sólo existen dos investigaciones publicadas en plátano manzano o “prata” (*Musa* AAB) (Pinheiro *et al.*, 2010; Do Carmo y Melo, 2003) y una en banano diploide “Khai” (*Musa* AA) (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006). En el caso de Colombia, sólo existe un reporte de la aplicación de 1-MCP en bananito, en donde se encontró que dosis alrededor de 1,89 $\mu\text{L L}^{-1}$ afectaron negativamente las características sensoriales del fruto (Pardo y Rubio, 2004).

Diferentes factores influyen en la respuesta de los frutos al tratamiento con 1-MCP (Blankenship y Dole, 2003; Park, 2012). Paul y Pandey (2013) clasificaron los factores en dos grupos: (1) aquellos relacionados directamente con el fruto (especie, variedad, cultivar, estado de madurez, velocidad de maduración, nivel interno de etileno, características morfológicas y anatómicas, cantidad de receptores, capacidad de regeneración de receptores) y (2) aquellos relacionados con el ambiente (tiempo entre la cosecha y el tratamiento con 1-MCP, temperatura durante la aplicación, duración del tratamiento, concentración del 1-MCP). En banano, los factores más importantes que influyen en la respuesta al 1-MCP son el estado de madurez y la interacción entre la concentración de 1-MCP con el tiempo de tratamiento (Jiang y Joyce, 2003; Moradinezhad *et al.*, 2006; Moradinezhad *et al.*, 2008; Botondi *et al.*, 2014), donde a mayor concentración, menor es el tiempo requerido de tratamiento (Jiang *et al.*, 1999b). La importancia del estado de madurez, el cultivar, y las variables de exposición (tiempo, temperatura y concentración) son complejas y siguen siendo el foco de muchas investigaciones (Watkins, 2006).

La concentración de 1-MCP óptima para bloquear la acción del etileno, varía entre especies, pero normalmente se encuentra en el rango de 0,001 $\mu\text{L L}^{-1}$ a 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, mientras que el tiempo de tratamiento oscila entre 2 y 36 h (Blankenship y Dole, 2003). En banano, no se reporta una dosis óptima y las investigaciones realizadas muestran aplicaciones desde 0,003 $\mu\text{L L}^{-1}$ hasta 30 $\mu\text{L L}^{-1}$, con diferencias en la respuesta durante la maduración, a su vez, el tiempo de tratamiento varía entre 0 y 24 h. Jiang *et al.* (1999b) reportaron que una dosis de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ es efectiva para reducir los efectos negativos del etileno y prolongar la vida en poscosecha de banano, aunque se observa una respuesta favorable a concentraciones inferiores. Por su parte, las concentraciones demasiado altas (>30 $\mu\text{L L}^{-1}$) afectan de manera irreversible la maduración (Moradinezhad *et al.*, 2008a; Bagnato *et al.*, 2003), llevando a una coloración desuniforme de la epidermis. Resultados similares fueron reportados por Pardo y Rubio (2004) con concentraciones de 1,89 $\mu\text{L L}^{-1}$. Con base en lo anterior, el presente trabajo pretendió evaluar el efecto de diferentes

concentraciones y tiempos de tratamiento con 1-MCP en algunos cambios fisicoquímicos y fisiológicos en frutos de bananito almacenados a temperatura ambiente.

5.2. Resultados y discusión

Pérdida de peso

La pérdida de peso (PP) incrementó con el almacenamiento de manera lineal, sin presentarse diferencias significativas ($P>0.05$) para las concentraciones de 1-MCP hasta los 19 días de almacenamiento (dda) (Fig 8A). Por su parte, el tiempo de tratamiento mostró diferencias significativas ($P<0.05$) a partir de los 2 dda, siendo menor en el tiempo de 24 h durante todo el almacenamiento (Fig 8B). La máxima pérdida de peso alcanzada por los tratamientos cuando los frutos llegaron al estado de maduración C7, estuvo entre 30,6 % en el control a los 21 dda y 40,25 % en los tratamientos con 1-MCP a los 28 dda, con diferencias significativas ($P<0.0001$) (Fig 14A). La tasa de pérdida de peso varió entre 1,3 % (nivel 24 h) y 1,4 % (demás tratamientos).

La PP en banano al igual que en otros frutos, está relacionada con la pérdida de agua de los tejidos por la transpiración (Ferris *et al.*, 1999). En la poscosecha, la transpiración es influenciada por diferentes factores, ya sean del fruto (características morfológicas y anatómicas, relación superficie/volumen), ó ambientales (temperatura, humedad relativa, movimiento de aire y la presión atmosférica) (Kader y Yahia, 2011). Dentro de los factores ambientales, la humedad relativa (HR), el déficit de presión de vapor (DPV) y la temperatura son los principales factores que influyen en la transpiración de los tejidos vegetales. De manera general, a mayor temperatura y DPV, la PP es mayor (Paull, 1996; Kader y Yahia, 2011). En banano se ha encontrado una relación positiva entre el DPV y la PP diaria de los frutos, de tal forma que altos DPV (HR 45-55 %) ocasionan una PP diaria de 1,25 %, mientras que en bajos DPV (HR>80 %), la PP diaria es de 0,12 % (Finger *et al* 1995). En éste estudio se encontró una PP diaria de 1,3-1,4 % a 55-65 %, es decir que los valores encontrados aquí son mayores a los reportados en banano, lo cual puede ser debido a que la epidermis de los frutos de bananito es más delgada, por tanto presenta menor resistencia a la transpiración (Vargas-Calvo y Sandoval-Fernández, 2005). Además, los frutos de bananito son más pequeños y pueden tener mayor relación superficie/volumen comparado con banano, por lo cual presentan mayor área transpiratoria (Bartz y Brecht, 2002). A partir de los 19 dda, el control incrementó ligeramente la PP, lo cual puede ser debido al desarrollo de manchas en la epidermis (estado C7) (Trakulnaleumsai *et al.*, 2006).

La PP en bananito, no fue afectada por el tratamiento con 1-MCP en ninguna de las concentraciones, lo cual coincide con lo reportado por Blankenship y Dole (2003) y

Moradinezhad *et al.* (2008a), quienes afirman que el 1-MCP no afecta significativamente la PP en diferentes frutos. No obstante, el factor tiempo de tratamiento con 1-MCP afectó significativamente la PP (Fig 8B), lo cual no es debido al 1-MCP como tal, sino posiblemente al tiempo en que los frutos permanecieron en la cámara hermética cuando se aplicó el 1-MCP (24 h). Es decir, que en las 24 h de tratamiento se pudo generar una atmósfera modificada pasiva (MAP) con mayor HR que llevó a que los frutos presentarán menor PP desde el inicio del almacenamiento. Finalmente, los frutos que fueron tratados con 1-MCP presentaron mayor PP cuando alcanzaron el estado C7, debido a que el 1-MCP retrasó la maduración por una semana, es decir, que estos frutos tuvieron una semana adicional para perder agua (Fig 8A).

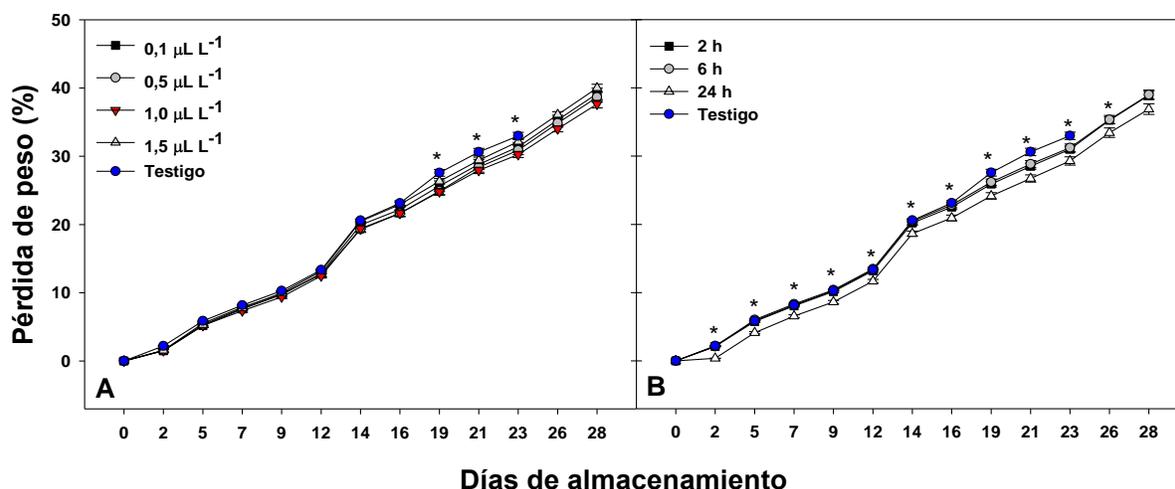


Figura 8. Efecto de (A) diferentes concentraciones y (B) tiempos de tratamiento con 1-MCP en la pérdida de peso de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=12$ para concentración y $n=16$ para tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$).

Intensidad respiratoria

La intensidad respiratoria (IR) no cambió significativamente en los primeros 9 dda en ningún tratamiento, sin embargo, a partir de ese momento empezó a incrementar en el control, alcanzando el climaterio ($122,43 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a los 19 dda. Para los demás tratamientos, la IR incrementó desde el día 14, sin observarse un climaterio claro. La concentración de 1 µL L^{-1} mostró los menores valores hasta los 21 dda (Fig 9A), mientras que dentro de los tiempos de tratamiento, no se presentaron diferencias significativas

($P>0.05$) (Fig 9B). Cuando los frutos alcanzaron el estado C7, no se observaron diferencias ($P=0.076$) con respecto al control (Fig 9).

Los frutos de bananito son climatéricos, es decir que incrementan la TR después de la madurez fisiológica. El pico de respiración varía con la edad de los frutos, de tal forma, que los frutos cosechados a las 7 semanas después de la floración, muestran el pico climatérico a los 16 días de almacenamiento a 20 °C, mientras que los frutos cosechados a las 8 semanas, presentan el climaterio ($\sim 180 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) entre 8 y 10 dda (Castro Benítez *et al.*, 2005; Pardo y Rubio, 2004). En éste estudio se utilizaron frutos cosechados a las 7 semanas después de la floración y el pico de respiración ($122,43 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se encontró a los 19 días de almacenamiento a 20 °C, sin embargo, en otro estudio utilizando frutos de 8 semanas, el climaterio ($135,96 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se presentó a los 8 días (García *et al.*, 2015. No publicado), es decir que los resultados encontrados en éste estudio corresponden a lo reportado en la literatura.

El efecto de la aplicación de 1-MCP en la respiración de los frutos es variable entre especies y dentro de los estados de maduración de una misma especie, encontrándose que el 1-MCP puede reducir la respiración, no afectarla, o incluso incrementarla (Watkins, 2006; Blankenship y Dole, 2003). En banano (*Musa* AAA) se ha reportado que la aplicación de 1-MCP en estado preclimatérico disminuye la IR y retrasa o inhibe el pico climatérico (Golding *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 2006), sin embargo, cuando la producción autocatalítica de etileno inicia, la aplicación de 1-MCP no tiene un efecto significativo en la IR (Pelayo *et al.*, 2003). Por su parte, en banano diploide “Khai” se ha encontrado que independientemente de la concentración de 1-MCP, la respiración disminuye con respecto al control (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006). En éste estudio, la aplicación de 1-MCP disminuyó la IR entre 12 y 14 días, sin presentarse un pico climatérico claro. Resultados similares fueron reportados por Botondi *et al.* (2014). La concentración de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ mostró los menores valores, sin diferencias significativas ($P>0.05$) entre las demás concentraciones, lo cual coincide con lo reportado por Jansasithorn y Kanlayanarat (2006) en banano “Khai”.

El mecanismo por el cual el 1-MCP disminuye la TR no es claro, pero puede estar relacionado con el retraso del aumento de los compuestos que son sustrato respiratorio, como, los carbohidratos, los ácidos orgánicos y otras reservas (Bhande *et al.*, 2008; Hailu, 2013). En éste estudio se encontró que el 1-MCP retrasó el aumento de los sólidos solubles totales, lo cual puede ser la causa y a su vez el efecto de la baja IR. En manzana se ha reportado que la aplicación de 1-MCP disminuye la concentración de ATP y por tanto de la energía necesaria para otros procesos durante la maduración (Xuan y Streif, 2008). Por otro lado, es posible que el 1-MCP disminuya la IR debido a que también disminuye la producción de etileno, con lo cual el proceso de maduración se hace más lento y se disminuye la emisión de CO_2 (Golding *et al.*, 1998; Pathak *et al.*, 2003). Por último, no se

puede descartar que el 1-MCP afecte la respiración a través de la inhibición de la actividad de las enzimas o expresión de genes que participan en la ruta bioquímica de la respiración, no obstante, no se han reportado estudios hasta la fecha en donde se evalué esta hipótesis.

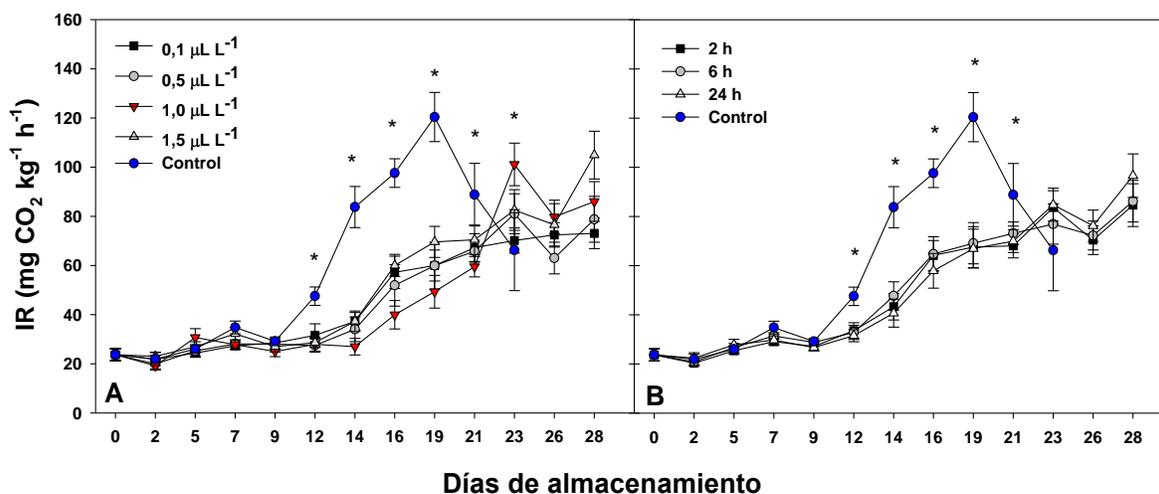


Figura 9. Efecto de (A) diferentes concentraciones y (B) tiempos de tratamiento con 1-MCP en la Intensidad respiratoria (IR) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=12$ para concentración y $n=16$ para tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$).

Color

El color disminuyó en todos los tratamientos durante el almacenamiento, aunque no se presentaron cambios significativos en los primeros 9 dda, a partir de ese momento, el valor de h empezó a disminuir en el control, lo cual coincidió con el aumento de la TR. Se presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) para el factor concentración, en donde los menores valores se presentaron en el control y los mayores en el tratamiento con $1 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig 10A). Por su parte, el factor tiempo de tratamiento con 1-MCP, sólo mostró diferencias con respecto al control, pero no entre los niveles de dicho factor. Los frutos del control alcanzaron el estado C7 ($^{\circ}h=87,05$) a los 21 dda, mientras que para los demás tratamientos, este estado se alcanzó a los 28 dda ($^{\circ}h= 84,95$), sin diferencias significativas ($P=0.424$) (Fig 14C).

El color determinado por medio del valor de $^{\circ}h$ (ángulo hue) disminuye durante la maduración de banano, lo cual indica cambio de color de verde a amarillo (Pelayo *et al.*, 2003). El cambio de color en la epidermis de banano se debe a la degradación de clorofilas

por actividad enzimática y al desenmascaramiento de carotenoides (Hailu, 2013; Thompson, 2011). En bananito se ha reportado que la máxima actividad clorofilasa (~450 U clorofilasa mg proteína⁻¹) se presenta cuando los frutos pierden completamente el color verde, lo cual coincide con la máxima TR de los frutos (Castro Benítez *et al.*, 2005). Resultados similares fueron encontrados en éste estudio, debido a que el climaterio se presentó cuando los frutos tenían un valor de *h* de 88,84°, es decir en frutos amarillos (estado C5). El 1-MCP previene o disminuye la degradación de clorofilas y los cambios de color característicos de la maduración en un gran número de especies vegetales (Revisado por: Blankenship y Dole, 2003; Watkins, 2006), por ejemplo en banano se ha reportado que el 1-MCP retrasa el desarrollo de color amarillo de la epidermis (Golding *et al.*, 1998; (Jiang *et al.*, 1999b) Pelayo *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2010; Inaba *et al.*, 2007; De Martino *et al.*, 2007; Feygenberg *et al.*, 2012), lo cual coincide con lo encontrado en el presente estudio. El retraso del color está relacionado con la menor degradación (Oliveira Neto y Melo Silva, 2003) y mantenimiento de la fluorescencia de la clorofila (Fm) en la epidermis de los frutos (De Martino *et al.*, 2007).

El mecanismo por el cual el 1-MCP disminuye o retrasa el cambio de color en los frutos no se ha dilucidado completamente, pero puede estar relacionado con la disminución de la producción de etileno, con lo cual también disminuye la expresión de genes que participan en la degradación de clorofilas y síntesis de carotenoides, lo que a su vez permite a los frutos permanecer verdes por más tiempo. En éste sentido, se ha reportado en pera china (*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Emerald y *Pyrus ussuriensis* Maxim. cv. Jingbai) que el 1-MCP inhibe la expresión de genes claves en la ruta de degradación de clorofilas, como: *PAO* (*Pheophorbide a Oxygenase*), *NYC* (*Non-Yellow Colouring*), *NOL* (*NYC1-like*) y *SGRI* (*Stay-Sreen 1*), pero no afecta al gen *CHL1* (*Chlorophyllase 1*) (Cheng *et al.*, 2012), además, también se ha comprobado que el 1-MCP disminuye la expresión del gen *PSY1* (*Phytoene Synthase 1*), el cual es importante en la acumulación de carotenoides en tomate (Hoeberichts *et al.*, 2002). En banano se ha reportado que los genes *MaSGR*, *MaNYC* y *MaPAO* son los más importantes en la degradación de clorofilas (Du *et al.*, 2014), por lo cual es posible que el 1-MCP disminuya la expresión de estos genes, retrasando la degradación de clorofilas y el desarrollo de color amarillo en frutos de banano y bananito, sin embargo, esto debe ser comprobado a nivel experimental.

Firmeza y extensibilidad

La firmeza de los frutos de bananito incrementó levemente en los primeros 7 dda en todos los tratamientos, momento en el cual empezó a disminuir en el control, hasta alcanzar valores promedio de 2,97 N mm⁻² a los 21 dda. En los tratamientos con 1-MCP, la disminución ocurrió desde los 14 dda. Se presentaron diferencias significativas para el factor concentración de 1-MCP desde los 14 dda, en donde los valores más altos se

lograron con $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP (Fig 11A). Por su parte, el factor tiempo de tratamiento tuvo un comportamiento similar al factor concentración, sin diferencias significativas ($P>0.05$) dentro de los niveles de éste factor (Fig 11B). Cuando los frutos alcanzaron el estado C7 (Fig 14D), sólo hubo diferencias significativas ($P=0.037$) entre el tratamiento 8 ($1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 6 h de tratamiento) y el control, donde la firmeza del tratamiento 8 fue $4,84 \text{ N mm}^{-2}$ y la del control fue $2,97 \text{ N mm}^{-2}$. Por su parte, la extensibilidad de la epidermis aumentó durante el almacenamiento y sólo presentó diferencias significativas a los 14 dda en los dos factores evaluados, en donde los valores más altos se alcanzaron en el control ($7,57 \text{ mm}$) (Fig 11 A y B). Cuando los frutos alcanzaron el estado C7, los tratamientos 1 y 8 mostraron los valores más altos ($10,52$ y $10,25 \text{ mm}$ respectivamente) con respecto al control ($7,84 \text{ mm}$) (Fig 14E), lo cual correlacionó con los valores más altos de firmeza (Fig 14D).

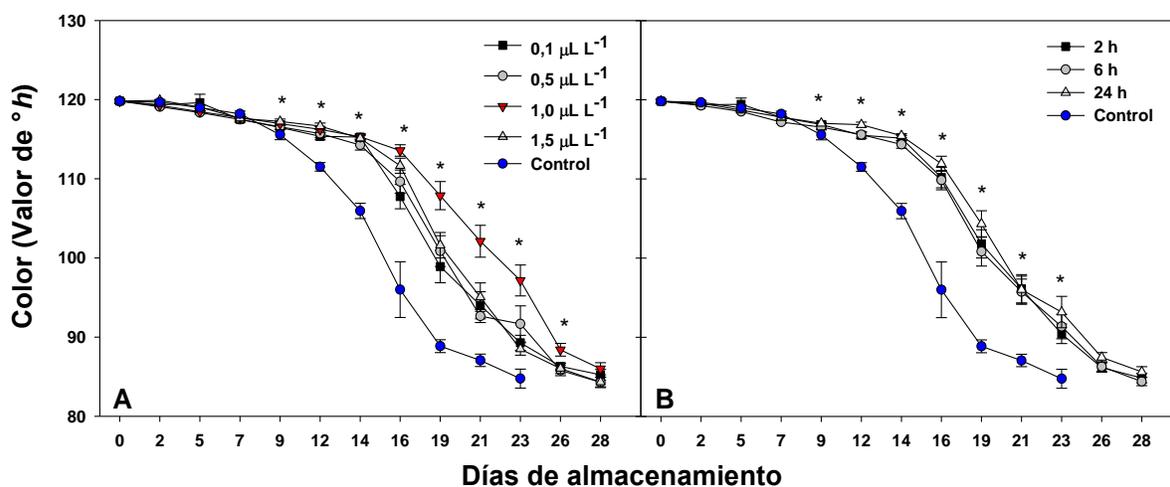


Figura 10. Efecto de (A) diferentes concentraciones y (B) tiempos de tratamiento con 1-MCP en el color (Valor de °h) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=12$ para concentración y $n=16$ para tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$).

La pérdida de firmeza o ablandamiento en frutos de banana está relacionada con 3 procesos principales: el primero corresponde a la degradación de almidón para formar azúcares; el segundo, a la degradación de las paredes celulares por actividad enzimática y el tercero al movimiento del agua de la epidermis a la pulpa, haciendo extensible a la epidermis (Dadzie y Orchard, 1997; Thompson, 2011; Toledo *et al.*, 2012; Haiulu *et al.*, 2013). La firmeza en los frutos de banana depende de la pulpa y la epidermis (De Martino *et al.*, 2007), en éste estudio se encontró que la firmeza en los primeros 7 dda incrementó ligeramente, lo cual se debió al aumento de la extensibilidad de la epidermis, es decir que al inicio de la

maduración de bananito, el ablandamiento se puede deber a la pérdida de agua de la epidermis, lo cual ocasiona que la epidermis sea más elástica, ofreciendo mayor resistencia a la penetración. Después de los 7 dda en el control y de 14 dda en los demás tratamientos con 1-MCP, la firmeza empezó a disminuir, lo cual correlacionó con el inicio del aumento de los SST (Fig 12A y 13A), confirmando el papel de la degradación de almidón en el ablandamiento de bananito. Con lo anterior, se puede afirmar que el retraso de la pérdida de firmeza en frutos de bananito tratados con 1-MCP se debió al retraso en el aumento de los SST, sin embargo, también se pudo deber a la disminución de la actividad de enzimas que degradan la pared celular, debido a que en banano, el ablandamiento de los frutos también es asociado a los cambios en la fracción péctica de la lamela media de la pared celular (Payasi y Sanwal, 2003).

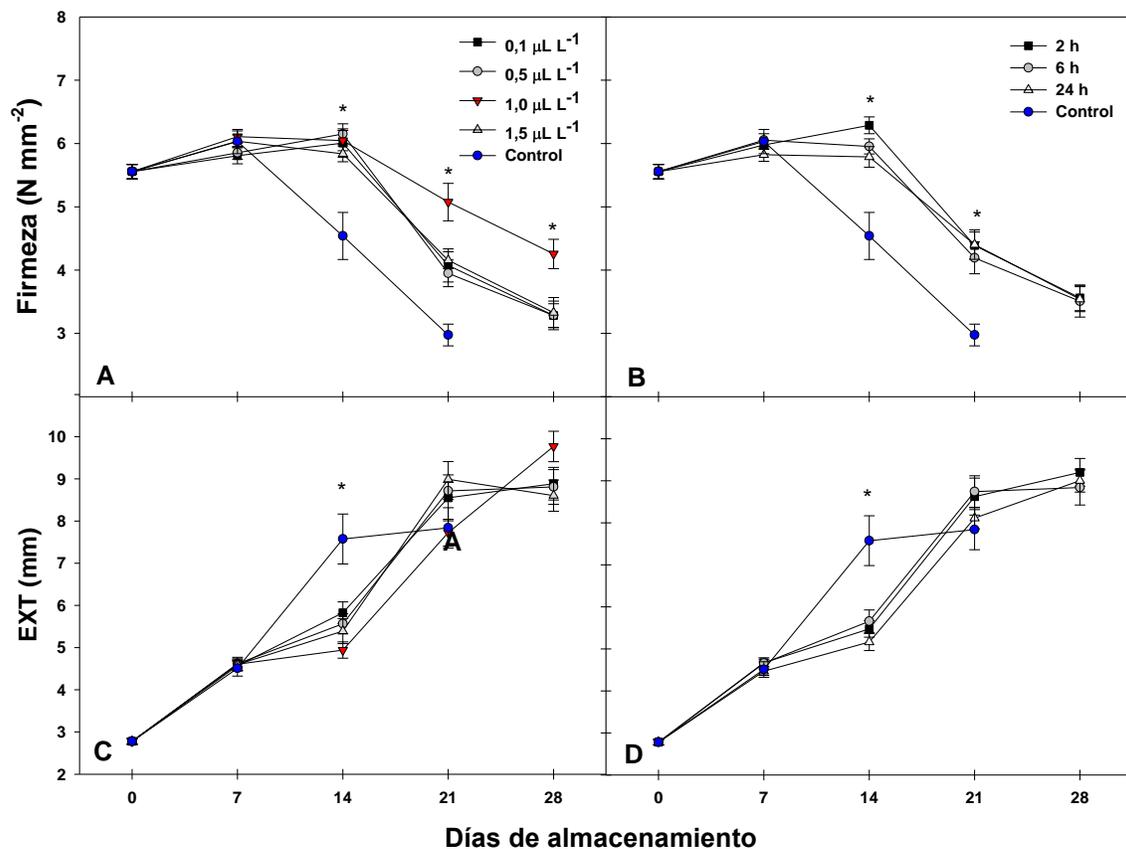


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones (A y C) y tiempos de tratamiento (B y D) con 1-MCP, en la firmeza (A y B) y la extensibilidad de la epidermis (C y D) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio (n=12 para concentración y n=16 para tiempo de tratamiento) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P < 0.05$).

