

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Evaluación de ácido jasmónico, ácido salicílico y quitosan sobre la tolerancia al frío y prevención de daños celulares en la epidermis del fruto del banano (*Musa acuminata* Colla var. cavendish)

Kruscaya Paola Piñeiros Coral

Lucía Ramírez, Ph.D., Directora de Tesis

Antonio León, Ph.D., CoDirector de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Alimentos

Quito, mayo de 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Evaluación de ácido jasmónico, ácido salicílico y quitosan sobre la tolerancia al frío y
prevención de daños celulares en el banano (*Musa acuminata* Colla var. cavendish)**

Kruscaya Paola Piñeiros Coral

Lucía Ramírez Cárdenas, Ph.D.

Directora de Tesis

Antonio León, Ph.D.

CoDirector de Tesis

Javier Garrido, MSc.

Coordinador de Ingeniería en Alimentos

Stalin Santacruz, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Francisco Carvajal, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Ximena Córdova Vallejo, Ph.D.

Decana de la Escuela de Ingeniería

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Quito, mayo de 2014

©Derechos de autor

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Kruscaya Paola Piñeiros Coral

C. I.: 1719567784

Fecha: Quito, mayo de 2014

Dedicatoria

Dedico este proyecto a Dios por ser mi amparo y fortaleza,

A mis padres porque siempre me han apoyado a cumplir mis sueños y objetivos de vida,

A mi hermana, por ser siempre mi amiga incondicional,

A mi novio, Cristhian Marcial, por su amor, apoyo, fortaleza, comprensión y amistad y

A mi directora Dra. Lucía Ramírez y a mi codirector el Dr. Antonio León por entregarme sus
conocimientos, tiempo y paciencia.

Agradecimiento

“Cuando un sueño se hace realidad no siempre se le atribuye al empeño que pongamos en realizarlo,

Detrás de cada sueño siempre hay personas que nos apoyan y que creen en nosotros, Son seres especiales que nos animan a seguir adelante en nuestros proyectos brindándonos, de diferentes maneras, su solidaridad”.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi gran consejera, Dra. Lucía Ramírez, por su orientación, ánimo, paciencia, amistad y comprensión durante todo el curso de esta investigación. También al Dr. Antonio León, por sus valiosas sugerencias, apoyo y confianza en este trabajo, por su gran capacidad para guiar mis ideas siendo un aporte invaluable en mi formación como investigadora.

A Jhon Jairo Venegas, por la transmisión de sus conocimientos valiosos que he usado en esta investigación.

Un agradecimiento especial se extiende también a la Universidad San Francisco de Quito, porque en sus aulas, recibí el conocimiento intelectual y al Departamento de Biotecnología y Alimentos por su valiosa asistencia técnica y constructiva.

Por último, pero no menos importante, agradezco a Dios, a mi familia y amigos. Es a ellos que este trabajo está dedicado.

RESUMEN

El banano es la fruta tropical más consumida del mundo, constituye el cuarto cultivo más importante mundialmente después del arroz, el trigo y el maíz y es la base alimenticia de millones de personas en muchos países en vías de desarrollo. En Ecuador, es el primer producto agrícola de exportación y genera altos ingresos económicos. Su manejo postcosecha juega un papel fundamental para mantener la calidad del fruto. En esta investigación se evaluó el efecto de los inductores de resistencia: quitosan (CHT), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (MeJA), sobre la tolerancia al frío y prevención de daño celular en la epidermis del fruto del banano. En el estudio preliminar se utilizaron 3 concentraciones por cada inductor y se discriminó la mejor, considerando una temperatura constante (-20°C). Se sumergieron los bananos en las diferentes soluciones por 2 horas; luego de ser retirados de la inmersión, fueron sometidos al frío y se midió la conductividad eléctrica (EC) de la epidermis del fruto cada 30 minutos por 2 horas. Los tratamientos que mostraron menor EC fueron CHT 0,3 %, 3 mM SA, y 0,03 mM MeJA. Con estas concentraciones, bananos en etapa de maduración 2, según la escala de Von Loesecke, fueron sumergidos en las diferentes soluciones por 2 horas y luego sometidos a 4°C, 15°C y temperatura ambiente. Se midió la conductividad eléctrica y la acidez titulable en la epidermis del fruto a las 0, 4, 26, 168 y 360 horas. Todos los elicitores, presentaron conductividad eléctrica (EC) menor que el control a 4°C y 15°C a las 4 horas; pero, CHT fue el más resistente al frío. Por otro lado, CHT 0,3 % y SA 3 mM exhibieron menores valores de acidez titulable a las 26 horas a 4°C. A 15°C, CHT 0,3 % mostró el mejor resultado de todos los elicitores, SA 3 mM tuvo un comportamiento igual al del control y MeJA 0,03 mM ejerció el peor efecto, ya que superó al control. A temperatura ambiente no se observó ningún efecto, en ninguna de las dos variables de medición, porque la fruta no estuvo sometida a ningún tipo de estrés. La aplicación de los inductores de resistencia en la epidermis de la fruta del banano (*Musa acuminata Colla var. cavendis*) influyó en la acidez y cantidad de daño por frío en la fruta. Se evidenció que a pesar de que todos los elicitores ejercieron efecto a las diferentes temperaturas; menores valores de CE y acidez titulable fueron encontrados con CHT 0,3 % a 4°C y 15°C; por lo tanto, CHT tendría mayor utilidad y efectividad en la aplicación en banano de exportación para su mejor conservación, transporte y vida útil.