En general, el 1-MCP disminuye el ablandamiento en muchos frutos (revisado por Blankenship y Dole, 2003), incluyendo banano (*Musa AAA*) (Jiang et al., 1999b) Jiang y Joyce, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Pelayo *et al.*, 2003; Phebe Ding y Darduri, 2009), banano “Khai” (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006), entre otros. Jiang *et al.* (2002) afirman que el ablandamiento es un proceso dependiente del etileno, por tanto, la aplicación de 1-MCP disminuye la producción de etileno, lo cual a su vez afecta la expresión de genes que codifican para enzimas que degradan la pared celular (Blankenship y Dole, 2003; Gupta *et al.*, 2006). En éste sentido, se ha reportado en banano que el 1-MCP disminuye la actividad de enzimas pectin-metil-esterasa (PME), poligalacturonasa (PG), celulasa y pectato liasa (PL) (Lohani *et al.*, 2004), resultados similares fueron reportados en melón (Supapvanich y Tucker, 2012), ciruela (Khan y Singh, 2007), además, en manzana se encontró que el 1-MCP disminuye la expresión de los genes *PME*, *β -GAL*, lo cual correlacionó con la baja actividad enzimática y la disminución del ablandamiento de los frutos (Wei *et al.*, 2010).

Algunos estudios han mostrado que la disminución de la firmeza en banano está en función de la concentración de 1-MCP, del estado de madurez (Moradinezhad *et al.*, 2008b), pero no del tiempo de tratamiento (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006; Jiang *et al.*, 1999a; Jiang *et al.*, 2002a; Pelayo *et al.*, 2003). Lo anterior coincide con lo encontrado en este estudio, debido a que la concentración que favoreció el mantenimiento de la firmeza por más tiempo fue $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig 11A), mientras que los tiempos de tratamiento no presentaron diferencias (Fig 11B). Además, en banano “Sucrier” se ha encontrado que la humedad relativa influye en la pérdida de firmeza directamente, siendo mayor a HR>90 % (Saengpook *et al.*, 2007), con lo cual es posible que en el presente estudio se haya presentado una baja pérdida de firmeza debido a que la HR estuvo entre 55 y 65 %.

Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales (SST) no cambiaron significativamente en los primeros 7 dda en ningún tratamiento, pero a partir de éste momento empezó un rápido aumento en el control hasta alcanzar valores de 16 °Brix. El aumento en los SST para los tratamientos con 1-MCP se presentó desde el 14 dda, es decir que el uso de 1-MCP retraso por 7 días el incremento de ésta variable. Se presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) en las concentraciones de 1-MCP, siendo menor en $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y mayor en $0,1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP (Fig 12A). Por su parte, en el factor tiempo de tratamiento, sólo se observaron diferencias ($P<0.05$) con respecto al control, pero no dentro de los niveles de éste factor (Fig 13A). Al final del almacenamiento, no se presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) con respecto al control (Fig 14F).

El almidón es la principal forma de reserva de carbono en los frutos verdes de banano, constituyendo entre 20 y 25 % del peso fresco de la pulpa. Durante la maduración, el

almidón es degradado a azúcares solubles, como sacarosa en las primeras etapas y posteriormente a glucosa, fructosa y trazas de maltosa (Oliveira *et al.*, 2006; Thompson, 2011; Haiulu *et al.*, 2013). La degradación de almidón es un proceso complejo en el cual participan varias enzimas de diferentes vías metabólicas, como: α y β -amilasas (Oliveira *et al.*, 2006) y fosforilasas de almidón α -1,4-glucano-fosforilasa (Mainardi *et al.*, 2006; Mota *et al.*, 2002). Con lo anterior, el contenido de sólidos solubles totales (SST) incrementa durante la maduración, aunque en estado de sobremadurez, también puede disminuir debido a la conversión de azúcares en alcoholes (Dadzie y Orchard, 1997). Los SST aumentan desde 1% en frutos verdes hasta alrededor de 20% en frutos maduros (Haiulu *et al.*, 2013). El mayor valor de SST alcanzado en éste estudio para el control fue de $16,0 \pm 0,75$ °Brix, aunque es posible que los SST continuarán incrementando después del estado de maduración C7, teniendo en cuenta que los bananos diploides tipo “Sucrier” alcanzan valores alrededor de 24 % (°Brix) (Sangudom *et al.*, 2014).

En el presente estudio se encontró que la aplicación de 1-MCP retrasó el aumento de los SST por 14 dda. Resultados similares fueron reportados en banano (Oliveira *et al.*, 2006; Moradinezhad *et al.*, 2008b; Phebe Ding y Darduri, 2009; Botondi *et al.*, 2014). Lo anterior puede ser debido a que el 1-MCP disminuye la degradación de almidón en banano, mediante la inhibición de la actividad de la enzima β -amilasa por 28 días, así como lo sugieren Oliveira *et al.* (2006), quienes, además encontraron que los SST incrementaron desde el día 14, indicando que otras enzimas también son importantes en la degradación de almidón. En éste sentido, Mainardi *et al.* (2006) encontraron que el 1-MCP no inhibía la actividad de fosforilasas de almidón (Pho), incluso las inducía ligeramente, no obstante, los contenidos de almidón permanecieron altos por más tiempo, es decir, que existen otras enzimas importantes en la degradación de almidón en banano que son inhibidas por el 1-MCP (Oliveira *et al.*, 2006).

Acidez total titulable y relación de madurez

La acidez total titulable (ATT) presentó un pico a los 14 dda en el control (0,210 %) y a los 21 dda en los tratamientos con 1-MCP (0,169-0,198 %). Se presentaron diferencias de los tratamientos con 1-MCP y el control, pero no hubo diferencias en los niveles de cada factor (Fig 12B y 13B). Al final del almacenamiento, cuando los frutos alcanzaron el estado de madurez C7, no hubo diferencias con respecto al control (Fig 14G). Finalmente, la relación de madurez (RM) incrementó durante el almacenamiento con un comportamiento similar a los SST (Fig 5C y 6C), de tal forma que al final del almacenamiento sólo se presentaron diferencias entre el control y el tratamiento 5 ($0,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 6 h) (Fig 14H).

Los ácidos predominantes en banano son el málico, cítrico y oxálico (Wyman y Palmer, 1964). Usualmente, los ácidos orgánicos disminuyen durante la maduración debido a la

respiración o su conversión en azúcar por el proceso de gluconeogénesis, sin embargo, en banano, se ha encontrado que la ATT incrementa durante la maduración hasta cierto punto (Thompson, 2011). En éste estudio, la ATT incrementó hasta los 7 dda en el control y hasta los 14 dda en los tratamientos con 1-MCP, lo cual coincidió con el inicio de la disminución de los SST y la firmeza, además del aumento de la IR. Resultados similares fueron reportados en banano (Dadzie y Orchard, 1997; Chang-Yuen y Sáenz, 2005). El papel del 1-MCP sobre los ácidos orgánicos y la ATT es menos comprendido comparado con otras variables y los resultados varían entre especies (Blankenship y Dole, 2003). En general, el 1-MCP disminuye la pérdida de ATT durante la maduración de frutos climatéricos (Watkins, 2006), lo cual coincide con lo encontrado en éste estudio. La relación de madurez (RM) indica el balance entre azúcares y ácidos y está relacionada con el sabor y la aceptabilidad del producto por los consumidores (Dadzie y Orchard, 1997). Los resultados encontrados aquí, muestran que el 1-MCP retrasa el aumento de la RM.

Efecto de la concentración y tiempo de tratamiento con 1-MCP.

En éste estudio se encontró que el 1-MCP, independiente de la concentración o tiempo de tratamiento, retrasa por 7 días con respecto al control, el desarrollo de algunas variables poscosecha relacionadas con la maduración de bananito, como: cambio de color, intensidad respiratoria, firmeza, extensibilidad, sólidos solubles totales, acidez total titulable y relación de madurez. Mientras que en la pérdida de peso, el 1-MCP no tuvo un efecto significativo en los primeros 19 dda, sin embargo, a partir de ese momento, los frutos del control presentaron un ligero incremento de la PP con respecto a los tratamientos con 1-MCP, lo cual pudo haber sido debido al desarrollo de manchas en la epidermis (Trakulnaleumsai *et al.*, 2006). Lo anterior corrobora que la transpiración es el principal factor que regula la pérdida de peso en la poscosecha de frutas (Kader y Yahia, 2011), la cual no es afectada significativamente por el 1-MCP (Blankenship y Dole, 2003). Las concentraciones de 1-MCP evaluadas (0,1; 0,5; 1,0 y 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$), sólo presentaron diferencias con respecto al nivel 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$, lo cual indica que ésta concentración es adecuada para retrasar por 7 días el proceso de maduración en frutos de bananito.

En banano (*Musa AAA*) y banano diploide (*Musa AA*) se han realizado múltiples estudios para encontrar la concentración de 1-MCP más adecuada para retrasar la maduración, sin embargo, los resultados no son constantes y en algunos casos son contradictorios, encontrándose un efecto más significativo a concentraciones entre 0,25 y 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006; Jiang *et al.*, 1999a; Pelayo *et al.*, 2003), aunque, también se ha reportado, que dependiendo del estado de maduración, las concentraciones superiores a 0,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ pueden inhibir el desarrollo de color, llevando a una maduración no homogénea (Harris *et al.*, 2000). No obstante, Feygenberg *et al.* (2012) reportaron que las concentraciones de 1-MCP muy bajas (0,025 $\mu\text{L L}^{-1}$) en bananos provenientes de manos

jóvenes, causan inhibición irreversible de la maduración, incluso con la aplicación de etileno exógeno, aunque concentraciones entre 0,05 y 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ disminuyen el desarrollo de color amarillo, pero no afectan el color final. Lo anterior sugiere una red compleja de interacciones entre la edad de los frutos, la concentración de 1-MCP, y la aplicación de etileno exógeno, que no permiten realizar generalizaciones del efecto del 1-MCP a una dosis en particular para bananito, sin embargo, en este estudio se encontró que una concentración de 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ es eficaz para retrasar la maduración de este frutal.

Los tiempos de tratamiento con 1-MCP analizados en éste estudio no afectaron significativamente el desarrollo de las variables evaluadas, excepto la pérdida de peso. Resultados similares fueron reportados por Jansasithorn y Kanlayanarat (2006), Jiang *et al.* (1999a), Jiang *et al.* (2002a), Pelayo *et al.* (2003). Lo anterior puede ser debido, a que el tiempo medio ($T_{1/2}$) de absorción del 1-MCP a los tejidos de la epidermis de plátano, fue de 2,3 horas, es decir que se absorbe cerca del 28,97 % del 1-MCP en la primera hora de tratamiento (Nanthachai *et al.*, 2007), con lo cual se puede inferir que las primeras 2 h de tratamiento utilizadas en este estudio fueron suficientes para bloquear los receptores en la epidermis de bananito. A pesar de lo anterior, teniendo en cuenta que el número de receptores incrementa con la maduración, para posteriores estudios se recomienda un tiempo de tratamiento de 6 h, ya que con base en la ecuación de tiempo de absorción reportada por Nanthachai *et al.* (2007) ($y = 98,38 \exp(-0,2945*\text{tiempo})$), más del 80 % 1-MCP es absorbido en las primeras 6 h de tratamiento, lo cual aseguraría un efecto favorable en el retraso de la maduración de bananito.

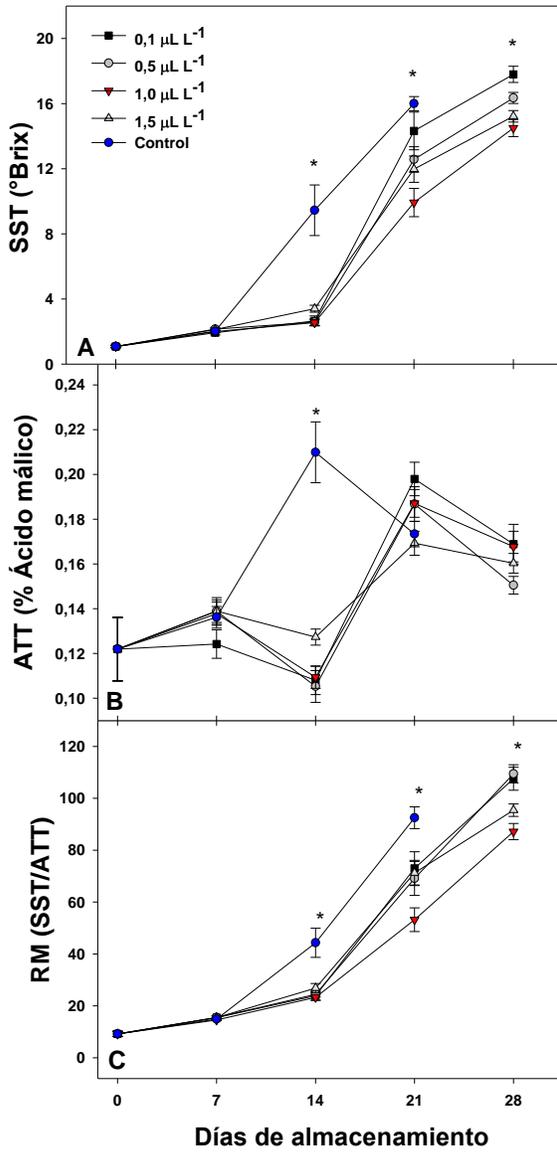


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de 1-MCP, en los SST (A), ATT (B) y RM (C) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=12$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$).

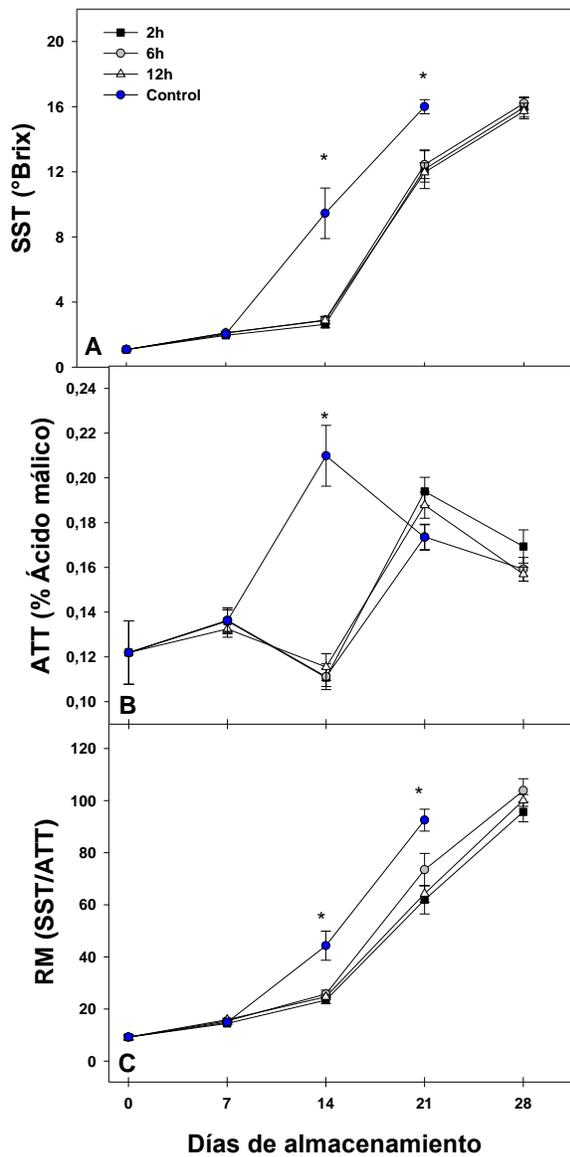


Figura 13. Efecto de diferentes tiempos de tratamiento con 1-MCP, en los SST (A), ATT (B) y RM (C) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=16$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$).

El 1-MCP retrasa la maduración de bananito pero no afecta negativamente los valores de las variables en estado C7.

Con base en los resultados obtenidos, se puede afirmar que el 1-MCP no afectó negativamente el desarrollo normal de la maduración en bananito, es decir que el 1-MCP sólo retraso y no bloqueo irreversiblemente la maduración. Lo anterior es debido a que los frutos tratados con 1-MCP no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) con respecto al control, en cuanto a color, TR, SST, ATT, además el tratamiento 8, presentó mayor firmeza y extensibilidad. La mayor PP en frutos tratados con 1-MCP es debida a que los frutos tuvieron una semana más de almacenamiento, es decir mayor tiempo para transpirar y perder peso. Los frutos tratados con 1-MCP pueden recuperar la capacidad de madurar normalmente debido a la síntesis de nuevos receptores (Cameron y Reid, 2001; In *et al.*, 2013), lo cual ocurre más rápido a temperaturas entre 30 y 40 °C (Jiang *et al.*, 2002a) y a concentraciones de O₂ entre 60 y 100 % (Jiang y Joyce, 2003). En éste sentido, Sisler *et al.* (2003) reportan que el tiempo de inactivación de los receptores por el 1-MCP varía entre especies, pero es de alrededor de 12 días en banano, mientras que en bananito se encontró que los frutos recuperaron la capacidad de madurar después de 14 días de almacenamiento (7 días después comparado con el control).

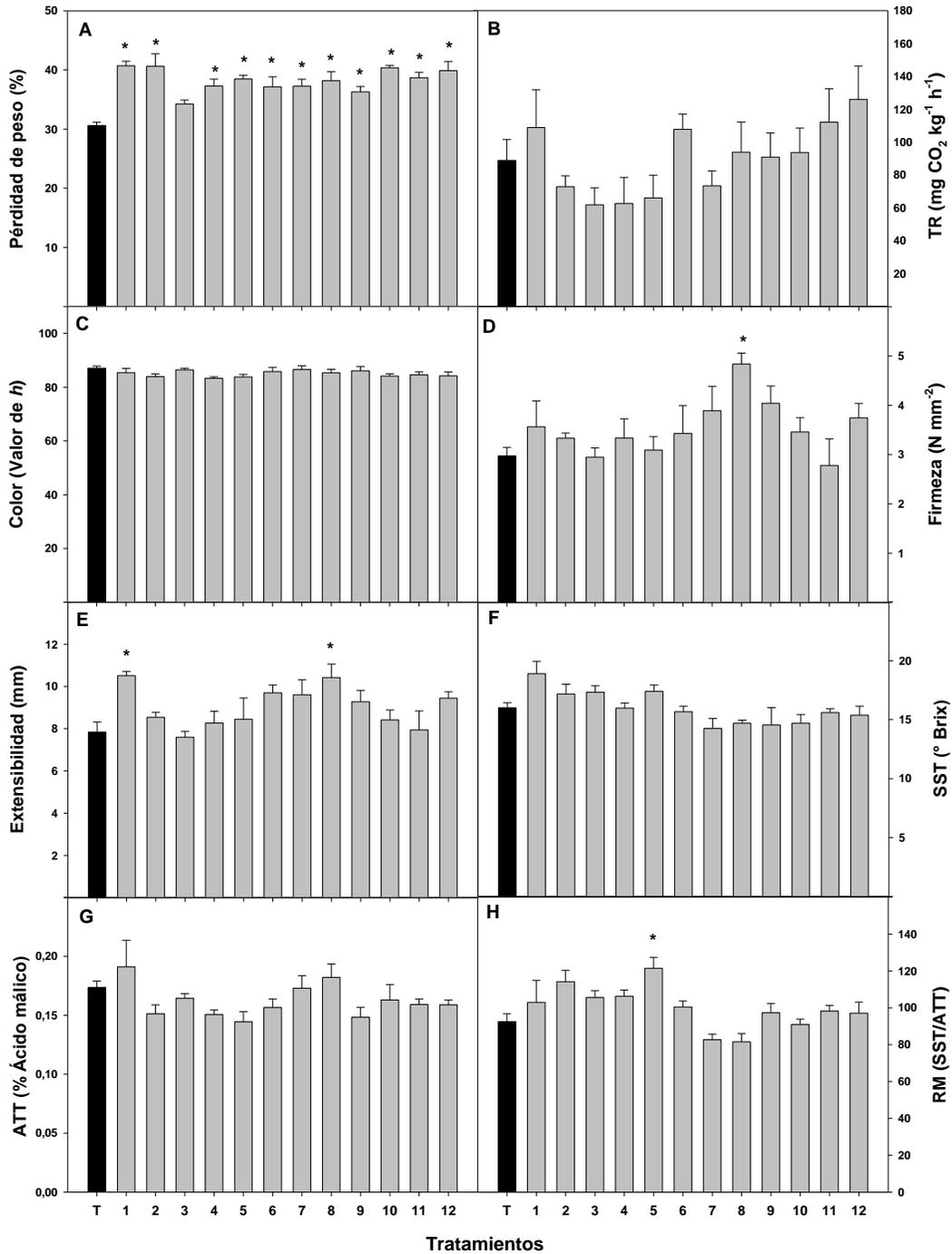


Figura 12. Efecto de diferentes tratamientos (concentración * tiempo de tratamiento con 1-MCP) en: (A) pérdida de peso; (B) intensidad respiratoria; (C) color; (D) firmeza; (E) extensibilidad; (F) SST; (G) ATT y (H) relación de madurez en frutos de bananito cuando se alcanzó el estado de madurez 7 (C7, en el control a los 21 d y en los demás tratamientos a los 28 d). Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al control (T) según la prueba Dunnett ($P < 0.05$).

5.3. Conclusiones

El 1-MCP, independiente de la concentración o tiempo de tratamiento, retrasó por 7 días con respecto al control, el desarrollo de algunas variables poscosecha relacionadas con la maduración de bananito, como: cambio de color, intensidad respiratoria, firmeza, extensibilidad, sólidos solubles totales, acidez total titulable y relación de madurez. La concentración de 1-MCP más adecuada para retrasar la maduración de bananito fue 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$. No se observaron diferencias significativas con respecto a los tiempos de tratamiento con 1-MCP, sin embargo, se recomiendan 6 h de tratamiento, teniendo en cuenta que más del 80% del 1-MCP es absorbido en las primeras 6 h. El desarrollo normal de la maduración no fue afectado negativamente por la aplicación de 1-MCP, debido a que no se presentaron diferencias en las variables color, TR, SST y ATT, cuando los frutos alcanzaron el estado de maduración C7 en el control, comparado con los tratamientos con 1-MCP.

5.4. Literatura citada

- Asif, M.H., Pathak, N., Solomos, T., Trivedi, P.K., 2009. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *South Afr. J. Bot.* 75, 137–144.
- Bagnato, N., Barrett, R., Sedgley, M., Klieber, A., 2003. The effects on the quality of Cavendish bananas, which have been treated with ethylene, of exposure to 1-methylcyclopropene. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38, 745–750.
- Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R., Nath, P., 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol. Adv.* 28, 94–107.
- Barry, C.S., Giovannoni, J.J., 2007. Ethylene and Fruit Ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26, 143–159.
- Bartz, J.A., Brecht, J.K., 2002. *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. CRC Press.
- Bhande, S.D., Ravindra, M.R., Goswami, T.K., 2008. Respiration rate of banana fruit under aerobic conditions at different storage temperatures. *J. Food Eng., CHISA 2006 Special Section* (pp. 1-63) Selected papers from the symposium “Food Processing and Technology” held at the 2006 CHISA Congress, Prague, Czech Republic 2006 CHISA Congress 87, 116–123.
- Binder, B.M., 2008. The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. *Plant Sci., Ethylene Biology* 175, 8–17.

- Blankenship, S.M., Dole, J.M., 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1–25.
- Bleecker, A.B., Kende, H., 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 1–18.
- Botondi, R., De Sanctis, F., Bartoloni, S., Mencarelli, F., 2014. Simultaneous application of ethylene and 1-MCP affects banana ripening features during storage. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2170–2178.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., Pech, J.C., 2010. Mechanism of Fruit Ripening, in: Pua, E.C., Davey, M.R. (Eds.), *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 319–339.
- Bregoli, V.Z., 2005. Postharvest 1-methylcyclopropene application in ripening control of “Stark Red Gold” nectarines: Temperature-dependent effects on ethylene production and biosynthetic gene expression, fruit quality, and polyamine levels. *Postharvest Biol. Technol.* 111–121.
- Cameron, A.C., Reid, M.S., 2001. 1-MCP blocks ethylene-induced petal abscission of *Pelargonium peltatum* but the effect is transient. *Postharvest Biol. Technol.* 22, 169–177.
- Castro Benítez, M., Restrepo Sánchez, L.P., Narváez Cuenca, C.E., 2005. Actividad de clorofilasa durante la maduración del banano bocadillo (*Musa accuminata*) (Simons). *Actual. Biológicas* 27, 151–158.
- Cervantes, E., 2002. Ethylene: new interactions, still ripening. *Trends Plant Sci.* 7, 334–335.
- Chang-Yuen, K., Sáenz, M.V., 2005. Efecto Del 1-Metil-Ciclopropeno (1-Mcp) En La Maduración De Banano [WWW Document]. *Agron. Costarric.* URL <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=43626961024> (accessed 3.25.15).
- Chen, L., Zhong, H., Kuang, J., Li, J., Lu, W., Chen, J., 2011. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* 234, 377–390.
- Chen, Y.-F., Etheridge, N., Schaller, G.E., 2005. Ethylene Signal Transduction. *Ann. Bot.* 95, 901–915.
- Cheng, Y., Dong, Y., Yan, H., Ge, W., Shen, C., Guan, J., Liu, L., Zhang, Y., 2012. Effects of 1-MCP on chlorophyll degradation pathway-associated genes expression and chloroplast ultrastructure during the peel yellowing of Chinese pear fruits in storage. *Food Chem.* 135, 415–422.

- Choi, S.T., Huber, D.J., 2009. Differential sorption of 1-methylcyclopropene to fruit and vegetable tissues, storage and cell wall polysaccharides, oils, and lignins. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 62–70.
- Choudhury, S.R., Roy, S., Sengupta, D.N., 2008. Characterization of transcriptional profiles of MA-ACS1 and MA-ACO1 genes in response to ethylene, auxin, wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. *J. Plant Physiol.* 165, 1865–1878.
- Choudhury, S.R., Roy, S., Sengupta, D.N., 2009. A comparative study of cultivar differences in sucrose phosphate synthase gene expression and sucrose formation during banana fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 54, 15–24.
- Costa, F., Stella, S., Weg, W.E.V. de, Guerra, W., Cecchinell, M., Dallavia, J., Koller, B., Sansavini, S., 2005. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica* 141, 181–190.
- Dadzie, B.K., Orchard, J.E., 1997. Routine post-harvest screening of banana/plantain hybrids: criteria and methods. 63 pp.
- De Martino, G., Mencarelli, F., Golding, J.B., 2007. Preliminary investigation into the uneven ripening of banana (*Musa* sp.) peel. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 35, 193–199.
- De Oliveira Neto, O. do C., de Melo Silva, S., 2003. Mudanças nas Clorofilas e Carotenóides Totais de Banana “Prata” Tratada com 1-Metilciclopropeno e Atmosfera Modificada. (Portuguese). *Proc. ISTH* 47, 122–124.
- Domínguez, M., Vendrell, M., 1994. Effect of ethylene treatment on ethylene production, EFE activity and ACC levels in peel and pulp of banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 4, 167–177.
- Du, L., Yang, X., Song, J., Ma, Z., Zhang, Z., Pang, X., 2014. Characterization of the stage dependency of high temperature on green ripening reveals a distinct chlorophyll degradation regulation in banana fruit. *Sci. Hortic.* 180, 139–146.
- Evrard, A., Boule, N., Lutfalla, G. s, 2009. Real-Time PCR, in: Boisseau, P., Houdy, P., Lahmani, M. (Eds.), *Nanoscience*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 841–869.
- Ferris, R.S.B., Ortiz, R., Vuylsteke, D., 1999. Fruit quality evaluation of plantains, plantain hybrids, and cooking bananas. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 73–81.
- Feygenberg, O., Ben-Arie, R., Pesis, E., 2012. Postharvest application of 1-MCP to green or yellow banana for extending storability and shelf-life, *Acta Horticulturae*.
- Fluhr, R., 1998. Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci.* 3, 141–146.

- Gapper, N.E., McQuinn, R.P., Giovannoni, J.J., 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 82, 575–591.
- Golding, J.B., Shearer, D., Wyllie, S.G., McGlasson, W.B., 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 87–98.
- Gupta, S.M., Srivastava, S., Sane, A.P., Nath, P., 2006. Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: Presence of distinct fruit specific, ethylene induced and ethylene repressed expression. *Postharvest Biol. Technol.* 42, 16–22.
- Harris, D.R., Seberry, J.A., Wills, R.B.H., Spohr, L.J., 2000. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 303–308.
- Hoerberichts, F.A., Van Der Plas, L.H.W., Woltering, E.J., 2002. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 26, 125–133.
- Hu, H.-L., Do, Y.-Y., Huang, P.-L., 2012. Expression profiles of a MhCTR1 gene in relation to banana fruit ripening. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* 56, 47–55.
- Huber, D.J., 2008. Suppression of Ethylene Responses Through Application of 1-Methylcyclopropene: A Powerful Tool for Elucidating Ripening and Senescence Mechanisms in Climacteric and Nonclimacteric Fruits and Vegetables. *HortScience* 43, 106–111.
- Huber, D.J., Hurr, B.M., Lee, J.S., Lee, J.H., 2010. 1-Methylcyclopropene sorption by tissues and cell-free extracts from fruits and vegetables: Evidence for enzymic 1-MCP metabolism. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 123–130.
- Hubert, O., Chillet, M., Juliannus, P., Fils-Lycaon, B., Mbéguié-A-Mbéguié, D., 2010. Effect of mode of ripening on ethylene biosynthesis during ripening of diploid banana (*Musa* spp.) fruit, *Acta Horticulturae*.
- Hubert, O., Mbéguié-A-Mbéguié, D., 2012. Expression patterns of ethylene biosynthesis genes from bananas during fruit ripening and in relationship with finger drop. *AoB Plants* 2012, pls041.
- In, B.C., Strable, J., Binder, B.M., Falbel, T.G., Patterson, S.E., 2013. Morphological and molecular characterization of ethylene binding inhibition in carnations. *Postharvest Biol. Technol.* 86, 272–279.

- Inaba, A., Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W.-J., Nakano, R., Kubo, Y., 2007. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J. Exp. Bot.* 58, 1047–1057.
- Oliveira, Júnior, A.V., Priscila Zaczuk Bassinello, Cordenunsi, B.R., Mainardi, J.A., Purgatto, E., Lajolo, F.M., 2006. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 41–47.
- Jafari, Z., Haddad, R., Hosseini, R., Garoosi, G., 2013. Cloning, identification and expression analysis of ACC oxidase gene involved in ethylene production pathway. *Mol. Biol. Rep.* 40, 1341–1350.
- Jansasithorn, R., Kanlayanarat, S., 2006. Effect of 1-MCP on physiological changes in banana “Khai,” *Acta Horticulturae*.
- Jeong, J., Huber, D.J., 2004. Suppression of Avocado (*Persea americana* Mill.) Fruit Softening and Changes in Cell Wall Matrix Polysaccharides and Enzyme Activities: Differential Responses to 1-MCP and Delayed Ethylene Application. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129, 752–759.
- Jiang, Y., Fu, J., 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regul.* 30, 193–200.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., 2003. Softening response of 1-methylcyclopropene-treated banana fruit to high oxygen atmospheres. *Plant Growth Regul.* 41, 225–229.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999a. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biol. Technol.* 16, 187–193.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999b. Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regul.* 28, 77–82.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 2002a. Softening response of banana fruit treated with 1-methylcyclopropene to high temperature exposure. *Plant Growth Regul.* 36, 7–11.
- Jin, Z.-Q., Xu, B.-Y., Liu, J.-H., Su, W., Zhang, J.-B., Yang, X.-L., Jia, C.-H., Li, M.-Y., 2009. Identification of genes differentially expressed at the onset of the ethylene climacteric in banana. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 307–309.
- Ju, C., Yoon, G.M., Shemansky, J.M., Lin, D.Y., Ying, Z.I., Chang, J., Garrett, W.M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M.L., Cooper, B., Kieber, J.J., Chang, C., n.d. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis [WWW Document]. URL <http://www.pnas.org> (accessed 10.17.14).

- Kader, A.A., Yahia, E.M., 2011. 3 - Postharvest biology of tropical and subtropical fruits, in: Yahia, E.M. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 79–111.
- Ketsa, S., Wongs-aree, C., Klein, J.D., 2000. Storage life and quality of “Kluai Khai” banana fruit affected by modified atmosphere using bulk packaging. *Thai J. Agric. Sci.* 33, 37–44.
- Khan, A.S., Singh, Z., 2007. 1-MCP regulates ethylene biosynthesis and fruit softening during ripening of “Tegan Blue” plum. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 298–306.
- Lacey, R.F., Binder, B.M., 2014. How plants sense ethylene gas — The ethylene receptors. *J. Inorg. Biochem.* 133, 58–62.
- Li, J., Zhu, H., Yuan, R., 2010. Profiling the Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Ethylene Perception, and Cell Wall Degradation during Fruit Abscission and Fruit Ripening in Apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 391–401.
- Lim, D.T.K., 2012. *Musa acuminata* (AA Group) “Sucrier,” in: *Edible Medicinal And Non Medicinal Plants*. Springer Netherlands, pp. 498–501.
- Liu, X., Shiomi, S., Nakatsuka, A., Kubo, Y., Nakamura, R., Inaba, A., 1999. Characterization of Ethylene Biosynthesis Associated with Ripening in Banana Fruit. *Plant Physiol.* 121, 1257–1265.
- Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W.-J., Nakano, R., Kubo, Y., 2007. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J. Exp. Bot.* 58, 1047–1057.
- Lohani, S., Trivedi, P.K., Nath, P., 2004. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 119–126.
- López, R., Asensio, C., Guzman, M.M., Boonham, N., 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of potato yellow vein virus (PYVV). *J. Virol. Methods* 136, 24–29.
- López-Gómez, R., Campbell, A., Dong, J.-G., Yang, S.-F., Angel Gómez-Lim, M., 1997. Ethylene biosynthesis in banana fruit: isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. *Plant Sci.* 123, 123–131.
- Ma, G., Wang, R., Wang, C.-R., Kato, M., Yamawaki, K., Qin, F., Xu, H.-L., 2008. Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli. *Plant Growth Regul.* 57, 223–232.
- Mainardi, J.A., Purgatto, E., Vieira, A., Bastos, W.A., Cordenunsi, B.R., Oliveira do Nascimento, J.R., Lajolo, F.M., 2006. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene

- (1-MCP) on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7294–7299.
- Martínez-Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillén, F., Valverde, J.M., Zapata, P., Castillo, S., Valero, D., 2007. Tools to Maintain Postharvest Fruit and Vegetable Quality through the Inhibition of Ethylene Action: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 543–560.
- Mathooko, F.M., Tsunashima, Y., Kubo, Y., Inaba, A., 2004. Full Length Research Paper - Expression of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus persica* L.) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1-methylcyclopropene: possible role of ethylene.
- McMurchie, E.J., Mcglasson, W.B., Eaks, I.L., 1972. Treatment of Fruit with Propylene gives Information about the Biogenesis of Ethylene. *Nature* 237, 235–236.
- Medina-Suárez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aked, J., Bird, C.R., Seymour, G.B., 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115, 453–461.
- Moradinezhad, F., Able, A.J., Klieber, A., Sedgley, M., 2006. Concentration and duration of ethylene treatment influences the response of banana to 1-methylcyclopropene. *Acta Horticulturae*.
- Moradinezhad, F., Sedgley, M., Klieber, A., Able, A. j., 2008a. Variability of responses to 1-methylcyclopropene by banana: influence of time of year at harvest and fruit position in the bunch. *Ann. Appl. Biol.* 152, 223–234.
- Moradinezhad, F., Sedgley, M., Klieber, A., Able, A. j., 2008b. Variability of responses to 1-methylcyclopropene by banana: influence of time of year at harvest and fruit position in the bunch. *Ann. Appl. Biol.* 152, 223–234.
- Mota, R.V. da, Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R. do, Purgatto, E., Rosseto, M.R., Lajolo, F.M., 2002. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta* 216, 325–333.
- Nakatsuka, A., Shiomi, S., Kubo, Y., Inaba, A., 1997. Expression and Internal Feedback Regulation of ACC Synthase and ACC Oxidase Genes in Ripening Tomato Fruit. *Plant Cell Physiol.* 38, 1103–1110.
- Nanthachai, N., Ratanachinakorn, B., Kosittrakun, M., Beaudry, R.M., 2007. Absorption of 1-MCP by fresh produce. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 291–297.
- Nath, P., Bouzayen, M., Pech, J.C., Mattoo, A.K. (Eds.), 2014. *Fruit Ripening: Physiology, Signalling and Genomics*. CABI, Boston, MA.

- Park, Y.-M., 2012. 1-MCP application for horticultural commodities in Korea: Practical potential and future task. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53, 441–446.
- Pathak, N., Asif, M.H., Dhawan, P., Srivastava, M.K., Nath, P., 2003. Expression and activities of ethylene biosynthesis enzymes during ripening of banana fruits and effect of 1-MCP treatment. *Plant Growth Regul.* 40, 11–19.
- Paul, V., Pandey, R., 2013. Delaying tomato fruit ripening by using 1-methylcyclopropene (1-MCP) for better postharvest management: current status and prospects in India. *Indian J. Plant Physiol.* 18, 195–207.
- Paull, R.E., 1996. Ethylene, storage and ripening temperatures affect Dwarf Brazilian banana finger drop. *Postharvest Biol. Technol.* 8, 65–74.
- Payasi, A., Sanwal, G.G., 2003. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry* 63, 243–248.
- Pelayo, C., Vilas-Boas, E.V. de B., Benichou, M., Kader, A.A., 2003. Variability in responses of partially ripe bananas to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 75–85.
- Phebe Ding, Darduri, K.B., 2009. Responses of *Musa* AAA Berangan to 1-methylcyclopropene. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 32, 125–132.
- Pinheiro, A.C.M., Boas, V., Barros, E.V. de, Bolini, H.M.A., 2010. Prolongamento da vida pós-colheita de bananas-maçã submetidas ao 1-metilciclopropeno (1-MCP) - qualidade sensorial e física. *Food Sci. Technol. Camp.* 30, 132–137.
- Promyou, S., Ketsa, S., Van Doorn, W.G., 2007. Effect of surface coating on ripening and early peel spotting in “Sucrier” banana (*Musa acuminata*). *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 35, 259–265.
- Reid, M.S., Staby, G.L., 2008. A Brief History of 1-Methylcyclopropene. *HortScience* 43, 83–85.
- Saengpook, C., Ketsa, S., van Doorn, W.G., 2007. Effects of relative humidity on banana fruit drop. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 151–154.
- Serek, M., Sisler, E.C., Reid, M.S., 1995. Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers. *Plant Growth Regul.* 16, 93–97.
- Singh, R., Singh, P., Pathak, N., Singh, V.K., Dwivedi, U.N., 2007. Modulation of mango ripening by chemicals: physiological and biochemical aspects. *Plant Growth Regul.* 53, 137–145.
- Sisler, E.C., Alwan, T., Goren, R., Serek, M., Apelbaum, A., 2003. 1-substituted cyclopropenes: Effective Blocking Agents for Ethylene Action in Plants. *Plant Growth Regul.* 40, 223–228.

- Sisler, E.C., Dupille, E., Serek, M., 1996. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Regul.* 18, 79–86.
- Sisler, E.C., Serek, M., 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.* 100, 577–582.
- Supapvanich, S., Tucker, G.A., 2012. The Effect of 1-Methylcyclopropene (1-MCP) on Quality and Cell Wall Hydrolases Activities of Fresh-Cut Muskmelon (*Cucumis melo* var *reticulatus* L.) During Storage. *Food Bioprocess Technol.* 6, 2196–2201.
- Thompson, A.K., 2011. 10 - Banana (*Musa* spp.), in: Yahia, E.M. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 216–244e.
- Thumdee, S., Manenoi, A., Chen, N.J., Paull, R.E., 2010. Papaya Fruit Softening: Role of Hydrolases. *Trop. Plant Biol.* 3, 98–109.
- Toledo, T.T., Nogueira, S.B., Cordenunsi, B.R., Gozzo, F.C., Pilau, E.J., Lajolo, F.M., do Nascimento, J.R.O., 2012. Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 70, 51–58.
- Trakulnaleumsai, C., Ketsa, S., van Doorn, W.G., 2006. Temperature effects on peel spotting in “Sucrier” banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 285–290.
- V, R., J. c , Galán Saúco, 2012. *Plátanos y bananas*. Editorial Paraninfo.
- Varanasi, V., Shin, S., Johnson, F., Mattheis, J.P., Zhu, Y., 2013. Differential Suppression of Ethylene Biosynthesis and Receptor Genes in “Golden Delicious” Apple by Preharvest and Postharvest 1-MCP Treatments. *J. Plant Growth Regul.* 32, 585–595.
- Vargas-Calvo, A., Sandoval-Fernández, J.A., 2005. Agronomic evaluation of production and quality of Yangambi km 5 AAA and Dátil AA. *Infomusa* v. 14, no. 1, p. 6–10.
- Wang, P., Zhang, B., Li, X., Xu, C., Yin, X., Shan, L., Ferguson, I., Chen, K., 2010. Ethylene signal transduction elements involved in chilling injury in non-climacteric loquat fruit. *J. Exp. Bot.* 61, 179–190.
- Watkins, C.B., 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv., Ethylene biology: A tribute to Edward C. Sisler* 24, 389–409.
- Wei, J., Ma, F., Shi, S., Qi, X., Zhu, X., Yuan, J., 2010. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 147–154.

- Wyman, H., Palmer, J.K., 1964. Organic Acids in the Ripening Banana Fruit. *Plant Physiol.* 39, 630–633.
- Xiao, Y., Chen, J., Kuang, J., Shan, W., Xie, H., Jiang, Y., Lu, W., 2013a. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes. *J. Exp. Bot.* 64, 2499–2510.
- Xiao, Y., Chen, J., Kuang, J., Shan, W., Xie, H., Jiang, Y., Lu, W., 2013b. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes. *J. Exp. Bot.* 64, 2499–2510.
- Yamane, M., Abe, D., Yasui, S., Yokotani, N., Kimata, W., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A., 2007. Differential expression of ethylene biosynthetic genes in climacteric and non-climacteric Chinese pear fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 220–227.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E., 1984. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 155–189.
- Yang, X., Song, J., Campbell-Palmer, L., Fillmore, S., Zhang, Z., 2013. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 78, 55–66.
- Yang, X., Song, J., Fillmore, S., Pang, X., Zhang, Z., 2011. Effect of high temperature on color, chlorophyll fluorescence and volatile biosynthesis in green-ripe banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 62, 246–257.
- Yoo, S.-D., Cho, Y., Sheen, J., 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci.* 14, 270–279.
- Zhang, L., Jiang, L., Shi, Y., Luo, H., Kang, R., Yu, Z., 2012. Post-harvest 1-methylcyclopropene and ethephon treatments differently modify protein profiles of peach fruit during ripening. *Food Res. Int.* 48, 609–619.
- Zhang, M.-J., Jiang, Y.-M., Jiang, W.-B., Liu, X.-J., 2006. Regulation of Ethylene Synthesis of Harvested Banana Fruit by 1 -Methylcyclopropene. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 111–115.

6. Resultados objetivo específico 2: El 1-MCP disminuye los efectos inducidos por el etileno en la maduración de frutos de bananito (*Musa AA Simmonds*)

Resumen

El bananito es un producto tropical exótico exportado por Colombia a diferentes mercados internacionales. Los frutos de bananito son climatéricos, es decir que después de la cosecha incrementan la respiración y producción de etileno. El etileno induce la maduración en frutos climatéricos, mientras que el 1-MCP la retrasa, incluso, la puede inhibir dependiendo de la concentración y estado de madurez de los frutos. En muchos estudios se ha evaluado el efecto de la interacción de estos dos compuestos, sin embargo, en bananito se desconoce el efecto de la aplicación de 1-MCP previa o posterior a la aplicación de etileno exógeno, en variables relacionadas con la maduración. En el presente estudio se evaluaron 5 tratamientos: 1-MCP, Etileno (ET), 1-MCP y posterior aplicación de etileno a los 5 días (1-MCP+ET), Etileno y posterior aplicación de 1-MCP a los 5 días (ET+1-MCP), además se incluyó un control. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de etileno, acelera el proceso de maduración (color, firmeza, etileno, respiración), mientras que el 1-MCP independiente de la aplicación previa o posterior de etileno lo retrasa. La aplicación de 1-MCP posterior al etileno es más eficiente en disminuir el avance de variables relacionadas con la epidermis, como: color, extensibilidad y firmeza, mientras que el efecto en variables relacionadas con la pulpa no fue tan significativo. No obstante, en general el 1-MCP fue eficaz en disminuir los efectos inducidos por el etileno durante la maduración de bananito.

Palabras claves. Bananito, etileno, 1-MCP, interacción, maduración, epidermis, pulpa.

Abstract

Bananito or Baby banana is an exotic tropical fruit exported by Colombia to various international markets. This fruits are climacteric, which means that after harvest increase respiration and ethylene production. Ethylene is a plant hormone that induces ripening in climacteric fruits, while the 1-MCP delayed it, even can inhibit depending on the concentration and ripening stage. Many studies have evaluated the effect of the interaction of these two compounds; however, in bananito the effect of applying 1-MCP before or after of the ethylene application on ripening-related variables is unknown. This study evaluated 5 treatments: 1-MCP, Ethylene (ET), 1-MCP and subsequent application of ethylene after 5

days (1-MCP + ET), Ethylene and subsequent application of 1-MCP at 5 days (ET + 1-MCP), besides a control was included. The results showed that the application of ethylene accelerates ripening (color, firmness, ethylene, respiration), while 1-MCP independent of application of ethylene slows the ripening process. The application of 1-MCP after ethylene treatment is more efficient in delay the progress of variables related to the epidermis such as: color, firmness and peel extensibility, while the effect on related pulp variables was not as significant, which confirms that ripening in bananito as in banana, starts at pulp, where the first application of exogenous ethylene induces the development of the variables related to the pulp. However, generally 1-MCP was effective in delaying the effects induced by ethylene during ripening of bananito fruits.

Keywords. Bananito, ethylene, 1-MCP, interaction, ripening, epidermis, pulp.

6.1. Introducción

El etileno (C_2H_4) es una hormona vegetal gaseosa que regula diversos procesos durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la maduración de frutos climatéricos (Fluhr, 1998; Yoo *et al.*, 2009). Los frutos climatéricos son aquellos que aumentan la tasa de producción de etileno y la respiración después de la cosecha (Barry y Giovannoni, 2007). La biosíntesis de etileno se inicia a partir del aminoácido metionina en tres pasos: (1) la conversión de metionina a S-adenosil-L-metionina (SAM) catalizada por la enzima SAM sintetasa, (2) la formación de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) a partir de SAM mediante la enzima ACC sintasa (ACS) y (3) la conversión de ACC a etileno, catalizado por la ACC oxidasa (ACO) (Yang y Hoffman, 1984; Barry y Giovannoni, 2007). En las plantas angiospermas se han descrito dos sistemas de biosíntesis de etileno, uno autocatalítico (sistema 2), en el cual la aplicación exógena de etileno estimula su propia biosíntesis y otro autoinhibitorio (sistema 1), en el cual la aplicación de etileno inhibe su propia biosíntesis (McMurchie *et al.*, 1972; Barry y Giovannoni, 2007; Bouzayen *et al.*, 2010; Bapat *et al.*, 2010). El etileno regula la maduración de frutos climatéricos mediante la activación de una vía de señalización que lleva a la expresión de genes relacionados con enzimas que actúan durante la maduración (Bapat *et al.*, 2010). La señalización inicia con la unión del etileno a un grupo de receptores en el retículo endoplasmático (Hall *et al.*, 2007; Binder, 2008; Lacey y Binder, 2014) y termina con la activación de factores de transcripción (TFs) (Yoo *et al.*, 2009) que interactúan con promotores de genes relacionados con la maduración (Barry y Giovannoni, 2007).

Desde un punto de vista agrícola, el etileno juega un papel doble, debido a que presenta efectos benéficos, como el estímulo de la maduración y desarrollo de las características sensoriales en frutos climatéricos requeridas por los consumidores, sin embargo, también acelera la velocidad de maduración, haciendo difícil el almacenamiento y aumentando la susceptibilidad de los frutos al ataque de patógenos (Martínez-Romero *et al.*, 2007). Algunos cambios inducidos por el etileno en la maduración de banano incluyen alteraciones

en la composición de carbohidratos, degradación de pectinas en la pared celular, síntesis de compuestos volátiles, degradación de clorofila en la epidermis, entre otros (Medina-Suárez *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 2014). A nivel comercial, los frutos de banano son madurados con aplicaciones de etileno gaseoso exógeno a una dosis de $100 \mu\text{L L}^{-1}$ por 18 a 24 h y 20 a 25 °C (Medina-Suárez *et al.*, 1997; Golding *et al.*, 1998; Pathak *et al.*, 2003; Choudhury *et al.*, 2009). Aunque también se ha reportado la inmersión de frutos de banano diploide “Khai” en una solución de Etephon[®] entre 200 y $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ por 5 a 10 min (Saengpook *et al.*, 2007; Sangudom *et al.*, 2014). Una vez que la maduración de banano es inducida por el etileno, su vida comercial es de sólo alrededor de 3 a 5 días dependiendo de las condiciones de almacenamiento (Pelayo *et al.*, 2003).

La principal estrategia en la poscosecha de productos agrícolas para aumentar su vida útil, es el manejo del etileno, lo cual puede ser logrado en diferentes niveles, incluyendo la biosíntesis, la acción a nivel de receptor y la remoción de etileno de la atmósfera (Martínez-Romero *et al.*, 2007). En éste sentido, el 1-meticiclopropeno (1-MCP) (C_4H_6) es una olefina cíclica que bloquea la acción del etileno, debido a que ocupa los receptores y afecta la señalización durante la maduración de frutos y la senescencia de flores (Serek *et al.*, 1995). El 1-MCP presenta 10 veces mayor afinidad por los receptores comparado con el etileno (Blankenship y Dole, 2003), además, su unión es irreversible (Sisler *et al.*, 1996), por lo cual se considera una estrategia eficiente para prolongar la vida en poscosecha de frutas, hortalizas y flores de corte (Sisler *et al.*, 2003; Reid y Staby, 2008). A pesar de que la unión del 1-MCP es irreversible, los frutos tratados con 1-MCP pueden recuperar la sensibilidad al etileno y madurar normalmente debido a la síntesis de nuevos receptores (Cameron y Reid, 2001; In *et al.*, 2013). No obstante, la recuperación de la sensibilidad al etileno puede ser bloqueada por múltiples aplicaciones de 1-MCP (In *et al.*, 2013). El 1-MCP no sólo ha sido de gran importancia para retrasar la vida poscosecha, sino que también ha permitido el estudio del papel del etileno endógeno y exógeno en el metabolismo de los frutos durante la maduración. (Huber *et al.*, 2010).

Diversos estudios han mostrado que la aplicación exógena de etileno en estado preclimático de banano (Liu *et al.*, 1999; Pathak *et al.*, 2003; Inaba *et al.*, 2007) y en flores de clavel (In *et al.*, 2013), estimula la síntesis autocatalítica de etileno (sistema 2). No obstante, Moradinezhad *et al.* (2008) demostraron que la aplicación en frutos verdes inmaduros lleva a la regulación negativa de la producción de etileno (sistema I). En general, el 1-MCP disminuye o retrasa los cambios en variables poscosecha de banano inducidos por el etileno (Jiang *et al.*, 1999b) (Jiang *et al.*, 1999a) Jiang y Fu, 2000; Pathak *et al.*, 2003). Sin embargo, el efecto del 1-MCP depende del estado de madurez de los frutos (Harris *et al.*, 2000), de tal forma que la aplicación de 1-MCP después del inicio de la producción climática de etileno (PE), no tiene un efecto significativo en la maduración, incluso se ha encontrado que el 1-MCP puede llevar a una mayor PE por un mecanismo de regulación negativo de la biosíntesis de etileno (sistema I) (Golding *et al.*, 1998; Inaba *et*

al., 2007; De Martino *et al.*, 2007; Pelayo *et al.*, 2003). Con base en lo anterior, se puede deducir que en banano se presentan los dos sistemas de biosíntesis de etileno, en donde el sistema I funciona en estados inmaduros y después del inicio de la PE, mientras que el sistema 2 se presenta en el estado preclimatérico (Inaba *et al.*, 2007).

La mayor parte de los estudios del efecto de la aplicación de 1-MCP y etileno se han llevado a cabo en banano triploide (*Musa* AAA), mientras que pocos estudios se han reportado en bananos diploides (*Musa* AA) (Hubert *et al.*, 2010; Pardo y Rubio, 2004; García *et al.*, 2015). El bananito (*Musa* AA) también conocido como banano Sucrier, banano bocadillo, Pisang Mas, Kluai Khai, Lady finger, etc., es un fruto tropical exótico de comportamiento climatérico en la poscosecha (Castro Benítez *et al.*, 2005). El bananito fue el segundo frutal exótico exportado por Colombia en el 2013, con un volumen de 8.100 t (Asohofrucol, 2014), donde las exportaciones se realizan por vía aérea, debido a que es un fruto altamente perecedero con corta vida en poscosecha (Gutiérrez, 1997). El objetivo de éste estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de etileno y 1-MCP en algunas variables poscosecha de frutos de bananito, además de determinar el efecto del 1-MCP cuando los frutos de bananito fueron previamente ó posteriormente tratados con etileno, para conocer la eficacia del 1-MCP en bloquear el proceso de maduración, una vez ha sido inducido por el etileno.

6.2. Resultados

Producción de etileno (PE).

La PE mostró el pico climatérico entre los 6 y 7 días de almacenamiento (dda) para el tratamiento con etileno (ET) (8,78- 8,87 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente), mientras que para el control se presentaron 2 picos, uno a los 8 dda (9,46 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y otro a los 12 dda (6,79 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). La aplicación de 1-MCP retrasó la PE por 7 días y la máxima PE se alcanzó a los 13 dda (5,30 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Por su parte, la aplicación de 1-MCP posterior a la aplicación de etileno (ET+1-MCP) disminuyó el aumento de la PE, manteniendo valores alrededor de 3 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con un pico a los 13 dda (4,91 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mientras que la aplicación de etileno posterior al 1-MCP (1-MCP+ET) indujo la PE, con un pico a los 14 días (6,53 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), sin embargo, los valores no alcanzaron los logrados con ET o el control (Fig 15).