Palabras clave: quitosan, ácido salicílico, ácido jasmónico, conductividad eléctrica, acidez titulable, lesión por frío.

ABSTRACT

Banana is the most consumed tropical fruit in the world, is the fourth most important crop after rice, wheat and maize and is the staple food of millions of people in many developing countries. In Ecuador, is the first product of exportation and generates high income. Its postharvest handling plays a fundamental role in maintaining fruit quality in the exportation process. In this research the effect of inducing resistance by: chitosan (CHT), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (MeJA) on cold tolerance and prevention of cellular damage in the banana fruit epidermis was evaluated. In the preliminary study, three concentrations were used for each inducer and the best one was discriminated, considering a constant temperature (-20°C). Bananas were dipped in different solutions for 2 hours; afterwards, they were removed from the immersion and were subjected to cold temperature. Electrical conductivity (EC) was measured in the peel every 30 minutes for 2 hours. The treatments which showed lower EC were 0,3 % CHT, 3 mM SA, 0,03 mM MeJA. At these concentrations, banana ripening stage 2 (light green), according to the scale of Von Loesecke, were immersed in the different solutions for 2 hours and then were subjected to 4°C, 15°C and room temperature. Electrical conductivity and acidity at 0, 4, 26, 168 and 360 hours were measured. All elicitors CHT 0,3%, SA 3mM and MeJA 0,03 mM showed lower electrical conductivity (EC) than the control at 4°C and 15°C at 4 hours of treatment, but CHT was the best inducer of resistance to cold. At 15°C, the same results as at 4°C were obtained with CHT. As for titratable acidity, CHT 0,3% and 3 mM SA reduced ripening and exhibited lower values of this variable at 26 hours and 4°C. At 15°C, CHT 0,3% showed the best performance of all elicitors, SA 3 mM had the same behavior as the control and 0,03 mM MeJA had the lowest effect. At room temperature, no effect was observed in either of the variables; because the fruit was not subjected to any stress. The application of resistance inducer molecules in banana fruit epidermis (*Musa acuminata* Colla var. cavendis) influenced the amount of ripening and chilling injury in fruit. It was noted that, although all elicitors showed effect at different temperatures, lower values of EC and titratable acidity were found with CHT 3% at 4°C and 15°C; therefore, CHT would be the most useful and effective for banana to export and to have better conservation, transportation and shelf life.

Keywords: chitosan, salicylic acid, jasmonic acid, electrical conductivity, titratable acidity, cold injury.

Tabla de Contenido

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUCCIÓN	12
2 MATERIALES Y METODOS	18
2.1 Materia Prima.....	18
2.2 Determinación de color del banano.....	18
2.3 Acidez titulable	19
2.4 Conductividad eléctrica (Electrolyte leakage test).....	19
3 Diseño Experimental y Análisis estadístico	20
3.1 Estudio preliminar.....	20
3.2 Estudio experimental con los elicitores.....	22
4 Resultados y Discusión	25
4.1 Estudio preliminar.....	25
4.2 Estudio Experimental con los elicitores	27
4.2.1 Inducción de Resistencia al frío: Conductividad Eléctrica (EC).....	27
4.2.2 Grado de maduración: acidez titulable.....	36
5 Conclusiones	44
6 Recomendaciones.....	46
7 Referencias Bibliográficas	47
8 Anexos.....	56

8.1	Análisis de Varianza de la EC de los tratamientos en el estudio preliminar.....	56
8.2	Conductividad eléctrica (EC) en cada tratamiento del estudio preliminar.....	57
8.3	Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de la conductividad eléctrica y acidez de los tratamientos en el estudio experimental con los elicitores.....	58
8.4	Conductividad eléctrica (EC) en cada tratamiento del estudio experimental.....	59
8.5	Conductividad eléctrica (EC) del estudio experimental con los elicitores.....	60
8.6	Conductividad eléctrica (EC) del estudio experimental con los elicitores.....	61
8.7	Acidez titulable de cada tratamiento del estudio experimental con los elicitores.....	62
8.8	Acidez titulable del estudio experimental con los elicitores.....	63