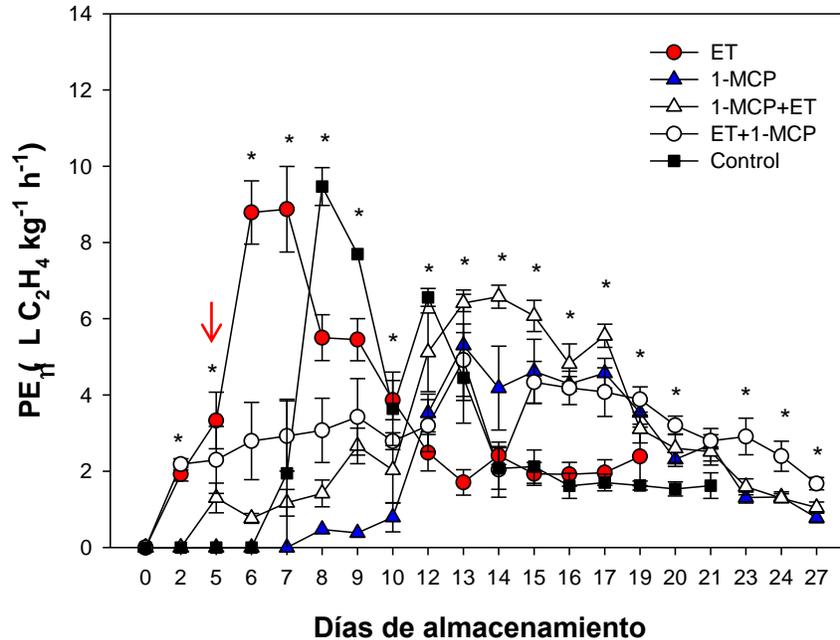


Figura 13. Producción de etileno (PE) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey (P<0.05).

Los frutos de bananito son climatéricos, donde la PE en el control no fue detectable en los primeros 7 dda, lo cual coincide con lo reportado en banano (*Musa* AAA) (López-Gómez *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2009; Choudhury *et al.*, 2008; Pathak *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999; López-Gómez *et al.*, 1997; Hailu *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2009) y banano diploide (Hubert *et al.*, 2010). En el control se presentaron 2 picos de PE, lo cual coincide con lo reportado en banano por Pathak *et al.* (2003), sin embargo, los anteriores autores afirman que la importancia del segundo pico no ha sido determinada. A su vez, la aplicación de etileno exógeno indujo la PE en los primeros 2 dda, alcanzándose el pico climatérico a los 6-7 dda. Resultados similares fueron reportados en banano por Liu *et al.* (2007); Inaba *et al.* (2007), Pathak *et al.* (2003), y Xiao *et al.* (2013), quienes encontraron que la inducción de la PE no ocurre inmediatamente, sino que se presenta entre los 1 a 3 días después de la aplicación de etileno. A su vez, en banano diploide se reportó que la aplicación de etileno induce una máxima PE de 22,6 µL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹, donde los frutos alcanzan el estado de sobremadurez en 10 d (Hubert *et al.*, 2010). La inducción de la PE puede ser debida a que la aplicación de etileno exógeno incrementa la síntesis autocatalítica (Golding *et al.*, 1998; Phebe Ding y Darduri, 2009; Oliveira *et al.*, 2006), lo cual está relacionado con el aumento de los niveles de transcritos de los genes *MA-ACSI* y *MA-ACOI*, en los tejidos de la pulpa y la

epidermis (López-Gómez *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Pathak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2007; Choudhury *et al.*, 2008).

En el presente estudio se encontró que la aplicación de 1-MCP retrasó el aumento de la PE 10 días, resultados similares fueron reportados en banano (Sisler y Serek, 1997; Golding *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2007), banano diploide “Khai” (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006) y bananito (García *et al.*, 2015. No publicado). En algunos estudios se ha encontrado que el 1-MCP inhibe el pico de PE (Jiang *et al.*, 1999a) Zhang *et al.*, (2006), sin embargo, en otros se ha reportado que la PE puede ser mayor con respecto al control, una vez se recupera la sensibilidad a esta hormona, sin mostrar un pico abrupto (Pelayo *et al.*, 2003; J Oliveira *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007), lo cual a su vez, coincide con lo encontrado en éste estudio. El retraso de la PE puede estar relacionado con la inhibición y/o disminución de la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la biosíntesis de etileno, además de la actividad de éstas (Pathak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2007). La recuperación de la capacidad de producir etileno, puede ser debida a la síntesis de nuevos receptores (Blankenship y Dole, 2003), lo cual en banano incrementa con el desarrollo de la maduración (Phebe Ding y Darduri, 2009), con el aumento de la concentración de O₂ (Jiang y Joyce, 2003) y con la temperatura (Jiang *et al.*, 2002; Asif *et al.*, 2009). Es decir que las diferencias en el tiempo de recuperación de la sensibilidad al etileno dependen de las condiciones de almacenamiento, especialmente temperatura. En éste estudio, los frutos tratados con 1-MCP recuperaron la capacidad de PE a los 7 d.

La aplicación de 1-MCP previa o posterior a la aplicación de etileno previno el incremento de la PE (Fig 14). En banano se ha encontrado que la aplicación de 1-MCP una vez inducida la producción autocatalítica de etileno no tiene ningún efecto en la PE, incluso la incrementa con respecto al control (Golding *et al.*, 1998; Pelayo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; De Martino *et al.*, 2007; Phebe Ding y Darduri, 2009), además, Moradinezhad *et al.* (2008a) encontraron que los bananos maduros no responden al 1-MCP. Lo anterior parece ser debido a un proceso de retroalimentación negativa de la biosíntesis de etileno (sistema D), mediante el cual, una vez iniciada la PE, la aplicación de inhibidores de etileno como el 1-MCP inducen la PE (Golding *et al.*, 1998; Pathak *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Inaba *et al.*, 2007). Los resultados encontrados en éste estudio difieren de los reportado previamente, debido a que aun cuando la aplicación de ET induce la PE en los primeros 2 dda, la aplicación de 1-MCP posterior a 5 d (ET+1-MCP) disminuye la PE, además, cuando se aplicó etileno posterior a 1-MCP (1-MCP+ET), no se observó un aumento acelerado de la PE. Es decir, que el 1-MCP fue capaz de disminuir el efecto en la PE inducido por el etileno exógeno.

Por otro lado, también se ha encontrado que las respuestas de los frutos climatéricos a la aplicación de 1-MCP pueden ser muy variables, por ejemplo aplicaciones antes del inicio

de la maduración pueden resultar en una maduración incompleta o no adecuada (Huber *et al.*, 2010). En este sentido, Moradinezhad *et al.* (2008) reportaron que el efecto más favorable de la aplicación de 1-MCP en banano se alcanzaba cuando los frutos habían sido previamente tratados (3 días) con etileno, ó cuando se realizaba la aplicación simultanea de 1-MCP y etileno. Resultados similares fueron reportados por Botondi *et al.* (2014) y encontrados en éste estudio. Lo anterior parece ser debido al número de receptores inducidos con la aplicación de etileno, es decir que una aplicación posterior de 1-MCP tendría más sitios de unión (Feygenberg *et al.*, 2012). En éste sentido, se ha reportado que múltiples aplicaciones de 1-MCP durante el almacenamiento bloquean completamente la percepción del etileno en clavel (In *et al.*, 2013), frutas y hortalizas (Blankenship y Dole, 2003), sin embargo, en banano se ha encontrado un sistema de retroalimentación negativa cuando se ha iniciado la producción autocatalítica de etileno (Golding *et al.*, 1998; Pathak *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Inaba *et al.*, 2007). En el presente estudio se encontró que la aplicación de 1-MCP previa o posterior a la aplicación de etileno (1-MCP+ET y ET+1-MCP respectivamente), inhibe la inducción de la PE, es decir, no se encontró evidencia del bloqueo de la retroalimentación normal de la biosíntesis de etileno, sin embargo esto se debe comprobar en estudios posteriores a nivel de la expresión y actividad de enzimas de la biosíntesis de etileno.

Intensidad respiratoria (IR).

La IR aumentó durante el almacenamiento para todos los tratamientos, presentándose diferencias significativas ($P < 0.001$). La aplicación de etileno (ET) ocasionó un aumento de la IR a partir del 5 dda, alcanzándose un pico a los 17 dda ($110,16 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). El control no presentó un pico de respiración claro, pero la máxima IR se presentó a los 17 dda ($88,83 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). A su vez, los tratamientos con 1-MCP tampoco mostraron un pico de respiración claro, sin embargo, la mayor IR se presentó a los 21 dda para 1-MCP y 1-MCP+ET ($94,85$ y $83,97 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente), mientras que en ET+1-MCP, el pico se alcanzó a los 23 dda ($82,110 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Fig 16).

Los frutos de bananito son climatéricos (Castro Benítez *et al.*, 2005). En los primeros 5 dda, no se presentaron cambios significativos de la IR y el pico de respiración se presentó a los 17 dda en el control, lo cual coincide con lo reportado por Castro Benítez *et al.* (2005) y Pardo y Rubio (2004). La aplicación de etileno aceleró el aumento de la respiración, sin embargo, no se observó un pico abrupto de la IR, sino que se mantuvo alta desde los 9 dda ($> 95 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Resultados similares fueron reportados en banano (Domínguez y Vendrell, 1994). En la mayoría de los frutos climatéricos existe una relación paralela entre la respiración y la producción de etileno pero en banano y aguacate éste comportamiento no ocurre, debido a que el pico de etileno es previo al de respiración (Liu *et al.*, 1999), lo cual corresponde a lo encontrado en éste estudio.

El efecto de la aplicación de 1-MCP en la respiración de los frutos es variable entre especies y dentro de los estados de maduración de una misma especie, encontrándose que el 1-MCP puede reducir la respiración, no afectarla, o incluso incrementarla (Watkins, 2006; Blankenship y Dole, 2003). En banano (*Musa* AAA) se ha reportado que la aplicación de 1-MCP en estado preclimático disminuye la IR y retrasa o inhibe el pico climaterico (Golding *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 2006; Botondi *et al.*, 2014), sin embargo, cuando la producción autocatalítica de etileno inicia, la aplicación de 1-MCP no tiene un efecto significativo en la IR (Golding *et al.*, 1998; Pelayo *et al.*, 2003). En este estudio se encontró que el 1-MCP disminuye levemente la IR con respecto al control. El mecanismo por el cual el 1-MCP disminuye la TR no es claro, pero puede estar relacionado con el retraso del aumento de los compuestos que son sustrato respiratorio, como, carbohidratos, ácidos orgánicos y otras reservas (Bhande *et al.*, 2008; Hailu, 2013).

La aplicación de 1-MCP previa al tratamiento con etileno (1-MCP+ET) no mostró diferencias con la aplicación de 1-MCP, sin embargo, la aplicación posterior (ET+1-MCP) presentó los menores valores, lo cual puede ser debido a que el etileno exógeno induce la producción de nuevos receptores, es decir que una aplicación posterior de 1-MCP tendría más sitios de unión (Feygenberg *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2004), con lo cual se alcanza un mayor retraso de la maduración (Botondi *et al.*, 2014). No obstante, de manera general, la aplicación de 1-MCP presentó un efecto menos significativo en la IR comparado con la PE, lo cual coincide con lo reportado por Pelayo *et al.* (2003), quienes afirman que no todos los parámetros de la maduración son afectados en la misma magnitud por el 1-MCP, donde el efecto más fuerte del 1-MCP se presenta en la producción de etileno y el efecto más débil en la respiración.

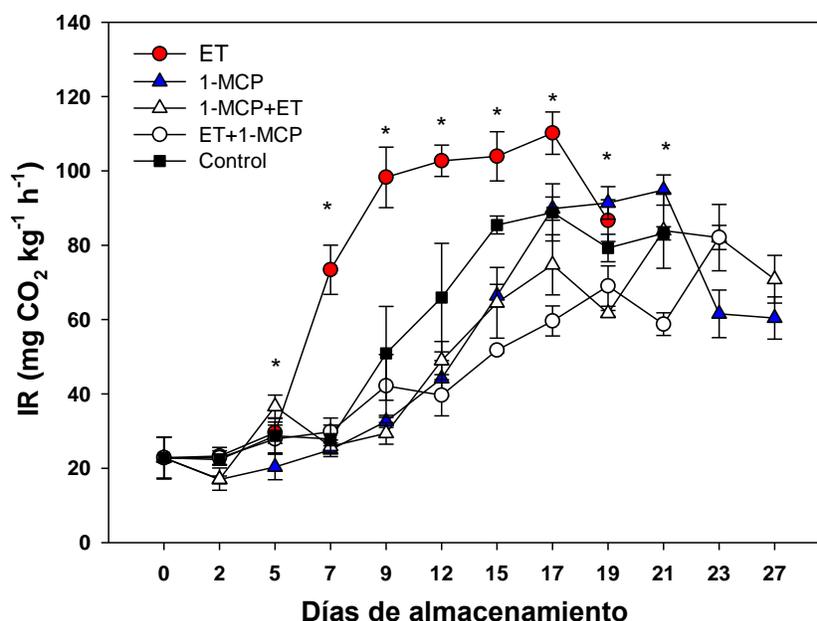


Figura 14. Intensidad respiratoria (IR) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey (P<0.05).

Pérdida de peso (PP).

La PP incrementó con el almacenamiento sin diferencias significativas entre tratamientos (P>0.05), sin embargo, los tratamientos con 1-MCP presentaron valores ligeramente inferiores a partir del 7 dda. La máxima PP cuando los frutos alcanzaron el estado de maduración C7 varió entre tratamientos, con valores de 24,38 % en ET a los 19 dda; 25,59 % en el control a los 21 dda y alrededor de 28 % en los tratamientos con aplicación de 1-MCP (Fig 17). La pérdida de peso diaria estuvo entre 1,11 y 1,30 % día⁻¹ en los tratamientos ET y 1-MCP respectivamente, bajo las condiciones de almacenamiento de este estudio.

La PP en bananito, no fue afectada por ninguno de los tratamientos aplicados, lo cual puede ser debido a que la principal causa de PP en la poscosecha de frutas y hortalizas es la transpiración (Ferris *et al.*, 1999) y éste proceso es regulado por diferentes factores ambientales (temperatura, relativa humedad, movimiento de aire y la presión atmosférica) y del fruto (características morfológicas y anatómicas, relación superficie/volumen) (Kader y Yahia, 2011), es decir, que son más importantes las condiciones de almacenamiento que la aplicación de etileno o 1-MCP en la pérdida de peso. Lo cual, a su vez, coincide con lo reportado por Blankenship y Dole (2003), Moradinezhad *et al.* (2008a) y Thumdee *et al.* (2010), quienes afirman que el 1-MCP no afecta significativamente la PP en diferentes frutos.

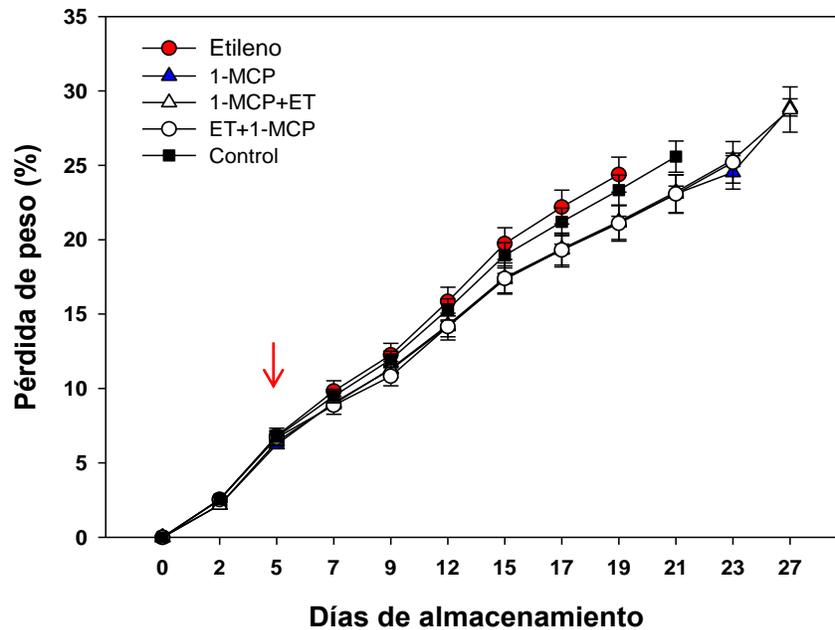


Figura 15. Pérdida de peso en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P<0.05$).

Color

El color expresado como el valor del ángulo $^{\circ}h$ (ángulo hue) disminuyó durante el almacenamiento para todos los tratamientos, con diferencias significativas ($P<0.01$) a partir del 5 dda. En los primeros 5 dda no hubo cambios significativos en el color, sin embargo, a partir de ese momento los frutos tratados con etileno (ET) empezaron a cambiar de color, mientras que en el control, los cambios se presentaron desde el 9 dda (Fig 17 y 18). Los frutos en el tratamiento ET alcanzaron el estado de madurez C7 a los 19 dda con un valor de h de $85,06^{\circ}$, mientras que en el control, el estado C7 se alcanzó a los 21 dda ($h= 85,23^{\circ}$). El desarrollo de color amarillo (disminución del valor de h) fue retrasado por la aplicación de 1-MCP, independientemente de la aplicación previa (ET+1-MCP) o posterior (1-MCP+ET) de etileno. El estado de madurez C7 se alcanzó a los 27 días en frutos tratados con 1-MCP, con valores de h entre $82,7^{\circ}$ y $85,18^{\circ}$ (Fig 18).

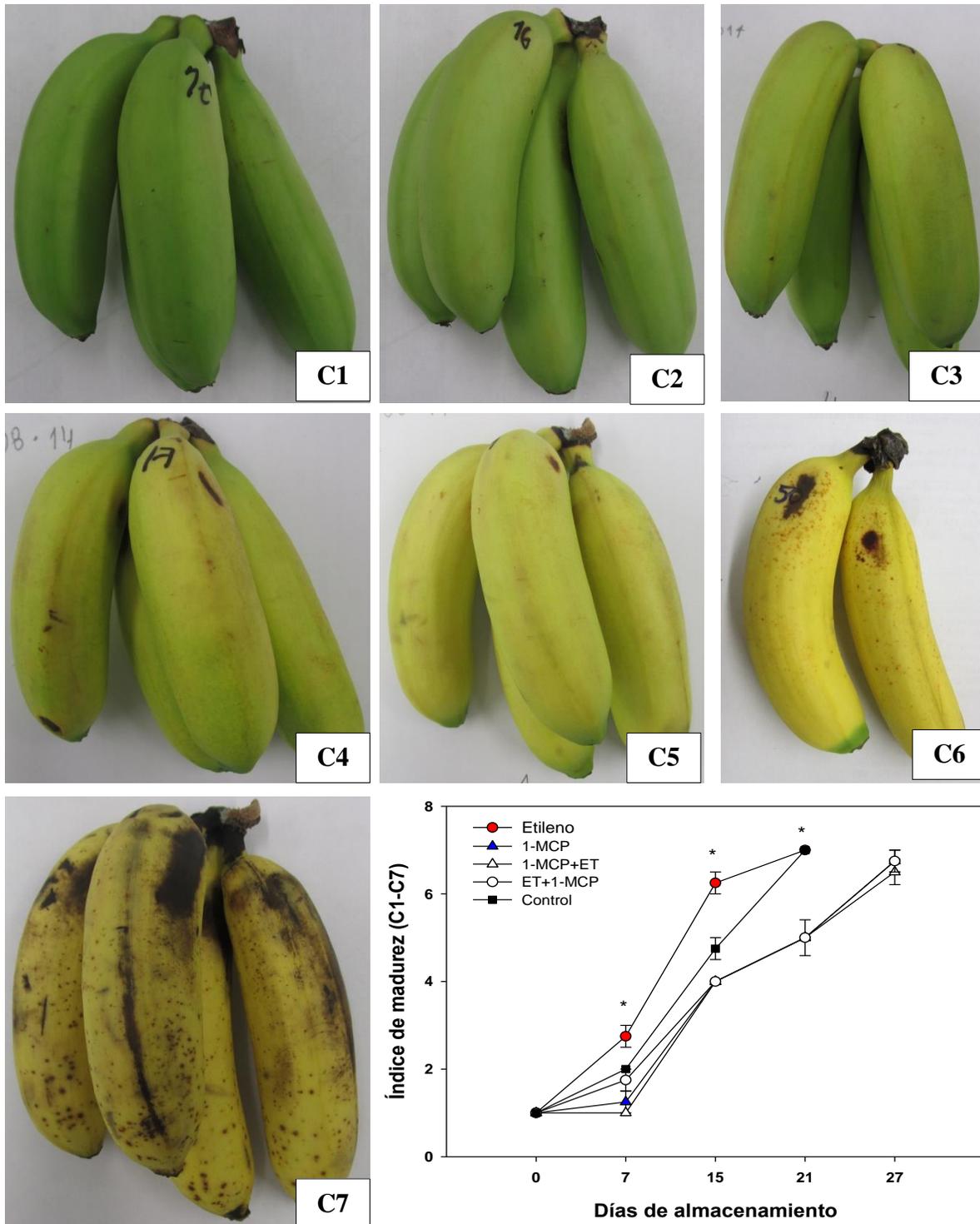


Figura 16. Estados de madurez de bananito según el índice de maduración propuesto por el Departamento de Servicios al Cliente de Chiquita Brands, Inc., y (Paull, 1996).

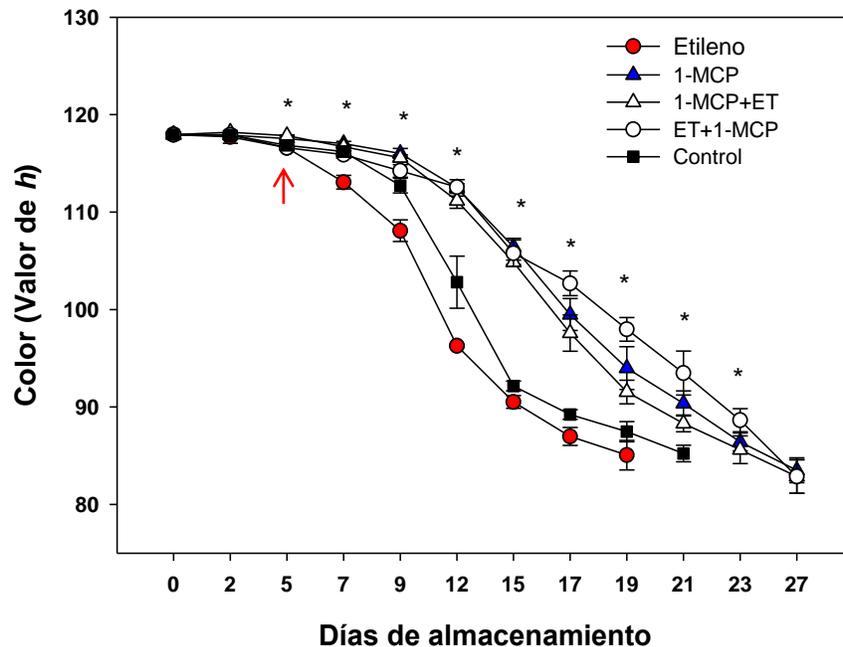


Figura 17. Color en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P<0.05$).

El color determinado por medio del valor de $^{\circ}h$ (ángulo hue) disminuye durante la maduración de banano, lo cual indica cambio de color de verde a amarillo (Pelayo *et al.*, 2003). La aplicación de etileno acelero el cambio de color, lo cual corresponde a lo encontrado en banano (De Martino *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011), en donde la aplicación exógena de etileno se utiliza a nivel comercial para inducir el cambio de color y la maduración de éste fruto (Golding *et al.*, 1998). El cambio de color en la epidermis de banano se debe a la degradación de clorofilas por actividad enzimática y al desenmascaramiento de carotenoides (Hailu, 2013; Thompson, 2011). La aplicación de etileno no sólo induce la degradación de clorofilas, sino que también afecta la funcionalidad de los cloroplastos, debido a la disminución de la fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) (De Martino *et al.*, 2007).

La aplicación de etileno induce el cambio de color en la epidermis de banano, pero esto no ocurre inmediatamente, sino 5 días después de la aplicación. A su vez, el 1-MCP lo retrasa (Golding *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999a; Pelayo *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2010; Inaba *et al.*, 2007; De Martino *et al.*, 2007; Feygenberg *et al.*, 2012, Botondi *et al.*, 2014), lo cual coincide con lo encontrado en éste estudio. No obstante, concentraciones muy altas (>30

$\mu\text{L L}^{-1}$) pueden inhibir completamente el desarrollo de color, llevado a una coloración no homogénea de la epidermis (Moradinezhad *et al.*, 2008a; Feygenberg *et al.*, 2012). Además, se ha reportado que el 1-MCP también mantiene la funcionalidad de los cloroplastos, al prevenir la reducción de la relación Fv/Fm (fluorescencia) (De Martino *et al.*, 2007). El mecanismo por el cual el 1-MCP retrasa la pérdida de clorofilas y desarrollo de color amarillo en los frutos de banano, no es claro, pero puede estar correlacionado con la disminución de la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en la ruta de degradación de clorofilas y desenmascaramiento de carotenoides. Lo anterior se ha comprobado experimentalmente en pera china (Cheng *et al.*, 2012) y tomate (Hoeberichts *et al.*, 2002), pero en banano o bananito hasta la fecha no hay reportes.

La aplicación de 1-MCP antes o después de la aplicación de etileno (1-MCP+ET y ET-1+MCP) previno el desarrollo del color amarillo en los frutos de bananito, lo cual puede ser debido a que cuando los frutos son previamente tratados con 1-MCP, la inducción de nuevos receptores es disminuida por el tratamiento con 1-MCP (Feygenberg *et al.*, 2012), mientras que cuando el 1-MCP se aplica posterior al etileno, puede unirse a un mayor número de receptores (inducción por el etileno), bloqueando la señalización y cambios de color inducidos por el etileno. En éste sentido, Bagnato *et al.* (2003), Moradinezhad *et al.* (2008a) y Botondi *et al.* (2014) encontraron que el efecto más significativo en la disminución del desarrollo de color se lograba cuando se aplicaba el 1-MCP posterior a 3-4 días después de aplicado el etileno.

Firmeza y extensibilidad.

La firmeza y la extensibilidad de la epidermis no cambiaron significativamente en los primeros 7 dda. Se presentaron diferencias significativas a los 13 dda, en donde los valores más altos se alcanzaron en el tratamiento 1-MCP ($6,25 \text{ N mm}^{-2}$) y 1-MCP+ET ($6,20 \text{ N mm}^{-2}$), mientras que los menores valores se obtuvieron en el tratamiento ET ($3,85 \text{ N mm}^{-2}$). En los tratamientos ET, ET+1-MCP y control, la firmeza disminuyó a partir del 7 dda, en donde los frutos control alcanzaron valores similares de firmeza a los 21 dda comparado con ET ($3,22$ y $3,09 \text{ N mm}^{-2}$), mientras que en el tratamiento ET+1-MCP, esto se presentó a los 27 dda ($3,19 \text{ N mm}^{-2}$). Por su parte, los tratamientos 1-MCP y 1-MCP+ET retrasaron la disminución de la firmeza por 7 días, es decir que la firmeza empezó a disminuir desde el día 13, alcanzando valores de $2,38$ y $2,67 \text{ N mm}^{-2}$ a los 27 dda (Fig 19A). La extensibilidad de la epidermis incrementó con el almacenamiento, presentando diferencias significativas ($P < 0.01$) a los 13 dda, momento en el cual, los valores más altos correspondieron a los tratamientos ET (9,88 mm), ET+1-MCP (7,91 mm) y control (8,15 mm) y los menores valores en 1-MCP (6,22 mm) y 1-MCP+ET (5,16 mm) (Fig 20B).

La pérdida de firmeza o ablandamiento en frutos de banano está relacionada al menos con 3 procesos: el primero corresponde a la degradación de almidón para formar azúcares; el segundo, a la degradación de las paredes celulares por actividad enzimática y el tercero, al movimiento del agua de la epidermis a la pulpa (Dadzie y Orchard, 1997; Thompson, 2011; Toledo *et al.*, 2012; Haiulu *et al.*, 2013). La firmeza en los frutos de banano depende de la pulpa y la epidermis (De Martino *et al.*, 2007), en donde, el etileno aumenta el ablandamiento de los frutos de banano, debido a que induce la degradación de almidón en la pulpa (Choudhury *et al.*, 2009), por aumento de la actividad de enzimas etileno-dependientes, como la enzima β -amilasa (Oliveira *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha reportado que el etileno induce la expresión de genes que codifican para enzimas que degradan paredes celulares en la epidermis y en la pulpa de banano, como: la Pectin-metil-esterasa (PME), la poligalacturonasa (PG), la celulasa y la pectato liasa (PL) (Lohani *et al.*, 2004).

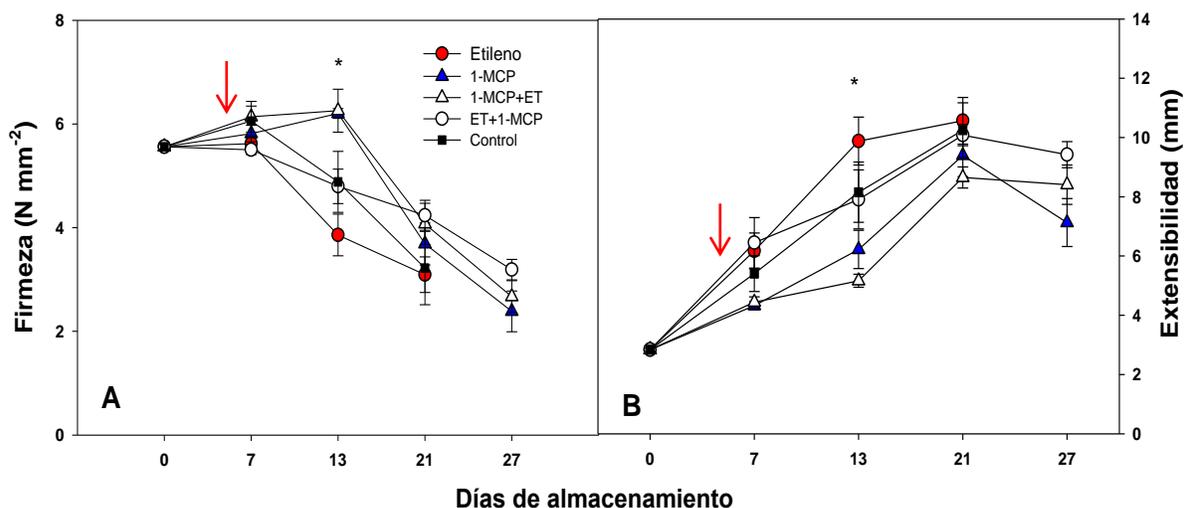


Figura 18. Firmeza (A) y extensibilidad de la epidermis (B) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey (P<0.05).

En general, el 1-MCP disminuye el ablandamiento en muchos frutos (revisado por Blankenship y Dole, 2003), incluyendo banano (*Musa AAA*) (Jiang *et al.*, 1999a; Jiang y Joyce, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Pelayo *et al.*, 2003; Phebe Ding y Darduri, 2009), banano “Khai” (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006), entre otros. En éste estudio se encontró que la aplicación de 1-MCP y 1-MCP+ET retrasó la pérdida de firmeza por 7 días, comparado con

el control o los tratamientos ET y ET+1-MCP. Resultados similares fueron encontrados por Botondi *et al.* (2014) y Bagnato *et al.* (2003) en banano. La aplicación de 1-MCP posterior a ET (ET+1-MCP) disminuyó la velocidad de la pérdida de firmeza comparado con la aplicación de ET. Lo cual soporta la hipótesis de que la inducción de receptores por el etileno, favorece la unión del 1-MCP a más sitios, disminuyendo la velocidad a la cual ocurre el ablandamiento del fruto. Por su parte, en aguacate, se ha demostrado que el 1-MCP retrasa la maduración después de la aplicación de etileno siempre y cuando el ablandamiento no haya iniciado (Jeong y Huber, 2004).

Sólidos solubles totales (SST).

Los SST incrementaron con el almacenamiento en todos los tratamientos con diferencias significativas ($P < 0.01$). El etileno (ET) indujo un rápido aumento de los SST desde el momento de la aplicación, sin embargo, cuando se aplicó 1-MCP a los 5 dda (ET+1-MCP), se retrasó el aumento de los SST hasta los 13 dda. En el control, los SST empezaron a incrementar desde el 7 dda, alcanzando valores similares a los obtenidos con ET a los 21 dda (16,35 y 16,05 °Brix respectivamente). Los tratamientos 1-MCP y 1-MCP+ET retrasaron el aumento de los SST por 7 días comparado con el control, es decir que los SST empezaron a aumentar rápidamente desde el día 13 de almacenamiento, alcanzando valores de 16,28 y 14,8 °Brix a los 27 dda (Fig 21).

Durante la maduración, los SST aumentan debido a la degradación del almidón (J Oliveira *et al.*, 2006; Thompson, 2011; Haiulu *et al.*, 2013), por acción de enzimas α y β -amilasas (J Oliveira *et al.*, 2006) y fosforilasas de almidón, como α -1,4-glucano-fosforilasa (Mainardi *et al.*, 2006; Mota *et al.*, 2002). La aplicación de etileno indujo el incremento de los SST desde el momento de la aplicación, mientras que el color no cambio en los primeros 5 dda, lo cual corrobora lo planteado por Domínguez y Vendrell, (1994) y López-Gómez *et al.*, (1997) quienes aseguran que la maduración en banano inicia en la pulpa. Lo anterior puede ser debido a que el etileno induce la actividad de la enzima β -amilasa en la pulpa de banano (Oliveira *et al.*, 2006).

La aplicación de 1-MCP retrasó el aumento de los SST hasta los 13 dda, lo cual coincide con los reportado para banano (J Oliveira *et al.*, 2006; Moradinezhad *et al.*, 2008b; Phebe Ding y Darduri, 2009; Botondi *et al.*, 2014). Además, la aplicación de 1-MCP previno el aumento de los SST, cuando los frutos fueron tratado con ET a los 5 días (1-MCP+ET) y también cuando los frutos habían sido tratados previamente con ET (ET+1-MCP). Resultados similares fueron reportados por Botondi *et al.* (2014) y Bagnato *et al.* (2003).

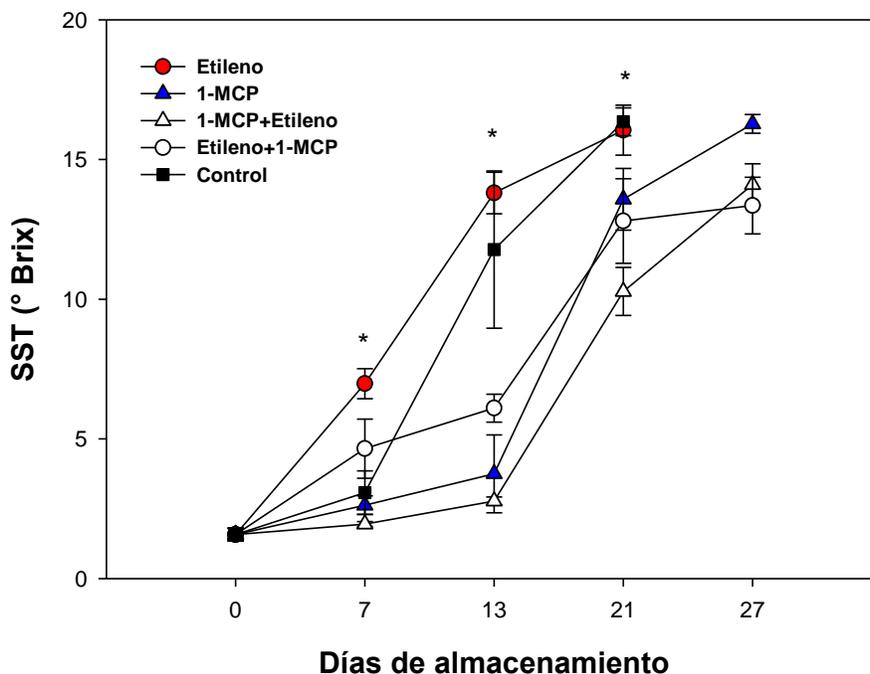


Figura 19. Sólidos solubles totales (SST) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey ($P<0.05$).

Acidez total titulable (ATT) y relación de madurez (RM).

La ATT mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados a partir del 7 dda (Fig 22A). Ésta variable aumenta en los primeros días de almacenamiento y posteriormente disminuye en todos los tratamientos. La aplicación de etileno (ET) aceleró el aumento de la ATT, en donde la máxima ATT se presentó entre los 7 y 13 dda (0,189 %). A su vez, cuando se aplicó 1-MCP a los 5 dda (ET+1-MCP), el pico de ATT se presentó a los 7 dda (0,158 %). Por su parte en el control, la mayor ATT se presentó a los 13 dda (0,183 %), mientras que en los tratamientos 1-MCP y 1-MCP+ET, esto ocurrió a los 21 dda, con valores de 0,141 % y 0,148 % respectivamente.

La RM aumentó durante el almacenamiento con diferencias significativas ($P<0.05$), en donde los tratamientos ET y ET-1MCP mostraron un rápido incremento alcanzando valores de 42,21 en ET a los 21 dda y 40,84 en ET-1-MCP a los 27 dda (Fig 22B). La RM en el control presentó un comportamiento similar al mostrado en ET, pero con valores significativamente menores (32,61) a los alcanzados con ET a los 21 dda. Finalmente, los

tratamientos 1-MCP y 1-MCP+ET retrasaron el aumento de la RM por 13 días, sin embargo, a los 27 dda, presentaron valores similares a los mostrados en el tratamiento con ET (Fig 21B).

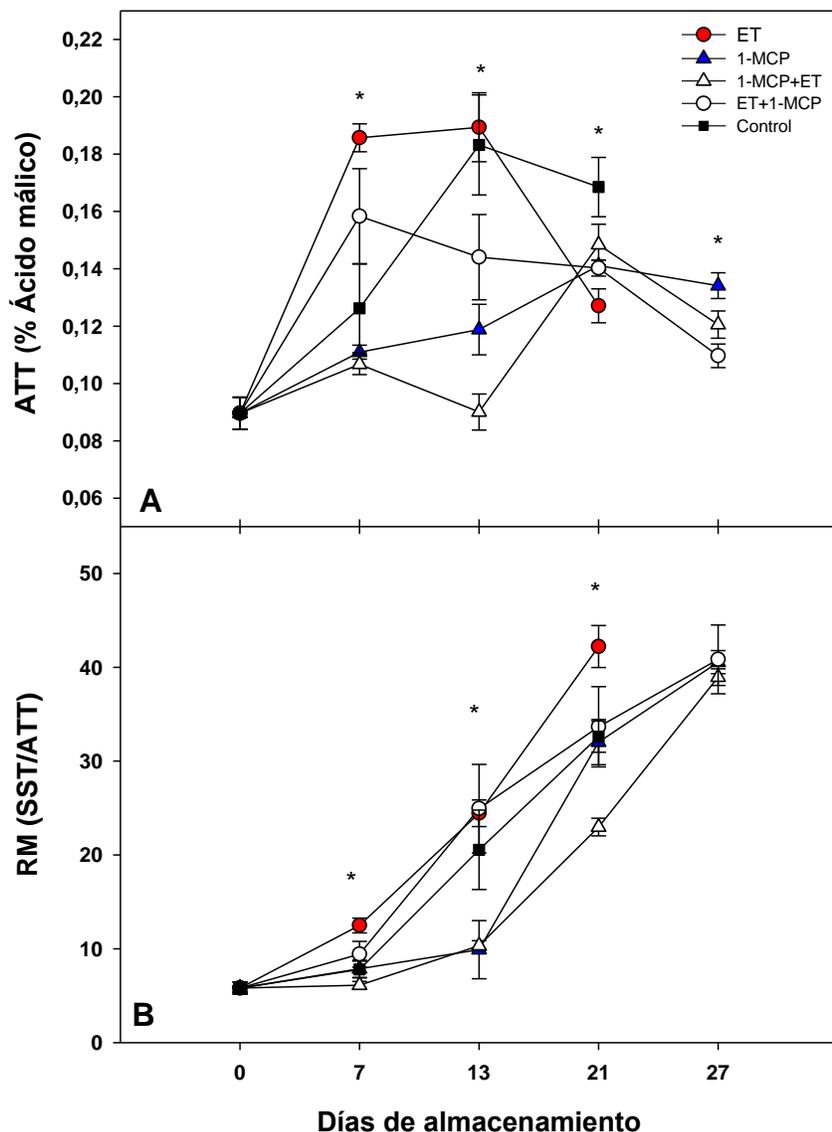


Figura 20. Acidez total titulable (ATT) (A) y relación de madurez (RM) (B) en frutos de bananito sometidos a la aplicación de etileno y 1-MCP. La flecha indica el momento en el cual se realizó la aplicación de etileno o 1-MCP en los tratamientos 1-MCP+ET y ET+1-MCP. Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo y la barra representa el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba Tukey (P<0.05).

La ATT disminuye usualmente durante la maduración, debido a que los ácidos orgánicos son utilizados como sustrato respiratorio, no obstante, en banano, se ha encontrado que la ATT incrementa en los primeros días de almacenamiento y posteriormente disminuye (Thompson, 2011; Dadzie y Orchard, 1997; Chang-Yuen y Sáenz, 2005). Lo anterior coincide con lo reportado en éste estudio. La aplicación de etileno exógeno acelera el incremento de la ATT, mientras que el 1-MCP la retrasa. El papel del 1-MCP sobre los ácidos orgánicos y la ATT es menos comprendido comparado con otras variables y los resultados varían entre especies (Blankenship y Dole, 2003). En general, el 1-MCP disminuye la pérdida de ATT durante la maduración de frutos climatéricos (Watkins, 2006), lo cual coincide con lo encontrado en éste estudio. Sin embargo, la aplicación de 1-MCP no fue eficiente en retrasar el aumento de la ATT cuando los frutos fueron previamente tratados con ET (ET+1-MCP).

La relación de madurez (RM) indica el balance entre azúcares y ácidos y está relacionada con el sabor y la aceptabilidad del producto por los consumidores (Dadzie y Orchard, 1997). Los resultados encontrados aquí, muestran que el 1-MCP retrasó el avance de la RM, incluso después de la aplicación de ET (1-MCP+ET). No obstante, el 1-MCP no fue eficiente en retrasar el aumento de la RM, cuando los frutos fueron tratados previamente con ET. Lo cual puede ser debido a que el 1-MCP se une en mayor proporción en tejidos externos, comparado con tejidos internos (Choi y Huber, 2009), es decir que una vez inducida la maduración con ET, la aplicación de 1-MCP no es tan eficiente para retrasar el desarrollo de las variables relacionadas con la pulpa como la ATT y RM.

6.3. Conclusiones

La aplicación de 1-MCP retrasa el avance de las variables producción de etileno, color, sólidos solubles totales, acidez total titulable y relación de madurez, en comparación con el control, ya sea previa o posterior a la aplicación de etileno, lo que demuestra su eficiencia en disminuir el proceso de maduración. Los mejores resultados se observaron cuando se aplicó el 1-MCP 5 días después del etileno, lo cual puede ser debido a que el etileno induce la síntesis de nuevos receptores que pueden ser posteriormente ocupados por el 1-MCP. Aparentemente, el efecto del 1-MCP fue significativamente mayor en variables relacionadas con la epidermis, como: color, extensibilidad y firmeza, mientras que el efecto en variables relacionadas con la pulpa (SST, ATT y RM) no fue tan significativo, lo cual puede ser debido a que el 1-MCP se une principalmente a los tejidos de la epidermis comparado con la pulpa. Con los resultados obtenidos se puede afirmar que la aplicación 1-MCP es eficaz en disminuir los efectos inducidos por el etileno.

6.4. Literatura citada

- Asif, M.H., Pathak, N., Solomos, T., Trivedi, P.K., 2009. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *South Afr. J. Bot.* 75, 137–144.
- Asohofrucol. 2014. Análisis de las importaciones y exportaciones hortifrutícolas durante el año 2013. *Revista de la Asociación Hortifrutícola de Colombia, ASOHOFrucol.* 22-23p.
- Bagnato, N., Barrett, R., Sedgley, M., Klieber, A., 2003. The effects on the quality of Cavendish bananas, which have been treated with ethylene, of exposure to 1-methylcyclopropene. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38, 745–750.
- Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R., Nath, P., 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol. Adv.* 28, 94–107.
- Barry, C.S., Giovannoni, J.J., 2007. Ethylene and Fruit Ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26, 143–159.
- Blankenship, S.M., Dole, J.M., 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1–25.
- Botondi, R., De Sanctis, F., Bartoloni, S., Mencarelli, F., 2014. Simultaneous application of ethylene and 1-MCP affects banana ripening features during storage. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2170–2178.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., Pech, J.C., 2010. Mechanism of Fruit Ripening, in: Pua, E.C., Davey, M.R. (Eds.), *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 319–339.
- Cameron, A.C., Reid, M.S., 2001. 1-MCP blocks ethylene-induced petal abscission of *Pelargonium peltatum* but the effect is transient. *Postharvest Biol. Technol.* 22, 169–177.
- Castro-Benítez, M., Restrepo Sánchez, L.P., Narváez Cuenca, C.E., 2005. Actividad de clorofilasa durante la maduración del banano bocadillo (*Musa accuminata*) (Simmonds). *Actual. Biológicas* 27, 151–158.
- Chang-Yuen, K., Sáenz, M.V., 2005. Efecto Del 1-Metil-Ciclopropeno (1-Mcp) En La Maduración De Banano. *Agronomía Costarricense.* 29(3), 211-220.
- Cheng, Y., Dong, Y., Yan, H., Ge, W., Shen, C., Guan, J., Liu, L., Zhang, Y., 2012. Effects of 1-MCP on chlorophyll degradation pathway-associated genes expression and chloroplast ultrastructure during the peel yellowing of Chinese pear fruits in storage. *Food Chem.* 135, 415–422.
- Choi, S.T., Huber, D.J., 2009. Differential sorption of 1-methylcyclopropene to fruit and vegetable tissues, storage and cell wall polysaccharides, oils, and lignins. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 62–70.
- Choudhury, S.R., Roy, S., Sengupta, D.N., 2008. Characterization of transcriptional profiles of MA-ACS1 and MA-ACO1 genes in response to ethylene, auxin,

- wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. *J. Plant Physiol.* 165, 1865–1878. d
- Choudhury, S.R., Roy, S., Sengupta, D.N., 2009. A comparative study of cultivar differences in sucrose phosphate synthase gene expression and sucrose formation during banana fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 54, 15–24.
- Dadzie, B.K., Orchard, J.E., 1997. Routine post-harvest screening of banana/plantain hybrids: criteria and methods. 63 pp.
- De Martino, G., Mencarelli, F., Golding, J.B., 2007. Preliminary investigation into the uneven ripening of banana (*Musa* sp.) peel. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 35, 193–199.
- Domínguez, M., Vendrell, M., 1994. Effect of ethylene treatment on ethylene production, EFE activity and ACC levels in peel and pulp of banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 4, 167–177.
- Feygenberg, O., Ben-Arie, R., Pesis, E., 2012. Postharvest application of 1-MCP to green or yellow banana for extending storability and shelf-life, *Acta Hort. (ISHS)* 928, 219–225.
- Fluhr, R., 1998. Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci.* 3, 141–146.
- García, J., A. Herrera y E. Torres. 2015. Efecto del 1-Metilciclopropeno (1-MCP) en el comportamiento poscosecha de banano bocadillo (*Musa acuminata* AA, Simmonds).
- Golding, J.B., Shearer, D., Wyllie, S.G., McGlasson, W.B., 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 87–98.
- Gutiérrez, J. 1997. Efecto del uso del absorbente de etileno en el almacenamiento de banano bocadillo (*Musa acuminata*). Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Agrícola. 110p.
- Hoerberichts, F.A., Van Der Plas, L.H.W., Woltering, E.J., 2002. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 26, 125–133.
- Huber, D.J., 2008. Suppression of Ethylene Responses Through Application of 1-Methylcyclopropene: A Powerful Tool for Elucidating Ripening and Senescence Mechanisms in Climacteric and Nonclimacteric Fruits and Vegetables. *HortScience* 43, 106–111.
- Huber, D.J., Hurr, B.M., Lee, J.S., Lee, J.H., 2010. 1-Methylcyclopropene sorption by tissues and cell-free extracts from fruits and vegetables: Evidence for enzymic 1-MCP metabolism. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 123–130.
- Hubert, O., Chillet, M., Juliannus, P., Fils-Lycaon, B., Mbéguié-A-Mbéguié, D., 2010. Effect of mode of ripening on ethylene biosynthesis during ripening of diploid banana (*Musa* spp.) fruit. *Acta Hort. (ISHS)* 879, 385–392.
- Hubert, O., Mbéguié-A-Mbéguié, D., 2012. Expression patterns of ethylene biosynthesis genes from bananas during fruit ripening and in relationship with finger drop. *AoB Plants* 2012, pls041.

- In, B.C., Strable, J., Binder, B.M., Falbel, T.G., Patterson, S.E., 2013. Morphological and molecular characterization of ethylene binding inhibition in carnations. *Postharvest Biol. Technol.* 86, 272–279.
- Inaba, A., Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W.-J., Nakano, R., Kubo, Y., 2007. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J. Exp. Bot.* 58, 1047–1057.
- Jansasithorn, R., Kanlayanarat, S., 2006. Effect of 1-MCP on physiological changes in banana “Khái,”. *Acta Hort. (ISHS)* 712, 723-728
- Jiang, Y., Fu, J., 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regul.* 30, 193–200.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., 2003. Softening response of 1-methylcyclopropene-treated banana fruit to high oxygen atmospheres. *Plant Growth Regul.* 41, 225–229.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999a. Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regul.* 28, 77–82.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999b. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biol. Technol.* 16, 187–193.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 2002a. Softening response of banana fruit treated with 1-methylcyclopropene to high temperature exposure. *Plant Growth Regul.* 36, 7–11. d
- Jin, Z.-Q., Xu, B.-Y., Liu, J.-H., Su, W., Zhang, J.-B., Yang, X.-L., Jia, C.-H., Li, M.-Y., 2009. Identification of genes differentially expressed at the onset of the ethylene climacteric in banana. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 307–309.
- Ketsa, S., Wongs-aree, C., Klein, J.D., 2000. Storage life and quality of “Kluai Khai” banana fruit affected by modified atmosphere using bulk packaging. *Thai J. Agric. Sci.* 33, 37–44.
- Lacey, R.F., Binder, B.M., 2014. How plants sense ethylene gas — The ethylene receptors. *J. Inorg. Biochem.* 133, 58–62.
- Liu, X., Shiomi, S., Nakatsuka, A., Kubo, Y., Nakamura, R., Inaba, A., 1999. Characterization of Ethylene Biosynthesis Associated with Ripening in Banana Fruit. *Plant Physiol.* 121, 1257–1265.
- Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W.-J., Nakano, R., Kubo, Y., 2007. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J. Exp. Bot.* 58, 1047–1057.
- Lohani, S., Trivedi, P.K., Nath, P., 2004. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 119–126.
- López-Gómez, R., Campbell, A., Dong, J.-G., Yang, S.-F., Angel Gómez-Lim, M., 1997. Ethylene biosynthesis in banana fruit: isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. *Plant Sci.* 123, 123–131.
- Mainardi, J.A., Purgatto, E., Vieira, A., Bastos, W.A., Cordenunsi, B.R., Oliveira do Nascimento, J.R., Lajolo, F.M., 2006. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene

- (1-MCP) on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7294–7299.
- Martínez-Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillén, F., Valverde, J.M., Zapata, P., Castillo, S., Valero, D., 2007. Tools to Maintain Postharvest Fruit and Vegetable Quality through the Inhibition of Ethylene Action: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 543–560.
- Mbéguié-A-Mbégui, D., Hubert, O., Fils-Lycaon, B., Chillet, M., Baurens, F.-C., 2008. EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine). *Physiol. Plant.* 133, 435–448.
- Medina-Suárez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aked, J., Bird, C.R., Seymour, G.B., 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115, 453–461.
- Moradinezhad, F., Sedgley, M., Klieber, A., Able, A. j., 2008a. Variability of responses to 1-methylcyclopropene by banana: influence of time of year at harvest and fruit position in the bunch. *Ann. Appl. Biol.* 152, 223–234.
- Mota, R.V. da, Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R. do, Purgatto, E., Rosseto, M.R., Lajolo, F.M., 2002. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta* 216, 325–333.
- Nath, P., Bouzayen, M., Pech, J.C., Mattoo, A.K. (Eds.), 2014. *Fruit Ripening: Physiology, Signalling and Genomics*. CABI, Boston, MA.
- Oliveira, Júnior, A.V., Priscila Zaczuk Bassinello, Cordenunsi, B.R., Mainardi, J.A., Purgatto, E., Lajolo, F.M., 2006. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 41–47.
- Pardo, Y y E. Rubio. 2004. Efecto del inhibidor de etileno 1-Metilciclopropeno (1-MCP) en la maduración del banano bocadillo. V seminario nacional e internacional de frutales. 250-260p.
- Park, Y.-M., 2012. 1-MCP application for horticultural commodities in Korea: Practical potential and future task. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53, 441–446.
- Pathak, N., Asif, M.H., Dhawan, P., Srivastava, M.K., Nath, P., 2003. Expression and activities of ethylene biosynthesis enzymes during ripening of banana fruits and effect of 1-MCP treatment. *Plant Growth Regul.* 40, 11–19.
- Paull, R.E., 1996. Ethylene, storage and ripening temperatures affect Dwarf Brazilian banana finger drop. *Postharvest Biol. Technol.* 8, 65–74.
- Pelayo, C., Vilas-Boas, E.V. de B., Benichou, M., Kader, A.A., 2003. Variability in responses of partially ripe bananas to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 75–85.
- Phebe Ding, Darduri, K.B., 2009. Responses of *Musa* AAA Berangan to 1-methylcyclopropene. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 32, 125–132.
- Pinheiro, A.C.M., Boas, V., Barros, E.V. de, Bolini, H.M.A., 2010. Prolongamento da vida pós-colheita de bananas-maçã submetidas ao 1-metilciclopropeno (1-MCP) - qualidade sensorial e física. *Food Sci. Technol. Camp.* 30, 132–137.

- Reid, M.S., Staby, G.L., 2008. A Brief History of 1-Methylcyclopropene. *HortScience* 43, 83–85.
- Robinson, C y V. Galán Saúco, 2012. *Plátanos y bananas*. Editorial Paraninfo.
- Saengpook, C., Ketsa, S., van Doorn, W.G., 2007. Effects of relative humidity on banana fruit drop. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 151–154.
- Sangudom, T., C. Wongs-Aree, V. Srilaong, S. Kanlayanarat, T. Wasusri, S. Noichinda y W. Markumlai. 2014. Fruit quality and antioxidant properties of ‘KluaiKhai’ banana (*Musa* AA group) at different stages of harvest maturity. *International Food Research Journal* 21(2), 583-588.
- Serek, M., Sisler, E.C., Reid, M.S., 1995. Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers. *Plant Growth Regul.* 16, 93–97.
- Sisler, E.C., Alwan, T., Goren, R., Serek, M., Apelbaum, A., 2003. 1-substituted cyclopropenes: Effective Blocking Agents for Ethylene Action in Plants. *Plant Growth Regul.* 40, 223–228.
- Sisler, E.C., Dupille, E., Serek, M., 1996. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Regul.* 18, 79–86.
- Sisler, E.C., Serek, M., 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.* 100, 577–582.
- Thompson, A.K., 2011. 10 - Banana (*Musa* spp.), in: Yahia, E.M. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 216–244e.
- Vargas-Calvo, A., Sandoval-Fernández, J.A., 2005. Agronomic evaluation of production and quality of Yangambi km 5 AAA and Dátil AA. *Infomusa* v. 14, no. 1, p. 6-10.
- Watkins, C.B., 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.*, Ethylene biology: A tribute to Edward C. Sisler 24, 389–409.
- Yang, X., Song, J., Fillmore, S., Pang, X., Zhang, Z., 2011. Effect of high temperature on color, chlorophyll fluorescence and volatile biosynthesis in green-ripe banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 62, 246–257.
- Yoo, S.-D., Cho, Y., Sheen, J., 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci.* 14, 270–279.
- Zhang, M.-J., Jiang, Y.-M., Jiang, W.-B., Liu, X.-J., 2006. Regulation of Ethylene Synthesis of Harvested Banana Fruit by 1 -Methylcyclopropene. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 111–115.

7. Resultados Objetivo específico 3. Caracterización de la expresión de genes *MA-ACSI*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2* como respuesta a la aplicación de etileno y 1-MCP (*Musa AA*, Simmonds).

Resumen

El etileno regula la maduración de frutos climatéricos debido a la inducción de la expresión de genes que codifican para enzimas que actúan durante la maduración. Dentro de estos genes se encuentran aquellos relacionados con su propia biosíntesis, como: *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI*. Los frutos de bananito son climatéricos, pero hasta el momento se desconocen los niveles de expresión de dichos genes bajo condiciones naturales y en respuesta a la aplicación de etileno exógeno y 1-Metilciclopropeno (1-MCP). El presente trabajo evaluó la aplicación de 1-MCP y etileno exógeno sobre la producción de etileno (PE), la intensidad respiratoria (TR), expresión de los genes *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* y algunos cambios fisicoquímicos asociados a la maduración (sólidos solubles totales, firmeza, acidez total titulable) en la pulpa de bananito para tres estados de madurez a los 0, 9 y 16 días de almacenamiento. Los resultados muestran que el etileno induce la PE ($7,74 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) al segundo día de almacenamiento, mientras que el 1-MCP la retrasa por 9 días ($0,785$ a $2,47 \mu\text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), lo cual a su vez, estuvo relacionado con una disminución en los cambios fisicoquímicos en la primera semana de almacenamiento. Todos los genes presentaron algún nivel de expresión durante la poscosecha, en donde, la expresión del gen *MA-ACSI* aumento con el almacenamiento, siendo mayor en el tratamiento con etileno y menor en el control, mientras que los genes *MA-ACO1* y *MA-ACO2* presentaron un pico de expresión a los 9 días en el tratamiento con 1-MCP y control respectivamente. No fue posible realizar una correlación de la expresión génica con las variables fisicoquímicas y la PE, por lo cual, para tener mayor claridad sobre los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de etileno en frutos de bananito se recomienda realizar determinaciones de la expresión de los genes *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* en los tejidos de la pulpa y epidermis por separado y a intervalos de tiempo más cortos. Lo anterior debido a que la regulación de la biosíntesis de etileno en bananito es un fenómeno complejo que varía entre la epidermis y la pulpa y con el estado de desarrollo de los frutos.

Palabras clave: biosíntesis, etileno, expresión génica, maduración, pulpa, 1-MCP.

Abstract

Ethylene is a plant hormone that regulates fruit ripening of climacteric fruits due to induction gene expression encoding enzymes that act during ripening. Within these genes are those related to their own biosynthesis, such as *MA-ACO1*, *MA-ACO2* and *MA-ACS1*. Bananito is a climacteric fruit, but so far the expression levels of these genes are unknown under natural conditions and in response to exogenous application of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). This study evaluated the application of 1-MCP and ethylene on ethylene production (EP), respiratory rate (RR), expression of the *MA-ACO1*, *MA-ACO2* and *MA-ACS1* genes and some physicochemical changes associate with ripening (total soluble solids, firmness, titratable acidity) in the pulp of bananito at three ripening stages at 0, 9 and 16 days of storage. The results show that ethylene induces EP ($7.74 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) at second day of storage, while the 1-MCP delayed it for nine days (from 0.785 to $2.47 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), which in turn, was associated with a decrease in physicochemical changes in the first week of storage. All genes showed some level of expression during postharvest, wherein the expression of the gene *MA-ACS1* increased during storage, being higher in the treatment with ethylene and less in control, while *MA-ACO21* and *MA-ACO2* genes presented a peak of expression at 9 days in 1-MCP and control respectively. It was not possible to make a correlation of gene expression with the physicochemical variables and PE, therefore, for greater clarity about the molecular mechanisms that regulate the synthesis of ethylene Bananito fruit, is recommended making determinations of gene expression in peel and pulp tissues separately and shorter time intervals. The above because the regulation of ethylene biosynthesis in bananito is a complex phenomenon which varies between peel and the pulp and with the development stage of the fruit.

Keywords: biosynthesis, ethylene, gene expression, maturation, pulp, 1-MCP.

7.1. Introducción

Los frutos pueden ser clasificados en dos grupos, climatéricos o no climatéricos teniendo en cuenta el incremento de la tasa de producción de etileno y respiración después de la madurez fisiológica. Los frutos climatéricos se diferencian de los no climatéricos debido a que aumentan la intensidad respiratoria y la producción de etileno después de la madurez fisiológica (Barry y Giovannoni, 2007). El etileno (C_2H_4) es una hormona gaseosa que afecta diversos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo: germinación de semillas, crecimiento, formación de meristemos apicales, senescencia, desarrollo floral, maduración de frutos, abscisión de órganos, gravitropismo y diferentes respuestas al estrés biótico y abiótico (Fluhr, 1998; Yoo *et al.*, 2009). El etileno regula la maduración de frutos

climatéricos a nivel molecular, bioquímico y fisiológico, debido a que induce la expresión de genes relacionados con enzimas que actúan durante la maduración (Bapat *et al.*, 2010).

La maduración en banano puede ser dividida en los cambios que ocurren en la pulpa y en la epidermis. Bajo condiciones normales empieza en la pulpa, debido a que la mayoría de procesos relacionados con la maduración como: aumento de la respiración, producción de etileno, ablandamiento y expresión de genes, entre otros, empieza en dicho tejido (López-Gómez *et al.*, 1997; Inaba *et al.*, 2007). A nivel molecular, se ha reportado que cerca de 250 genes son regulados durante la maduración de banano, los cuales a su vez, están relacionados con procesos fisiológicos como: biosíntesis de etileno, respiración, metabolismo de azúcares, degradación de la pared celular, entre otros (Medina-Suárez *et al.*, 1997). Dentro de dichos genes, Gupta *et al.* (2006) y Jin *et al.* (2009) identificaron en banano, 22 genes específicos de la maduración, es decir, que sólo se expresan en esta etapa fenológica, de los cuales 6 genes son regulados negativamente (*down-regulated*) y 16 positivamente (*up-regulated*) por el etileno. Lo cual implica que el etileno no sólo induce la expresión de genes durante la maduración, sino que también la puede inhibir.

La biosíntesis del etileno se inicia a partir del aminoácido metionina en tres simples pasos: el primero es la conversión de metionina a S-adenosil-L-metionina (SAM) catalizado por la enzima SAM sintetasa; el segundo, la formación de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) a partir de SAM mediante la enzima ACC sintasa (ACS) y el tercero corresponde a la conversión de ACC a etileno, catalizado por la ACC oxidasa (ACO) (Yang y Hoffman, 1984; Barry y Giovannoni, 2007). Las enzimas claves en la biosíntesis de etileno son ACS y ACO, en donde la enzima ACS representa el paso limitante de la velocidad de la producción de etileno, mientras que ACO es conocida como la enzima que forma etileno (EFE: *Ethylene forming enzyme*) (Bleecker y Kende, 2000).

Las enzimas ACS (EC 4.4.1.14) y ACO (EC 1.4.3) son codificadas por una familia multigénica que se expresan a diferentes niveles durante la maduración de los frutos climatéricos (Barry y Giovannoni, 2007; Bouzayen *et al.*, 2010). En banano se han reportado al menos 9 genes que codifican para ACS (*MA-ACSI-9*) y que están ubicados en diferentes regiones del genoma (Huang *et al.*, 2006); además, se han descrito 3 genes *ACO* (*MA-ACO1-3*) (Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, 2012). Por otro lado, en tomate existen al menos 8 genes *Le-ACS* y 6 *Le-ACO* (Klee y Giovannoni, 2011) y en manzana 3 genes *Md-ACO* y *Md-ACS* (Costa *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013). Estudios filogenéticos han permitido afirmar que los miembros de la familia que codifica para ACO son altamente conservados, mientras que la familia multigénica de ACS se estructura en 3 tipos de acuerdo a los motivos (*motifs*) presentes en el dominio C-terminal de la proteína (Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, 2012; Seymour *et al.*, 2013).

Diversos estudios han reportado que los genes *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* son los únicos involucrados en la biosíntesis de etileno en banano (Xiao *et al.*, 2013a), de hecho,

Hubert y Mbéguié-A-Mbéguié, (2012) reportaron para banano (*Musa* AAA) que los únicos genes responsables de la maduración son: *MA-ACSI*, *MA-ACOI* y *MA-ACO2*, mientras que los demás, no juegan un papel importante. Además, Huang *et al.* (2006) encontraron que entre los genes que codifican para ACS, sólo el gen *MA-ACSI* es inducido por el etileno durante la maduración de banano.

La expresión de los genes *ACS* y *ACO* es regulada por diferentes factores bióticos y abióticos, como: estrés, CO₂, etileno, auxinas, fotoperíodo (Choudhury *et al.*, 2008), concentración de O₂ (Asif *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010), tipo de tejido del fruto, estado de maduración (Liu *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2013) y antagonistas del etileno, como 1-Meticiclopropeno (1-MCP). Por ejemplo, en el estado preclimático de banano, el gen *MA-ACSI* no se expresa, mientras que *MA-ACOI* presenta un nivel basal de expresión constitutiva que aumenta con la maduración (Liu *et al.*, 1999; Pathak *et al.*, 2003). En general, la aplicación de etileno exógeno incrementa los niveles de transcritos de mRNA de *ACS* y *ACO* en frutos climatéricos como: tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) (Nakatsuka *et al.*, 1997), manzana (*Malus domestica*) (Yang *et al.*, 2013), durazno (*Prunus persica*) (Mathooko *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012), banano triploide (*Musa* AAA) (López-Gómez *et al.*, 1997; Choudhury *et al.*, 2008; Inaba *et al.*, 2007), banano diploide (*Musa* AA) (Hubert *et al.*, 2010) pera (*Pyrus communis*) (Yamane *et al.*, 2007), gulupa (*Passiflora edulis* Sims) (Mita *et al.*, 1998) y en hortalizas como: brócoli (*Brassica oleraceae*) (Ma *et al.*, 2008).

El análisis de la expresión de genes mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR), se ha convertido en una herramienta importante para la comprensión de las vías de señalización y metabólicas que subyacen los procesos celulares y de desarrollo de las plantas (Chen *et al.*, 2011). La maduración de frutos climatéricos es un proceso complejo regulado por el etileno, en donde la transducción de señales inicia con la unión del etileno al receptor y termina con la activación de factores de transcripción tipo EIN3/EIL (Mbéguié-A-Mbéguié *et al.*, 2008b), los cuales a su vez, interactúan con elementos de respuesta al etileno (ERF) para modular la expresión de genes relacionados con la maduración, entre los cuales se encuentran, aquellos que codifican para las enzimas de la biosíntesis de etileno (Xiao *et al.*, 2013a).

El 1-meticiclopropeno (1-MCP) (C₄H₆) es una olefina cíclica que ocupa los receptores del etileno de manera irreversible (Sisler *et al.*, 1996), bloqueando la cascada de transducción de señales que conllevan a la expresión de genes relacionados con la maduración (Blankenship y Dole, 2003). Se ha propuesto que el 1-MCP presenta 10 veces mayor afinidad por los receptores de etileno comparado con ésta hormona (Sisler y Serek, 1997). La unión del 1-MCP a los receptores es no competitiva, es decir, una vez el 1-MCP se une a los receptores, estos no pueden ser ocupados por el etileno (Jiang *et al.*, 1999a), no obstante, los frutos tratados con 1-MCP pueden madurar normalmente debido a la síntesis

de nuevos receptores (Cameron y Reid, 2001; In *et al.*, 2013), lo cual ocurre más rápido a temperaturas entre 30 y 40 °C (Jiang *et al.*, 2002a). En éste sentido, Sisler *et al.*, (2003) reportan que el tiempo de inactivación de los receptores por el 1-MCP varía entre especies, pero corresponde a 12 días en banano.

El 1-MCP presenta un papel doble en la ciencia y tecnología poscosecha, debido a que es una tecnología eficiente para preservar la calidad de frutas y hortalizas y además, es un compuesto importante para estudiar los mecanismos moleculares involucrados con la respuesta al etileno durante la maduración de frutos climatéricos (Huber, 2008; Lurie y Paliyath, 2008). La concentración de 1-MCP necesaria para bloquear la acción del etileno varía de acuerdo con la especie, cultivar y estado de maduración, entre otros, pero normalmente se encuentra en el rango de 0,01 $\mu\text{L L}^{-1}$ a 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Blankenship y Dole, 2003; Watkins, 2006). Jiang *et al.*, (1999b) reportan que una dosis de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ es efectiva para reducir los efectos negativos del etileno y prolongar la vida en poscosecha de banano, aunque se observa una respuesta favorable a concentraciones inferiores.

El 1-MCP retrasa el proceso de maduración en banano, debido a que inhibe o disminuye la expresión de la mayoría de genes relacionados con la maduración (Gupta *et al.*, 2006). Se ha reportado que el 1-MCP disminuye la producción de etileno en diferentes frutos, lo cual se debe principalmente a la disminución de la expresión de genes *ACS* y *ACO*. Por ejemplo, en estado preclimatérico de banano, el 1-MCP disminuyó la expresión de *MA-ACS1* y *MA-ACO1* (Inaba *et al.*, 2007); en manzana, la expresión de *Md-ACS1*, *Md-ACO1* y *Md-ACO2* (Yang *et al.*, 2013); en tomate, de *Le-ACS2* y *Le-ACS4* (Klee y Giovannoni, 2011); en durazno, de *Pp-ACO* (Zhang *et al.*, 2012); en nectarinas, de *ACS*, *ACO1* y *PaACO2* (Anna Maria Bregoli, 2005), incluso en brócoli, de *Bo-ACS2* (Ma *et al.*, 2008). A pesar que el 1-MCP disminuye la expresión de los anteriores genes, también se ha reportado en banano, que su efecto depende del estado de madurez (Harris *et al.*, 2000), es decir, después de la inducción de la producción autocatalítica de etileno, la aplicación de 1-MCP incrementa la producción de etileno (Golding *et al.*, 1998; Pelayo *et al.*, 2003; De Martino *et al.*, 2007), lo cual está relacionado con la inducción de la expresión de *MA-ACS1*, la actividad *ACS*, la acumulación de *ACC* y la producción de etileno, sugiriendo que la biosíntesis de etileno puede estar regulada negativamente por el etileno en la pulpa a nivel de *MA-ACS1* (Inaba *et al.*, 2007).

El bananito (*Musa AA*) también conocido como banano Sucrier, bocadillo, Pisang Mas, Kluai khai y Lady finger, entre otros, es el único diploide comestible importante dentro del grupo *Acuminata* (genoma A) de la familia *Musaceae* (Robinson y Galán, 2012). Es originario de Malasia y se ha reportado como el cultivar AA más cultivado a nivel mundial (Lim, 2012). El bananito fue el segundo frutal exótico exportado por Colombia en el 2013, con un volumen exportado de 8.100 t (Asohofrucol, 2014). Las exportaciones se realizan por vía aérea, debido a que es un fruto altamente perecedero con corta vida en poscosecha

(Gutiérrez, 1997). El bananito es un fruto climatérico (Castro Benítez *et al.*, 2005), es decir que después de la cosecha aumenta los niveles de respiración y de etileno. En un estudio previo, se determinó el efecto de la aplicación de etileno exógeno y 1-MCP en frutos de bananito (García *et al.*, 2015. No publicado), en donde se encontró que la aplicación de etileno indujo la producción de etileno, mientras que el 1-MCP la retrasó por 7 días. No obstante, se desconoce el comportamiento de la expresión de los genes involucrados con la biosíntesis de etileno (*MA-ACSI*, *MA-ACOI* y *MA-ACO2*) y su relación con los cambios físico-químicos que ocurren durante la maduración de bananito. Por lo cual el propósito de éste estudio fue caracterizar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de etileno en la pulpa de bananito, como respuesta al tratamiento con etileno exógeno y 1-MCP. Lo anterior se plantea como un primer paso en la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la biosíntesis de etileno en bananito y que pueden estar correlacionados con su alta perecibilidad.

7.2. Resultados y discusión

Intensidad respiratoria (IR) y producción de etileno (PE).

La intensidad respiratoria (IR) incrementó durante el almacenamiento para todos los tratamientos, encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$) desde el cuarto día de almacenamiento. El pico climatérico (máxima IR) se presentó a los 6 dda en los frutos tratados ET-E ($150,652 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y a los 8 dda en CON ($135,96 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Por su parte, la IR en frutos tratados con 1-MCP fue menor hasta los 9 dda y aunque no se encontró un pico climatérico claro, la máxima respiración se presentó a los 14 dda ($102,97 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Fig. 25A). La producción de etileno (PE) también presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos evaluados, siendo inducida en 6,67 veces en el tratamiento con ET-E en los 2 primeros días de almacenamiento, con un valor máximo de $7,749 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, por su parte en el CON, el pico de PE se presentó a los 8 dda ($4,026 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mientras que en el tratamiento con 1-MCP, la PE sólo incrementó a partir del día 11, sin observarse un pico climatérico (Fig. 25B).

El climaterio se presentó a los 8 dda en CON ($135,96 \text{ mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), lo cual concuerda con lo reportado por Castro Benítez *et al.* (2005), quienes encontraron el pico climatérico a los 10 dda a 20°C . En este estudio, la aplicación de etileno exógeno adelantó el pico de respiración en 2 días, pero no incrementó de manera significativa la IR comparado con el control. Se ha reportado que el etileno exógeno induce la IR, presentándose 2 picos en banano, el primero a los 2 dda ($1.575 \text{ nmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) y el otro a los 6 dda ($980 \text{ nmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), en donde la importancia del segundo pico no se ha determinado (Pathak *et al.*, 2003). En el presente estudio sólo se encontró un pico en el tratamiento ET-E, el cual no

fue estadísticamente diferente con respecto al CON (Fig 25A). El pico de respiración se presentó después del pico de PE para frutos tratados con ET-E, mientras que en CON, el pico de respiración y etileno ocurren de manera simultánea en el octavo día de almacenamiento. Lo anterior concuerda con lo reportado para bananito por Castro Benítez *et al.* (2005), quienes encontraron que la máxima respiración y PE es simultánea, presentándose a los 10 días de almacenamiento. En la mayoría de los frutos climatéricos existe una relación paralela entre la respiración y PE, pero en banano y aguacate éste comportamiento no ocurre (Liu *et al.*, 1999), debido a que el pico de etileno se presenta antes que el pico de respiración (Pathak *et al.*, 2003). En éste estudio, la aplicación de 1-MCP disminuyó la TR por 9 días. Resultados similares, fueron reportados en banano por Golding *et al.*, (1998), Zhang *et al.*, (2006) y Jansasithorn y Kanlayanarat, (2006). A pesar que el 1-MCP disminuye la TR, también se ha reportado que el efecto más fuerte del 1-MCP se presenta en la PE y el efecto más débil en TR (Pelayo *et al.*, 2003).

La máxima producción de etileno (PE) varió con los tratamientos, siendo mayor en ET-E ($7,74 \mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$), seguido por CON ($4,02 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) y por último 1-MCP ($2,93 \mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) (Fig 25B). En un estudio previo (datos no mostrados), se encontró un pico de PE cercano a $9,96 \mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ (García *et al.*, 2015 No publicado). Por otro lado, el pico de PE (Climaterio) reportado para banano (*Musa* AAA) es de alrededor de $9 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ (López-Gómez *et al.*, 1997), mientras que para banano diploide (*Musa* AA) la máxima PE es aproximadamente $11,5 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Hubert *et al.*, 2010), es decir que los resultados encontrados aquí, muestran menor PE para el fruto de bananito. La aplicación de etileno exógeno indujo la máxima PE en los primeros 2 dda (6,67 veces), mientras que en el control el climaterio se presentó a los 8 dda. Resultados similares fueron reportados en banano por Inaba *et al.*, (2007); Pathak *et al.*, (2003) y Xiao *et al.*, (2013), quienes encontraron que la inducción de la PE ocurre en los primeros 1 a 3 días después de la aplicación de etileno exógeno. A su vez, en banano diploide se reportó que la aplicación de etileno induce una máxima PE de $22,6 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$, en donde los frutos alcanzan el estado de sobremadurez en 10 dda (Hubert *et al.*, 2010).

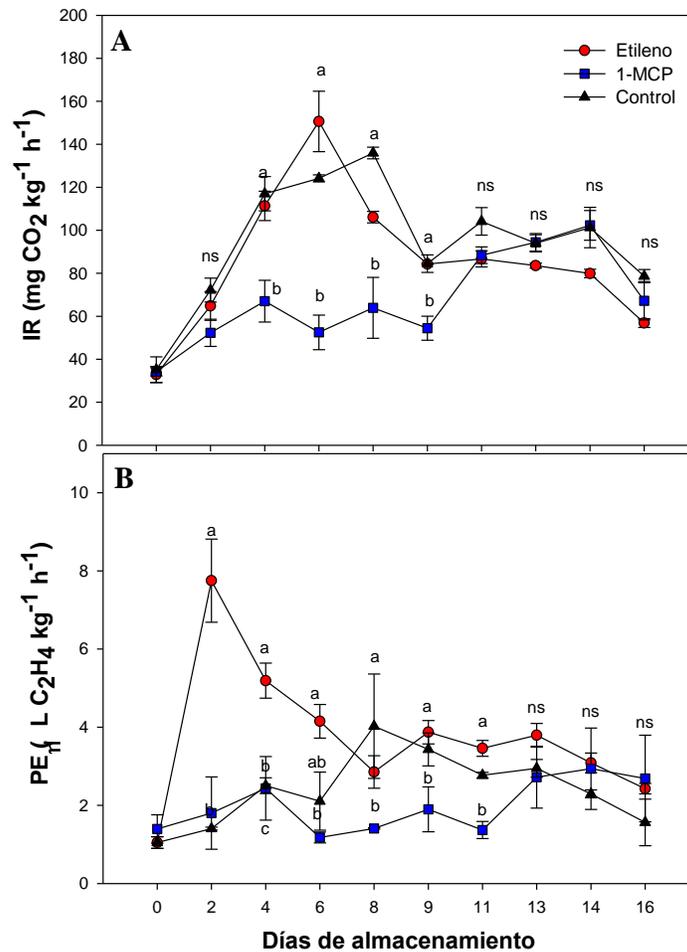


Figura 21. Efecto de la aplicación de Etileno y 1-MCP en (A) la intensidad respiratoria (IR) y (B) producción de etileno (PE) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio ($n=4$) en cada punto de muestreo. La barra corresponde al error estándar. Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba Tukey ($P<0.05$), mientras que ns, indica que no existen diferencias.

La mayoría de los estudios en banano (*Musa AAA*) (Pathak *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999; López-Gómez *et al.*, 1997; Hailu *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2009) y banano diploide (Hubert *et al.*, 2010) reportan que la PE no es detectable, o es insignificante en etapa pre-climatérica. En el presente estudio la PE en etapa pre-climatérica para el CON, se encontraba entre 0,78 y 2,5 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, lo cual coincide con lo reportado por Castro Benítez *et al.*, (2005). Sin embargo, en un estudio previo con frutos de bananito cosechados a las 7 semanas después de la floración, no se presentó PE en los primeros 6 días de almacenamiento a 20 °C (García *et al.*, 2015: No publicado), es decir, que la PE parece empezar después de las 8 semanas después de la floración.

La inducción de la PE por el etileno exógeno es inhibida por el 1-MCP, lo cual puede ser debido a la interferencia de la síntesis autocatalítica de etileno, a través de la inhibición de la expresión de algunos genes que codifican para enzimas de su propia biosíntesis (Khan y Singh, 2007; In *et al.*, 2013). En el presente estudio se encontró que el etileno exógeno induce la PE, mientras que la aplicación de 1-MCP la inhibe en los primeros 9 días de almacenamiento, aunque posteriormente, los frutos recuperan la capacidad de producción de etileno. Resultados similares fueron reportados en banano (*Musa* AAA) (Oliveira *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 1999b; Golding *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2007) y banano “Khai” (*Musa* AA) (Jansasithorn y Kanlayanarat, 2006). La recuperación de la capacidad de producción de etileno puede ser debida a la síntesis de nuevos receptores, a los que puede unirse el etileno y desencadenar la secuencia de señales que llevan a la expresión de genes durante la maduración (Sisler *et al.*, 1996; Cameron y Reid, 2001; Blankenship y Dole, 2003).

La síntesis de nuevos receptores lleva a la recuperación de la sensibilidad de los tejidos al etileno, por lo cual la PE incrementa, incluso con valores superiores al control. Lo anterior se ha reportado en mango (*Mangifera indica* L) (Singh *et al.*, 2007), clavel (*Dianthus caryophyllus*) (Sisler y Serek, 1997) y banano (Pelayo *et al.*, 2003; Inaba *et al.*, 2007). En éste estudio los frutos no alcanzarán el estado C7, por lo cual es posible que la PE alcanzará mayores valores con respecto al CON (Fig 25A). En otros estudios se ha encontrado que el momento en el cual se aplica el 1-MCP puede llevar a una respuesta diferente en la PE, por ejemplo, la aplicación de 1-MCP no afecta, incluso puede aumentar la PE en banano, una vez se ha iniciado la maduración (De Martino *et al.*, 2007; Phebe Ding y Darduri, 2009). Lo cual puede ser debido a un mecanismo de retroalimentación negativo de la biosíntesis de etileno (sistema 1), en donde, una vez se ha iniciado la producción autocatalítica de etileno, el 1-MCP no inhibe la PE, sino que la estimula (Golding *et al.*, 1998; Inaba *et al.*, 2007).

Variables físico-químicas

El color (valor de °h) de la epidermis de bananito disminuyó durante el almacenamiento presentándose diferencias significativas a los 9 d ($P < 0.0001$) entre los tratamientos ET-E y CON con respecto a 1-MCP, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre el CON y ET-E (Fig 26A y 27). A los 16 d, valor de °h fue mayor en 1-MCP (90,672°) y menor en ET-E (81,991°) con diferencias significativas ($P = 0.0128$). Los frutos tratados con 1-MCP no presentaron un cambio significativo en los primeros 9 d, mientras que a los 16 d alcanzaron un estado de maduración C4 con desarrollo de manchas en la epidermis, mientras que en los frutos del control y etileno se alcanzó el estado C7 (Fig. 27). La firmeza disminuyó con el tiempo en los tratamientos ET-E y CON, sin presentar diferencias entre ellos ($P > 0.05$), mientras que en los frutos con 1-MCP, la firmeza no cambió significativamente en los primeros 7 dda, pero posteriormente disminuyó hasta 3,689 N

mm⁻² (Fig. 26B). Los sólidos solubles totales (SST) incrementaron rápidamente en los primeros 9 dda en el control y tratamiento con etileno, mientras que en el tratamiento con 1-MCP, los SST sólo incrementaron después del día 9. El valor máximo de SST se alcanzó a los 9 dda (17,47 °Brix) en ET-E, mientras que en 1-MCP y CON los valores más altos de SST se obtuvieron a los 16 dda (12,60 y 15,82 °Brix respectivamente) (Fig. 26C) La acidez total titulable (ATT) disminuyó en todos los tratamientos con diferencias significativas ($P=0.003$) entre CON y ET-E con respecto a 1-MCP a los 9 d, pero no se presentaron diferencias ($P>0.05$) a los 16 d en ninguno de los tratamientos (Fig. 26D).

La aplicación de 1-MCP retrasó los cambios en variables físico-químicas inducidos por el etileno, como: desarrollo de color, ablandamiento y aumento de SST (Fig 23). Resultados similares fueron reportados en banano por Medina-Suárez *et al.*, (1997), Jiang *et al.*, (1999b), Jiang y Fu, (2000), Zhang *et al.*, (2006), Phebe Ding y Darduri, (2009) y Jansasithorn y Kanlayanarat, (2006). Los resultados a partir de este estudio, no presentaron diferencias significativas entre CON y ET-E en las variables físico-químicas, lo cual puede ser debido a que la TR no fue diferente en los dos tratamientos, además, aunque la PE fue menor en CON, es posible que sea suficiente para inducir la maduración en bananito. No todos los parámetros de la maduración son afectados en la misma magnitud por el 1-MCP. Pelayo *et al.*, (2003) encontraron que el efecto más significativo de 1-MCP se presentó en la PE, el efecto más débil en la TR y un efecto medio se presentó en el proceso de ablandamiento y los cambios en el color de la epidermis. Lo cual coincide con los resultados encontrados en éste estudio.

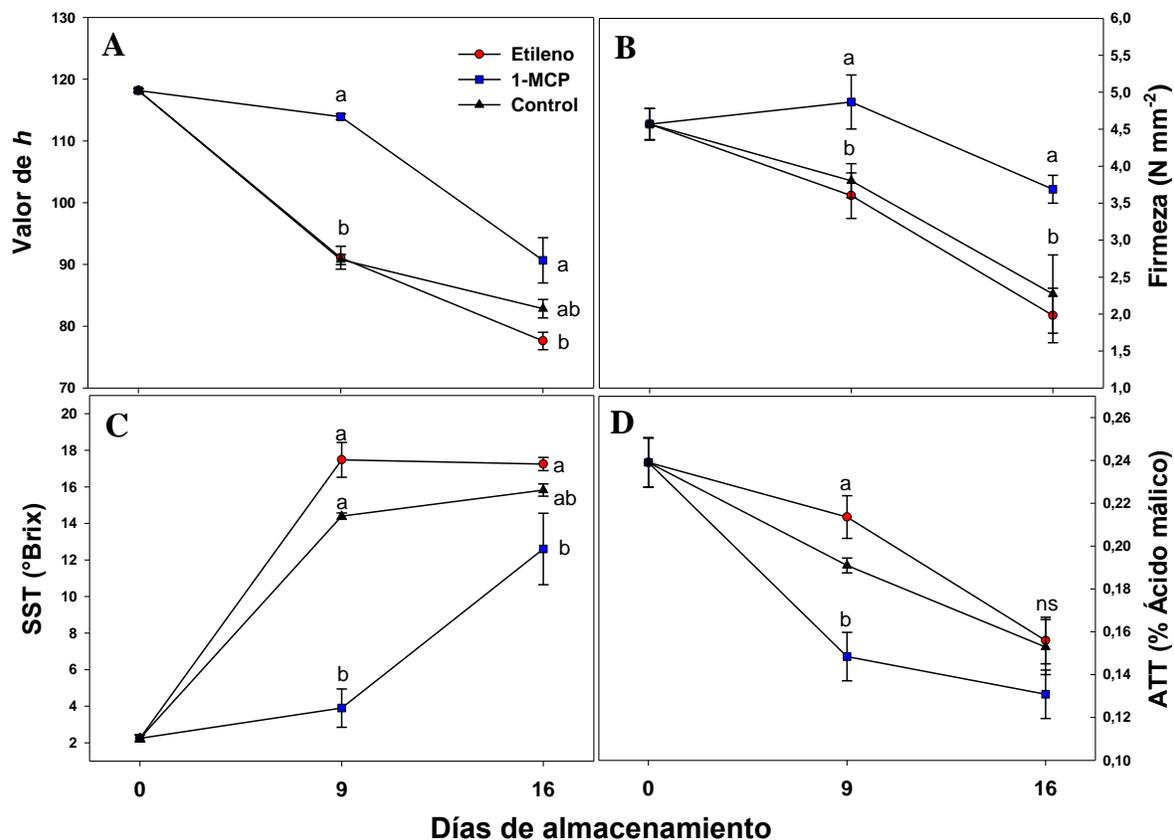


Figura 22. Efecto de la aplicación de Etileno y 1-MCP en (A) color (valor de °h); (B) firmeza; (C) sólidos solubles totales (SST) y (D) acidez total titulable (ATT) de frutos de bananito. Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo. La barra corresponde al error estándar. Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba Tukey ($P < 0.05$), mientras que ns, indica que no existen diferencias.

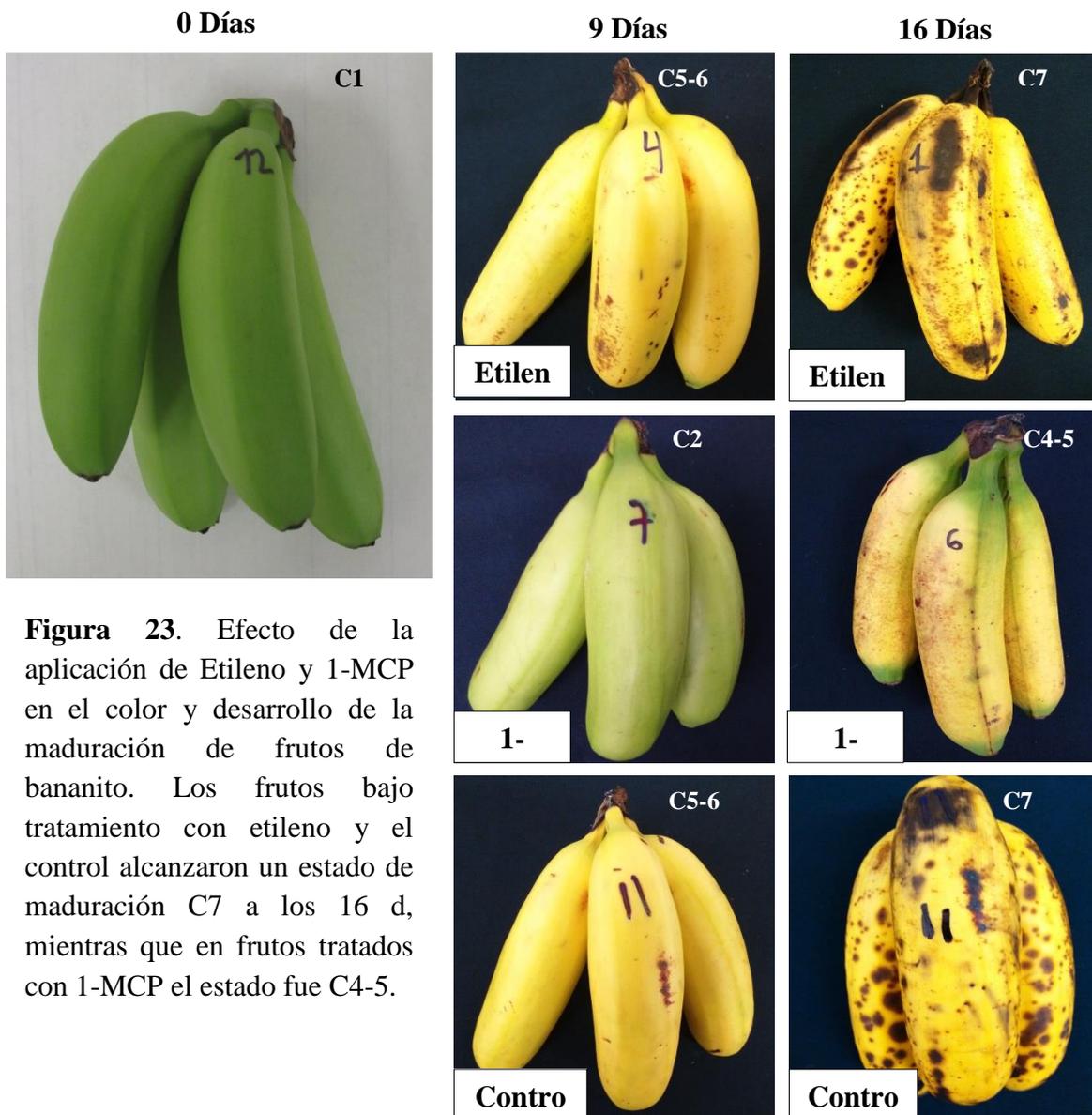


Figura 23. Efecto de la aplicación de Etileno y 1-MCP en el color y desarrollo de la maduración de frutos de bananito. Los frutos bajo tratamiento con etileno y el control alcanzaron un estado de maduración C7 a los 16 d, mientras que en frutos tratados con 1-MCP el estado fue C4-5.

Extracción de ARN.

Se evaluaron 2 metodologías de extracción: la primera correspondió a la utilización del reactivo TRizol[®] (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante; la segunda fue con el buffer de extracción CTAB, de acuerdo a lo propuesto por López *et al.* (2006), ajustando la cantidad de tejido y reactivos, de acuerdo a Asif *et al.*, (2000). Los resultados son mostrados en la tabla 6 y figura 23, en donde se puede observar que el reactivo Trizol[®] mostró la mayor concentración de ARN extraído (28,63 y 43,99 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido), sin embargo, en las muestras evaluadas no se observaron las bandas de ARN ribosomal y la relación A260/A230 y A260/A280 fue menor de 2. Por su parte, con el protocolo propuesto

por López *et al.* (2006), se mostraron las bandas de ARN ribosomal y la relación A260/A230 y A260/A280 fue cercana a 2.

La extracción de ARN de alta calidad es un pre-requisito para diferentes ensayos de biología molecular, como el estudio de la expresión génica (Asif *et al.*, 2006). No obstante, es un procedimiento difícil, debido a la inestabilidad misma del ácido nucleico y a la susceptibilidad de sufrir degradación por enzimas ARNasas (Davis *et al.*, 2006). En tejidos de frutos es difícil la extracción de ARN de alta calidad, debido a la cantidad relativamente baja de ARN, además de la gran cantidad de compuestos polifenólicos y polisacáridos (Asif *et al.*, 2006). Estas sustancias se pueden unir y co-precipitar con el ARN, disminuyendo el rendimiento y la calidad (Asif *et al.*, 2000). En este estudio se encontró que el reactivo TRizol[®] no fue adecuado para la extracción de ARN a partir de la pulpa de bananito, debido a que la relación A260/A230 y A260/A280 fue menor de 2, lo cual indica contaminación con polisacáridos y proteínas respectivamente (Asif *et al.*, 2000). En este sentido, el reactivo TRizol[®] fue desarrollado para tejidos animales, especialmente aquellos ricos en ARNasas, pero parece inadecuado para tejidos de plantas recalcitrantes como banano (Lassois *et al.*, 2009).

A pesar que la concentración de ARN con el protocolo propuesto por López *et al.* (2006) fue menor, la calidad fue significativamente mayor, teniendo en cuenta la relación de absorbancias y las bandas en la electroforesis. Lo anterior puede ser debido a que dicho protocolo, incluye algunos compuestos que contribuyen en mejorar la extracción de ARN, como: PVP-40 y 2-mercaptoetanol que eliminan los compuestos fenólicos; cloroformo y 2-mercaptoetanol que desnaturaliza proteínas y CTAB, que solubiliza y permite la eliminación de polisacáridos (Asif *et al.*, 2000; Asif *et al.*, 2006). Con base en lo anterior, se puede afirmar que dicho protocolo es adecuado para la extracción de ARN a partir de la pulpa de bananito.

Tabla 6. Evaluación de la calidad del ARN extraído de la pulpa de bananito en estado de madurez verde y maduro, utilizando dos metodologías de extracción.

Metodología	Estado de madurez	A260/A230		A260/A280		ARN total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
			\pm DE		\pm DE		\pm DE
López <i>et al.</i> , (2006)	Verde	1,90	0,04	2,11	0,01	25,96	0,13
	Maduro	1,61	0,19	2,11	0,05	22,62	0,14
Trizol [®]	Verde	0,32	0,07	1,39	0,02	28,63	0,11
	Maduro	0,34	0,01	1,44	0,02	43,99	0,08

DE: Desviación estándar

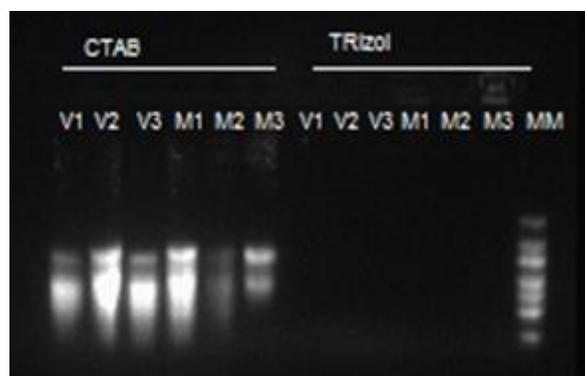


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del ARN extraído a partir de la pulpa de frutos verdes (V) y maduros (M), bajo dos metodologías: CTAB (López *et al.*, 2006) y TRizol®. En la figura se pueden observar las dos bandas de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal.

Con base en los anteriores resultados, se utilizó la metodología propuesta por López *et al.* (2006) para la extracción de ARN de las muestras del experimento del objetivo específico 3, en donde se evaluó el efecto de la aplicación de etileno exógeno y 1-MCP en la expresión de los genes *MA-ACSI*, *MA-ACO1* y *MA-ACO2*. La concentración de ARN estuvo entre, $0,71 \pm 0,18 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ($28,63 \pm 6,87 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido) y la relación A260/A280 y A260/A230 fue de $2,1 \pm 0,02$ y $2,03 \pm 0,07$ respectivamente (Tabla 7). La concentración de ARN disminuyó con el almacenamiento. La relación A260/A230 y A260/A280 fue mayor a 2 en todas las muestras, lo cual indica que no se presentó contaminación con polisacáridos o fenoles (Asif *et al.*, 2000; Asif *et al.*, 2006), además en la electroforesis se observaron las dos bandas de ARN ribosomal, indicando que el ARN extraído no estaba degradado y por tanto era de excelente calidad para los posteriores ensayos de PCR en tiempo real.

Tabla 7. Evaluación de la calidad del ARN extraído de la pulpa de bananito, a partir de los diferentes tratamientos aplicados.

dda	Tratamiento	A260/A230		A260/A280		ARN total	
			± DE		± DE	$\mu\text{g g}^{-1}$	± DE
0		2,07	0,07	2,11	0,02	35,4	7,77
9	Etileno	2	0,08	2,08	0,01	26,51	8,57
	1-MCP	1,99	0,01	2,09	0,02	32,22	0,71
	Control	2,05	0,01	2,12	0,08	30,72	0,89
16	Etileno	2	0,04	2,13	0,02	21,07	0,29
	1-MCP	2,03	0,04	2,15	0,04	23,33	2,07
	Control	2,1	0,08	2,09	0,02	24,41	1,24

DE: Desviación estándar; dda: días de almacenamiento

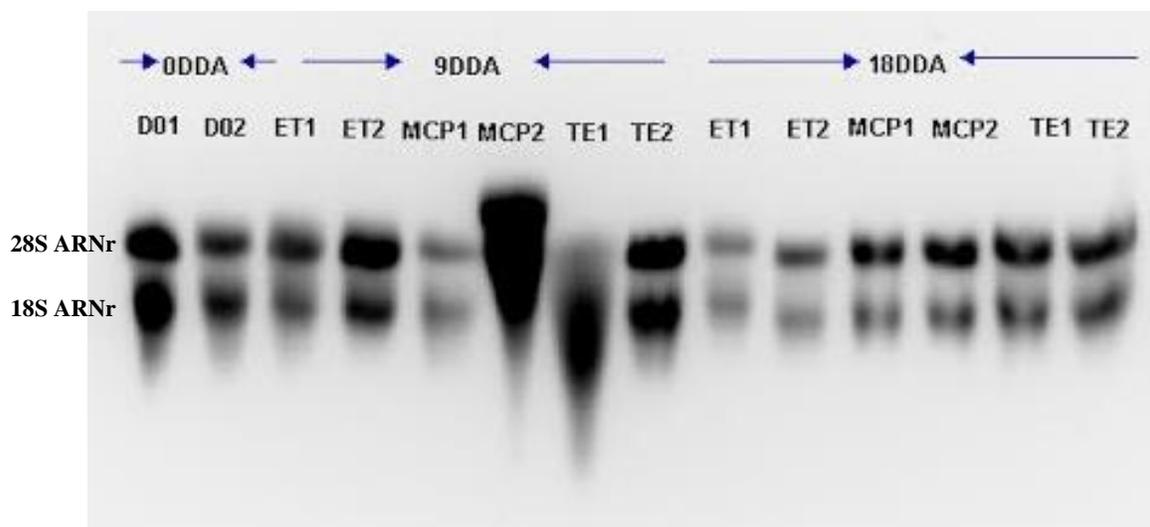


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa (1,2%) del ARN extraído (4 μ L) de la pulpa de bananito, bajo la aplicación de etileno (ET) y 1-MCP (MCP). Se pueden observar las dos bandas de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal.

Especificidad de los primers utilizados.

Los resultados obtenidos muestran que los productos amplificados por PCR transcriptasa reversa y PCR en tiempo real tuvieron un tamaño de 215 pb (*MA-ACSI*), 152 pb (*MA-ACO1*), 125 pb (*MA-ACO2*) y 231 pb (*MA-ACT*), lo cual corresponde con lo reportado por Huber *et al.* (2010). La temperatura de desnaturalización (*melting-Tm*) de los fragmentos amplificados fue 83,23 °C para *MA-ACT*; 84,66 °C para *MA-ACO1*; 80,26 °C para *MA-ACO2* y 85,05 °C para *MA-ACSI*. En todos los casos se generó una sola banda, aunque en *MA-ACSI* se observa una segunda banda muy leve (~ 500 pb), sin embargo, los datos de *Tm* no mostraron formación de dímeros de primers o amplificación inespecífica.

Cuantificación de los transcriptos de mRNA a través de RT-qPCR

Se realizó la cuantificación de la expresión de los genes de *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* a partir del tejido de la pulpa en frutos de bananito a los 0 (control), 9 y 16 días de almacenamiento con y sin aplicación de etileno y 1-MCP, mediante la técnica de la PCR en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados muestran que la expresión del gen *MA-ACO1* aparentemente disminuyó durante la maduración de bananito, sin embargo, se observó un aumento en el tratamiento con 1-MCP a los 9 días y posteriormente, disminuyó hasta los niveles del CON y ET-E (Fig 28A). La expresión de *MA-ACO2* aumentó hasta los 9 d y posteriormente disminuyó en el tratamiento CON, mientras que en ET-E disminuyó levemente hasta los 9 d y posteriormente incrementó, alcanzando los niveles de expresión

del CON. En el caso de 1-MCP, la expresión siempre fue menor comparado con los otros tratamientos (Fig 28B). La expresión del gen *MA-ACSI* aumentó con la maduración de los frutos en todos los tratamientos (Fig 28C). El mayor aumento se observó en el tratamiento con ET-E a los 9 y 16 d, mientras que en CON, el aumento de la expresión sólo ocurrió desde el noveno día de almacenamiento. El tratamiento con 1-MCP incrementó la expresión de *MA-ACSI* en los primeros 9 d, pero posteriormente no se observó un cambio significativo.

En general, la expresión relativa de cada gen evaluado para el día cero, fue la misma entre los tratamientos evaluados, sin embargo se detectó una tendencia en el aumento de nivel de expresión en el siguiente orden *MA-ACO1*>*MA-ACO2*>*MA-ACSI*. Tendencia que cambió completamente para el día 9, en donde los niveles de expresión cambiaron de acuerdo a cada uno de los tratamientos empleados. Para el día 16, se observó el siguiente incremento en la expresión *MA-ACSI*>*MA-ACO2*>*MA-ACO1*, con excepción de la disminución presentada en el nivel de expresión del gen *MA-ACO2* con el tratamiento de 1-MCP. En general, para este día los niveles de expresión de los genes entre los tratamientos con etileno y el control no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

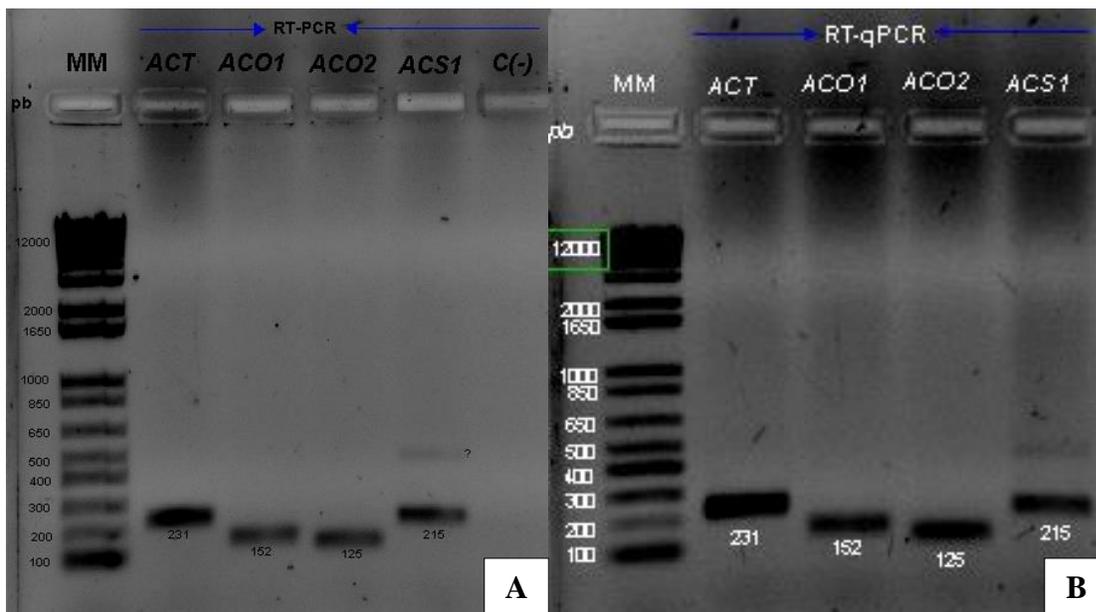


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR con diferentes primers: *MA-ACT*, *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI*, amplificados por PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) (A) y PCR en tiempo real (RT-qPCR) (B).

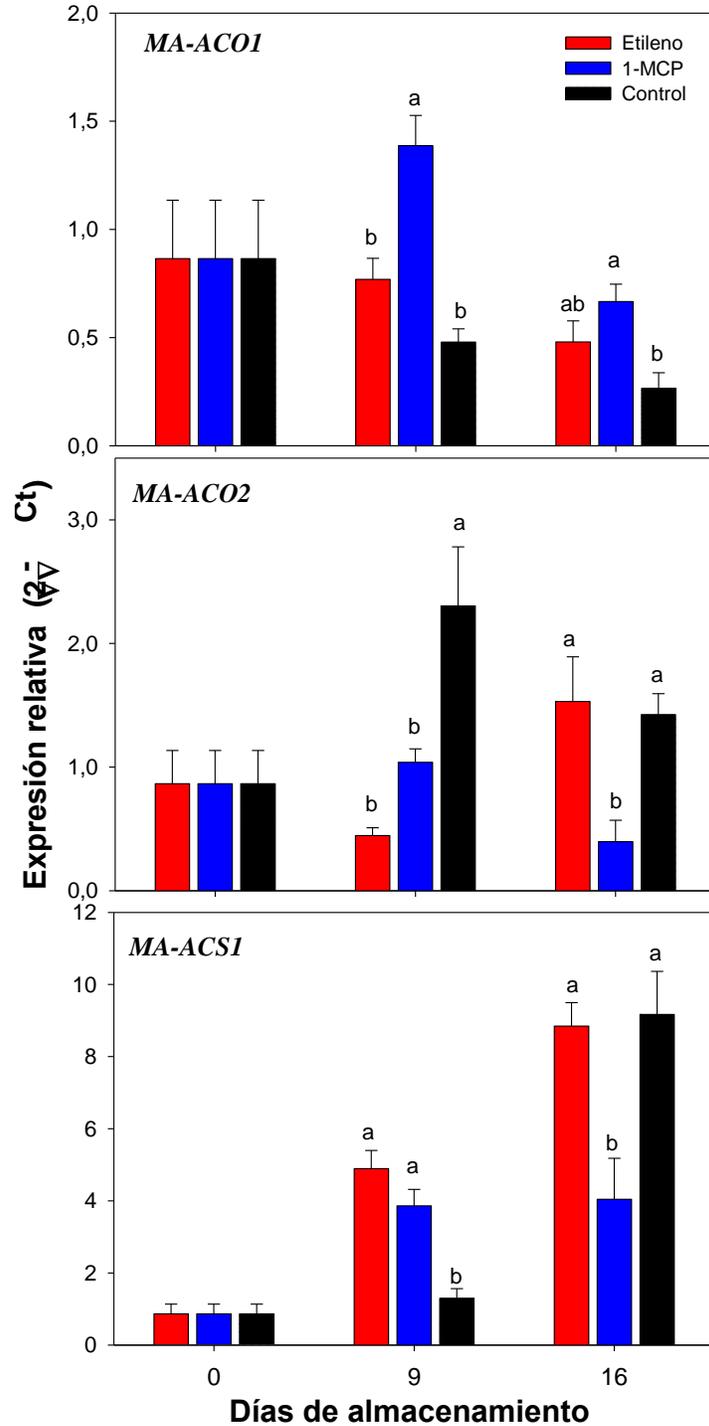


Figura 27. Expresión relativa de los genes *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* en la pulpa de bananito como consecuencia de la aplicación de Etileno y 1-MCP. Los valores corresponden al promedio (n=4) en cada punto de muestreo. La barra representa al error estándar. Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba Tukey ($P < 0.05$).

La tasa de PE en banano está correlacionada con los niveles de transcritos de genes *MA-ACS* y *MA-ACO* (Liu *et al.*, 1999). Los niveles de expresión de estos genes cambian con el estado de maduración y en respuesta a la aplicación de etileno exógeno y 1-MCP. Por ejemplo, el gen *MA-ACSI* no se expresa en estado preclimático, pero posteriormente empieza a incrementar con un comportamiento similar a la PE, manteniendo niveles de expresión altos, incluso después de la disminución de PE (López-Gómez *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Inaba *et al.*, 2007). A su vez, el contenido de ACC y de la proteína MA-ACS1 presenta un comportamiento similar a la expresión del gen *MA-ACSI* (Liu *et al.*, 1999; Choudhury *et al.*, 2008). En éste estudio se encontraron niveles de expresión bajos de *MA-ACSI* antes del climaterio en todos los tratamientos, los cuales incrementan con la maduración (Fig 28).

La aplicación de etileno exógeno induce la expresión de *MA-ACSI* en banano (Huang *et al.*, 2006), mientras que el 1-MCP la inhibe (Zhang *et al.*, 2006), lo cual coincide con lo encontrado en éste estudio, debido a que la expresión de *MA-ACSI* no cambió después del noveno día de almacenamiento en el tratamiento con 1-MCP, mientras que en ET-E continuó incrementando. Aunque es posible que en el tratamiento ET-E haya aumentado la expresión de *MA-ACSI* en los primeros días de almacenamiento, coincidiendo con el pico de PE, teniendo en cuenta que la expresión de *MA-ACSI* tiene un comportamiento similar a la PE en banano (Inaba *et al.*, 2007). La mayor expresión en 1-MCP comparado con el control, puede estar correlacionada con lo reportado por Inaba *et al.* (2007), quienes afirman que en la pulpa de banano opera el mecanismo de retroalimentación negativa de biosíntesis de etileno, por el cual, la aplicación de 1-MCP una vez iniciada la PE lleva al aumento de la expresión de *MA-ACSI* en la pulpa pero no en la epidermis. Sin embargo, se requiere mayor investigación en bananito para llegar a esta afirmación. Por su parte, a pesar de que la expresión de *MA-ACSI* sea menor en el control a los 9 dda, es posible que estos bajos niveles de expresión sean suficientes para inducir la PE, además no se puede descartar la hipótesis de que se haya presentado un pico de expresión de *MA-ACSI* a los 8 d cuando la PE fue máxima, teniendo en cuenta lo reportado por Inaba *et al.*, (2007).

A diferencia de *MA-ACSI*, el gen *MA-ACO1* es expresado desde la etapa preclimática en la pulpa, pero no en la epidermis (López-Gómez *et al.*, 1997), lo cual es debido a que cierta cantidad de transcritos son expresados de manera constitutivamente en la pulpa durante toda la maduración de banano (Pathak *et al.*, 2003). La aplicación de etileno exógeno induce la expresión de *MA-ACO1* (Zhang *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2007; Choudhury *et al.*, 2008), pero cambia el patrón de expresión, iniciándose primero en la epidermis (López-Gómez *et al.*, 1997; Hubert *et al.*, 2010). Por el contrario, el 1-MCP inhibe la expresión de *MA-ACO1* en la pulpa, hasta que se inicia la maduración, sin embargo, sí el 1-MCP es

aplicado después del inicio del climaterio, no tiene ningún efecto en la expresión de éste gen (Inaba *et al.*, 2007).

En éste estudio se encontró que la expresión de *MA-ACOI* disminuye con la maduración, pero es posible que se presente un pico de expresión previo al pico de PE, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el tratamiento de 1-MCP (Fig 25B), en los cuales se presentó un pico en la expresión previo al aumento de la PE. En éste sentido, Hubert *et al.*, (2010) encontraron un pico de expresión de *MA-ACOI* en la pulpa cercano a la máxima PE. Por el contrario, en banano la expresión de *MA-ACOI* incrementa con la maduración, incluso después del climaterio, sin embargo, la actividad de ACO disminuye, por lo cual se llegó a la conclusión que la disminución de la actividad ACO no está correlacionada directamente con los niveles de expresión de *MA-ACOI*, sino que es debida a la disminución de su cofactor hierro (Fe^{2+}) y su co-sustrato ascorbato (Liu *et al.*, 1999; Inaba *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2013). Es decir, que los resultados encontrados en el presente estudio para el gen *MA-ACOI* difieren de lo reportado en banano.

En banano se ha encontrado que etileno exógeno induce en mayor proporción *MA-ACSI* comparado con *MA-ACOI* (Choudhury *et al.*, 2008), mientras que el 1-MCP disminuye en mayor proporción la expresión de *MA-ACSI* comparado con *MA-ACOI* (Zhang *et al.*, 2006), debido a que el gen *MA-ACOI* presenta cierta cantidad de expresión constitutiva durante la maduración que no es afectada por la aplicación de 1-MCP (Pathak *et al.*, 2003). En este estudio, todos los genes evaluados presentaron niveles de expresión desde el día 0 de almacenamiento. Resultados similares fueron reportados en gulupa (*Passiflora edulis* Sims) (Mita *et al.*, 1998). Los resultados encontrados en éste estudio, muestran mayores niveles de expresión de *MA-ACSI* comparado con *MA-ACOI* y *MA-ACO2*. Con lo anterior se puede afirmar que la expresión de *MA-ACSI* depende directamente del etileno, mientras que en *MA-ACOI* existen otros factores que regulan su expresión y que llevan a que existan ciertos niveles basales de expresión independientemente de la producción de etileno.

La maduración en banano es diferente de otros frutos climatéricos, debido a que la biosíntesis de etileno puede tener más de un mecanismo de regulación (Pathak *et al.*, 2003). En primera instancia un mecanismo de retroalimentación positivo (*positive feedback regulatory mechanism*) por el cual el etileno exógeno, induce la producción de etileno endógeno, mientras que el 1-MCP la inhibe, además de un mecanismo de regulación negativo (*negative feedback regulatory mechanism*), en el cual el etileno exógeno inhibe la PE, mientras que el 1-MCP la induce. Inaba *et al.*, (2007) afirman que éste último mecanismo opera en la pulpa de banano, mientras que en la epidermis opera el mecanismo de retroalimentación positiva. Lo anterior fue comparado con la aplicación de etileno y 1-MCP por separado a los tejidos de la pulpa y la epidermis, en donde se encontró que una vez inicia el climaterio (1 día después del inicio de la PE), la aplicación de 1-MCP induce la PE en la pulpa pero no en la epidermis, lo cual correlacionó con mayor expresión de *MA-*

ACSI, contenido de ACC y actividad de ACS en la pulpa, mientras que el 1-MCP no tuvo efecto en el gen *MA-ACOI*, o la actividad ACO. Esto sugiere que la biosíntesis puede estar regulada negativamente en la pulpa por el etileno a nivel de *MA-ACSI*, es decir que el 1-MCP, lleva a mayor expresión de *MA-ACSI*, mientras que en la epidermis el 1-MCP inhibe la actividad y expresión de ACS y ACO, por lo cual se puede considerar un mecanismo de retroalimentación positiva.

El papel de *MA-ACO2* en la maduración de banano es menos importante comparado con *MA-ACSI* y *MA-ACOI*, sin embargo, se ha encontrado que el perfil de expresión de *MA-ACO2* es similar a *MA-ACOI*, pero con niveles significativamente más bajos (Inaba *et al.*, 2007). Resultados similares fueron reportados en banano diploide, en donde la expresión de *MA-ACOI* fue 100 veces mayor a *MA-ACO2* (Hubert *et al.*, 2010). En éste estudio se encontró que los niveles de expresión de *MA-ACO2* fueron similares a los encontrados en *MA-ACOI*, pero con un comportamiento diferente entre tratamientos. En CON se observa un pico de expresión a los 9 d, es decir justo después del pico de PE, mientras que en 1-MCP el pico de expresión se presenta antes del incremento de PE, aunque es posible que después del día 16, la expresión de *MA-ACO2* incrementara nuevamente. Por último, en ET-E, la mayor expresión se observó a los 16 d, pero es posible que se haya presentado un pico de expresión cerca a la máxima PE (Fig 25B). Para poder comprobar los resultados obtenidos por otros autores en banano, se recomienda para posteriores investigaciones en bananito, realizar determinaciones de la expresión de los genes *MA-ACOI*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* en los tejidos de la pulpa y epidermis por separado y en un intervalo más corto, con el fin de poder dilucidar los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de etileno en frutos de bananito.

7.3. Conclusiones

La aplicación de etileno exógeno aumento la producción de etileno, pero no afectó significativamente la intensidad respiratoria, color, firmeza, SST, y ATT con respecto al control, lo cual sugiere que los bajos niveles de producción de etileno en el control en los primeros 2 días de almacenamiento ($0,785$ a $1,404 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) sean suficientes para inducir los cambios fisiológicos y moleculares dependientes de etileno que ocurren durante la maduración. La aplicación de 1-MCP retrasó el inicio de la PE y TR entre 9 y 11 d, con lo cual el desarrollo de los cambios que ocurren durante la maduración (cambio de color, ablandamiento, aumento de SST) también fueron retrasados por 7 días.

No fue posible afirmar que la aplicación de etileno exógeno haya inducido la expresión de los genes *MA-ACSI*, *MA-ACOI* y *MA-ACO2* debido al intervalo en el cual se hicieron las determinaciones, debido a que para los tratamientos ET-E y CON el pico de producción de etileno y respiración ocurrió antes (2 y 8 días respectivamente) de la segunda determinación

de la expresión génica. Con base en esto, se recomienda para posteriores estudios realizar mediciones de la expresión en un intervalo más corto, en lo posible todos los días al menos en los primeros 8 días de almacenamiento.

Los genes *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* presentaron algún nivel de expresión durante la poscosecha de bananito, en donde los niveles de expresión de *MA-ACSI* fueron significativamente mayores a *MA-ACO1* y *MA-ACO2* a partir del noveno día de almacenamiento. El gen *MA-ACSI* incrementó sus niveles de expresión en todos los tratamientos, siendo mayor en el control y con la aplicación de etileno comparado con el 1-MCP a los 16 días. Por su parte, los genes *MA-ACO1* y *MA-ACO2*, presentaron un pico de expresión a los 9 días con niveles de expresión similares. En *MA-ACO1*, el pico se mostró en el tratamiento con 1-MCP previo al aumento de PE, mientras que para *MA-ACO2* el pico ocurrió en el control un día después de la máxima PE. Con lo anterior es posible deducir que en el tratamiento con etileno, dichos genes presentaron un pico en la primera semana de almacenamiento, el cual no se pudo detectar por el intervalo en el que se realizaron las mediciones. Por último, para posteriores estudios se recomienda el análisis de la expresión de estos genes en los tejidos de la pulpa y epidermis por separado, ya que en banano se han reportado dos mecanismos de retroalimentación de la biosíntesis de etileno, uno negativo en la pulpa y otro positivo en la epidermis, por lo cual la expresión de dichos genes es diferente en los 2 tejidos.

7.4. Literatura citada

- Asif, M.H., Dhawan, P., Nath, P., 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol. Report.* 18, 109–115.
- Asif, M.H., Pathak, N., Solomos, T., Trivedi, P.K., 2009. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *South Afr. J. Bot.* 75, 137–144.
- Asohofrucol. 2014. Análisis de las importaciones y exportaciones hortifrutícolas durante el año 2013. *Revista de la Asociación Hortifrutícola de Colombia, ASOHOFrucol.* 22-23p.
- Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R., Nath, P., 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol. Adv.* 28, 94–107.
- Barry, C.S., Giovannoni, J.J., 2007. Ethylene and Fruit Ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26, 143–159.

- Blankenship, S.M., Dole, J.M., 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1–25.
- Bleecker, A.B., Kende, H., 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 1–18.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., Pech, J.C., 2010. Mechanism of Fruit Ripening, in: Pua, E.C., Davey, M.R. (Eds.), *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 319–339.
- Bregoli, V.Z., 2005. Postharvest 1-methylcyclopropene application in ripening control of “Stark Red Gold” nectarines: Temperature-dependent effects on ethylene production and biosynthetic gene expression, fruit quality, and polyamine levels. *Postharvest Biol. Technol.* 111–121.
- Cameron, A.C., Reid, M.S., 2001. 1-MCP blocks ethylene-induced petal abscission of *Pelargonium peltatum* but the effect is transient. *Postharvest Biol. Technol.* 22, 169–177.
- Castro Benítez, M., Restrepo Sánchez, L.P., Narváez Cuenca, C.E., 2005. Actividad de clorofilasa durante la maduración del banano bocadillo (*Musa accuminata*) (Simons). *Actual. Biológicas* 27, 151–158.
- Chen, L., Zhong, H., Kuang, J., Li, J., Lu, W., Chen, J., 2011. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* 234, 377–390.
- Choudhury, S.R., Roy, S., Sengupta, D.N., 2008. Characterization of transcriptional profiles of MA-ACS1 and MA-ACO1 genes in response to ethylene, auxin, wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. *J. Plant Physiol.* 165, 1865–1878.
- Costa, F., Stella, S., Weg, W.E.V. de, Guerra, W., Cecchinell, M., Dallavia, J., Koller, B., Sansavini, S., 2005. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica* 141, 181–190.
- Dadzie, B.K., Orchard, J.E., 1997. Routine post-harvest screening of banana/plantain hybrids: criteria and methods. 63 pp.
- De Martino, G., Mencarelli, F., Golding, J.B., 2007. Preliminary investigation into the uneven ripening of banana (*Musa* sp.) peel. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 35, 193–199.
- Feygenberg, O., Ben-Arie, R., Pesis, E., 2012. Postharvest application of 1-MCP to green or yellow banana for extending storability and shelf-life, *Acta Horticulturae*.
- Fluhr, R., 1998. Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci.* 3, 141–146.

- Golding, J.B., Shearer, D., Wyllie, S.G., McGlasson, W.B., 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 87–98.
- Gupta, S.M., Srivastava, S., Sane, A.P., Nath, P., 2006. Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: Presence of distinct fruit specific, ethylene induced and ethylene repressed expression. *Postharvest Biol. Technol.* 42, 16–22.
- Gutiérrez, J. 1997. Efecto del uso del absorbente de etileno en el almacenamiento de banano bocadillo (*Musa acuminata*). Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Agrícola. 110p.
- Harris, D.R., Seberry, J.A., Wills, R.B.H., Spohr, L.J., 2000. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 303–308.
- Huang, F.-C., Do, Y.-Y., Huang, P.-L., 2006. Genomic Organization of a Diverse ACC Synthase Gene Family in Banana and Expression Characteristics of the Gene Member Involved in Ripening of Banana Fruits†. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3859–3868.
- Huber, D.J., 2008. Suppression of Ethylene Responses Through Application of 1-Methylcyclopropene: A Powerful Tool for Elucidating Ripening and Senescence Mechanisms in Climacteric and Nonclimacteric Fruits and Vegetables. *HortScience* 43, 106–111.
- Huber, D.J., Hurr, B.M., Lee, J.S., Lee, J.H., 2010. 1-Methylcyclopropene sorption by tissues and cell-free extracts from fruits and vegetables: Evidence for enzymic 1-MCP metabolism. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 123–130.
- Hubert, O., Chillet, M., Juliannus, P., Fils-Lycaon, B., Mbéguié-A-Mbéguié, D., 2010. Effect of mode of ripening on ethylene biosynthesis during ripening of diploid banana (*Musa spp.*) fruit, *Acta Horticulturae*.
- Hubert, O., Mbéguié-A-Mbéguié, D., 2012. Expression patterns of ethylene biosynthesis genes from bananas during fruit ripening and in relationship with finger drop. *AoB Plants* 2012, pls041.
- Inaba, A., Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W.-J., Nakano, R., Kubo, Y., 2007. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J. Exp. Bot.* 58, 1047–1057.
- In, B.C., Strable, J., Binder, B.M., Falbel, T.G., Patterson, S.E., 2013. Morphological and molecular characterization of ethylene binding inhibition in carnations. *Postharvest Biol. Technol.* 86, 272–279.

- Jafari, Z., Haddad, R., Hosseini, R., Garoosi, G., 2013. Cloning, identification and expression analysis of ACC oxidase gene involved in ethylene production pathway. *Mol. Biol. Rep.* 40, 1341–1350.
- Jansasithorn, R., Kanlayanarat, S., 2006. Effect of 1-MCP on physiological changes in banana “Khai,” *Acta Horticulturae*.
- Jiang, Y., Fu, J., 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regul.* 30, 193–200.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., 2003. Softening response of 1-methylcyclopropene-treated banana fruit to high oxygen atmospheres. *Plant Growth Regul.* 41, 225–229.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999a. Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regul.* 28, 77–82.
- Jiang, Y., Joyce, D.C., Macnish, A.J., 1999b. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biol. Technol.* 16, 187–193.
- J Oliveira, Júnior, A.V., Priscila Zaczuk Bassinello, Cordenunsi, B.R., Mainardi, J.A., Purgatto, E., Lajolo, F.M., 2006. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 41–47.
- Khan, A.S., Singh, Z., 2007. 1-MCP regulates ethylene biosynthesis and fruit softening during ripening of “Tegan Blue” plum. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 298–306.
- Klee, H.J., Giovannoni, J.J., 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu. Rev. Genet.* 45, 41–59.
- Li, J., Zhu, H., Yuan, R., 2010. Profiling the Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Ethylene Perception, and Cell Wall Degradation during Fruit Abscission and Fruit Ripening in Apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 391–401.
- Lim, D.T.K., 2012. *Musa acuminata* (AA Group) “Sucrier,” in: *Edible Medicinal And Non Medicinal Plants*. Springer Netherlands, pp. 498–501.
- Liu, X., Shiomi, S., Nakatsuka, A., Kubo, Y., Nakamura, R., Inaba, A., 1999. Characterization of Ethylene Biosynthesis Associated with Ripening in Banana Fruit. *Plant Physiol.* 121, 1257–1265.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- López-Gómez, R., Campbell, A., Dong, J.-G., Yang, S.-F., Angel Gómez-Lim, M., 1997. Ethylene biosynthesis in banana fruit: isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. *Plant Sci.* 123, 123–131.

- López, R., Asensio, C., Guzman, M.M., Boonham, N., 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of potato yellow vein virus (PYVV). *J. Virol. Methods* 136, 24–29.
- Ma, G., Wang, R., Wang, C.-R., Kato, M., Yamawaki, K., Qin, F., Xu, H.-L., 2008. Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli. *Plant Growth Regul.* 57, 223–232.
- Mathooko, F.M., Tsunashima, Y., Kubo, Y., Inaba, A., 2004. Full Length Research Paper - Expression of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus persica* L.) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1-methylcyclopropene: possible role of ethylene.
- Mbéguíé-Mbéguíé, D., B. Fils-Lycaon, B. Chillet, O. Hubert, C. Galas y R. Gómez. 2008b. Extraction and purification of total RNA from banana tissues (small scale). *Fruits.* 63(4), 255-261.
- Medina-Suárez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aked, J., Bird, C.R., Seymour, G.B., 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115, 453–461.
- Mita, S., Kawamura, S., Yamawaki, K., Nakamura, K., Hyodo, H., 1998. Differential expression of genes involved in the biosynthesis and perception of ethylene during ripening of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Physiol.* 39, 1209–1217.
- Nakatsuka, A., Shiomi, S., Kubo, Y., Inaba, A., 1997. Expression and Internal Feedback Regulation of ACC Synthase and ACC Oxidase Genes in Ripening Tomato Fruit. *Plant Cell Physiol.* 38, 1103–1110.
- Pathak, N., Asif, M.H., Dhawan, P., Srivastava, M.K., Nath, P., 2003. Expression and activities of ethylene biosynthesis enzymes during ripening of banana fruits and effect of 1-MCP treatment. *Plant Growth Regul.* 40, 11–19.
- Paull, R.E., 1996. Ethylene, storage and ripening temperatures affect Dwarf Brazilian banana finger drop. *Postharvest Biol. Technol.* 8, 65–74.
- Pelayo, C., Vilas-Boas, E.V. de B., Benichou, M., Kader, A.A., 2003. Variability in responses of partially ripe bananas to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 75–85.
- Phebe Ding, Darduri, K.B., 2009. Responses of *Musa* AAA Berangan to 1-methylcyclopropene. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 32, 125–132.
- Robinson, C y V. Galán. 2012. Plátanos y bananas. Editorial Paraninfo. 320p.

- Sisler, E.C., Dupille, E., Serek, M., 1996. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Regul.* 18, 79–86.
- Sisler, E.C., Serek, M., 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.* 100, 577–582.
- Watkins, C.B., 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv., Ethylene biology: A tribute to Edward C. Sisler* 24, 389–409.
- Xiao, Y., Chen, J., Kuang, J., Shan, W., Xie, H., Jiang, Y., Lu, W., 2013a. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes. *J. Exp. Bot.* 64, 2499–2510.
- Xiao, Y., Chen, J., Kuang, J., Shan, W., Xie, H., Jiang, Y., Lu, W., 2013b. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes. *J. Exp. Bot.* 64, 2499–2510.
- Yamane, M., Abe, D., Yasui, S., Yokotani, N., Kimata, W., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A., 2007. Differential expression of ethylene biosynthetic genes in climacteric and non-climacteric Chinese pear fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 220–227.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E., 1984. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 155–189.
- Yang, X., Song, J., Campbell-Palmer, L., Fillmore, S., Zhang, Z., 2013. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 78, 55–66.
- Yoo, S.-D., Cho, Y., Sheen, J., 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci.* 14, 270–279.
- Zhang, L., Jiang, L., Shi, Y., Luo, H., Kang, R., Yu, Z., 2012. Post-harvest 1-methylcyclopropene and ethephon treatments differently modify protein profiles of peach fruit during ripening. *Food Res. Int.* 48, 609–619.
- Zhang, M.-J., Jiang, Y.-M., Jiang, W.-B., Liu, X.-J., 2006. Regulation of Ethylene Synthesis of Harvested Banana Fruit by 1-Methylcyclopropene. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 111–115.

8. Conclusiones y recomendaciones generales.

La aplicación de 1-MCP retrasó el desarrollo de variables relacionadas con la maduración de bananito por 7 días, sin observarse un efecto claro de la concentración o tiempo de tratamiento. Sin embargo, se encontró que la concentración de 1-MCP más adecuada para retrasar la maduración de bananito fue $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$, aunque se observaron resultados favorables con dosis inferiores, por tanto, la elección de la concentración para tratamientos a nivel comercial, debe ser aquella que implique menos costos de aplicación. No se observaron diferencias significativas con respecto a los tiempos de tratamiento con 1-MCP, sin embargo, se recomiendan 6h de tratamiento, teniendo en cuenta que más del 80% del 1-MCP es absorbido en las primeras 6 h (Nanthachai *et al.*, 2007), de esta manera se asegura la absorción de 1-MCP por los receptores. El desarrollo normal de la maduración no fue afectado negativamente por la aplicación de 1-MCP, debido a que no se presentaron diferencias con respecto al control, en las variables color, TR, SST y ATT, cuando los frutos alcanzaron el estado de maduración C7, lo cual ocurrió a los 21 dda en el control y a los 28 dda en los tratamientos con 1-MCP. Para posteriores estudios, se recomienda realizar una prueba de análisis sensorial con un panel de catadores para comprobar que las características organolépticas no hayan sido afectadas negativamente por el 1-MCP. Sin embargo, para fines investigativos la concentración de $1,0 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP por 6 h es adecuada para el estudio del efecto del 1-MCP en la poscosecha de bananito.

La aplicación de etileno exógeno indujo la maduración de los frutos de bananito, mientras que el 1-MCP retrasó éste proceso. El 1-MCP fue eficiente en disminuir los efectos inducidos por el etileno cuando los frutos fueron tratados previa o posteriormente con etileno, lo cual parece ser debido a que el tratamiento previo con etileno induce la producción de receptores, por tanto la aplicación de 1-MCP posterior tendría mayor número de sitios de unión, mientras que la aplicación previa de 1-MCP puede reducir el número de receptores, con lo cual, la aplicación de etileno no induce la maduración de manera acelerada. En banano se ha reportado que el 1-MCP puede inducir la PE, (sistema 1), sin embargo, esto no se presentó en éste trabajo, aunque no se puede descartar, por lo tanto en posteriores estudios se recomienda comprobar ésta hipótesis, realizando aplicaciones de 1-MCP y etileno a intervalos más seguidos durante la maduración de bananito.

Aparentemente la aplicación de 1-MCP posterior al etileno es más eficiente en disminuir el avance de variables relacionadas con la epidermis, como: color, extensibilidad y firmeza, mientras que el efecto en variables relacionadas con la pulpa (SST, ATT y RM) no fue tan significativo, lo cual puede ser debido a que el 1-MCP se une principalmente a receptores en la epidermis de banano, además, la maduración en bananito al igual que en banano inicia en la pulpa, en donde la aplicación de etileno exógeno induce en primera instancia el desarrollo de las variables relacionadas con la pulpa. Por otro lado, se ha sugerido que la

pulpa y la epidermis presentan mecanismos de retroalimentación de la biosíntesis de etileno diferente, por lo cual se recomienda para posteriores estudios realizar la determinación de la PE por separado en la pulpa y en la epidermis, para comprobar lo anterior.

Los genes *MA-ACO1*, *MA-ACO2* y *MA-ACSI* presentaron algún nivel de expresión durante la poscosecha de bananito, es decir, que los resultados obtenidos aquí, difieren de lo reportado en banano, en donde el gen *MA-ACSI* no es expresado en frutos verdes (estado pre-climatérico). Los niveles de expresión de *MA-ACSI* fueron significativamente mayores a *MA-ACO1* y *MA-ACO2* a partir del noveno día de almacenamiento. El gen *MA-ACSI* incrementó sus niveles de expresión en todos los tratamientos, siendo 2 veces mayor en el control y con la aplicación de etileno comparado con el 1-MCP a los 16 días. Por su parte, los genes *MA-ACO1* y *MA-ACO2*, presentaron un pico de expresión a los 9 días con niveles de expresión similares, es decir que los resultados difieren de lo reportado en banano diploide IDN10, en donde se encontró que los niveles de expresión de *MA-ACO1* son 100 veces mayores, comparado con *MA-ACO2*, con lo cual se puede afirmar que los anteriores genes son igualmente importantes en la biosíntesis de etileno de bananito. El gen *MA-ACO1* mostró un pico en el tratamiento con 1-MCP previo al aumento de PE (9 días), mientras que para el gen *MA-ACO2* el pico ocurrió en el control un día después de la máxima PE (9 días). Con lo anterior es posible deducir que en el tratamiento con etileno, dichos genes presentaron un pico en la primera semana de almacenamiento, el cual no se pudo detectar por el intervalo en el que se realizaron las mediciones. Por último, para posteriores estudios se recomienda el análisis de la expresión de estos genes en los tejidos de la pulpa y epidermis por separado, ya que en banano se han reportado dos mecanismos de retroalimentación de la biosíntesis de etileno, uno negativo en la pulpa y otro positivo en la epidermis, por lo cual la expresión de dichos genes es diferente en los 2 tejidos.

Adicionalmente, se recomienda realizar el análisis de la expresión de los genes mencionados en la epidermis del fruto, debido a que en banano se han reportado que los mecanismos de regulación de la biosíntesis de etileno son diferentes en la pulpa y epidermis. Con lo anterior, se esperaría ampliar el conocimiento en los mecanismos que regulan la maduración en un fruto climatérico como bananito, a nivel molecular.