Índice de Tablas

Tabla 1:	Factores del DBCA estudio preliminar con sus correspondientes niveles.....	20
Tabla 2:	Factores del DBCA estudio experimental con los elicitores con sus correspondientes niveles.....	23

Índice de Figuras

Figura 1:	Escala de Von Loesecke.....	17
Figura 2:	Procedimiento del estudio preliminar.....	22
Figura 3:	Procedimiento del Estudio Experimental con los elicitores.....	24
Figura 4:	Relación de la Conductividad Eléctrica (EC) de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo.....	26
Figura 5:	Relación de la Conductividad Eléctrica (EC) de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo, a 4°C, 15°C y temperatura ambiente, durante 360 horas.....	28

Figura 6: Conductividad Eléctrica (EC) de la epidermis del fruto del banano a las 4 y 360 horas de estar en contacto con los elicitores, a 4°C, 15°C y temperatura ambiente.....	30
Figura 7: Cambio de color de la epidermis del fruto del banano desde las 0 horas hasta las 360 horas a 4°C, 15°C y temperatura ambiente.....	32
Figura 8: Relación de la Acidez Titulable de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo, a 4°C, 15°C y temperatura ambiente, durante 360 horas.....	38
Figura 9: Acidez Titulable de la epidermis del fruto del banano a las 4 y 360 horas de estar en contacto con los elicitores, a una temperatura de 4°C, 15°C y temperatura ambiente.....	40

Índice de Abreviaturas

EC	Conductividad Eléctrica
DF	Daño por frío
CHT	Quitosan
JA	ácido jasmónico
MeJA	Metil Jasmonato
SA	Ácido Salicílico
AMB	Temperatura Ambiente

1 INTRODUCCIÓN

El banano es uno de los principales frutos, especialmente en los países en vías de desarrollo, por su alto contenido de almidón que proporciona gran energía (Dadzie y Orchard, 1997). Es plantado en todas las regiones húmedas tropicales y constituye el cuarto cultivo más importante del mundo después del arroz, el trigo y el maíz (Arias et al., 2003). El banano tiene una producción global de 95.6 millones de toneladas por año (FAO, 2010). En Ecuador, constituye el primer producto de exportación del sector privado; en el año 2009 significó un ingreso de \$ 1900 millones de dólares por concepto de divisas y alrededor de \$90 millones por concepto de impuestos al Estado. Según la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC, 2012), es uno de los primeros frutos más cultivados con alrededor de 189,383 hectáreas.

Las frutas frescas son tejidos vivos sujetos a cambios continuos después de la cosecha. Algunos de estos pueden ser deseables desde el punto de vista del consumidor, mientras que otros no. Aunque no pueden ser detenidos, pueden ser desacelerados dentro de ciertos límites. La senescencia es la etapa final del desarrollo de los órganos vegetales, ocurriendo una serie de cambios irreversibles que conducen a la desintegración y muerte de las células. Los requerimientos para maximizar la vida post cosecha varían entre los productos (Kader, 1983).

La susceptibilidad de los productos cosechados a enfermedades postcosecha aumenta por un prolongado almacenamiento, como resultado de los cambios fisiológicos y senescencia (Artés y Fernández, 1996). El banano es una fruta altamente perecible y sufre pérdidas postcosecha severas de calidad y cantidad (De Costa y Erabadupitiya, 2005).

La mayoría de las frutas que proceden de las regiones tropicales y subtropicales es sensible a bajas temperaturas (Gross et al., 2002). El banano no puede ser almacenado durante períodos prolongados a temperaturas por debajo de 12 a 14 °C debido al rápido ennegrecimiento de la cáscara y otros síntomas de daño por frío (DF), como la incapacidad de madurar y pérdida de sabor (Grierson et al., 1967). Es también un fruto climatérico, aún más proclive a sufrir DF por presentar un metabolismo muy activo con una elevada tasa respiratoria (Artés y Hernández, 2003).

La temperatura crítica a la que aparece el DF, varía de una especie a otra y puede ser de - 0,5 a 4°C para los sensibles, de 4 a 7°C para los de clima templado, y desde 8 hasta 15 e incluso 20°C para los tropicales y subtropicales (Artés y Fernández, 1996). El DF limita considerablemente la vida post-cosecha de los productos sensibles al frío, además un alto porcentaje de las pérdidas es ocasionado por este desorden.

En el DF se producen una serie de reacciones enzimáticas y las frutas pierden sus características normales (Couey, 1992). Diversas alteraciones fisiológicas, bioquímicas y disfunciones celulares se producen en respuesta a este estrés (Wang, 1982). Estas alteraciones incluyen la estimulación de la producción de etileno, aumento en la frecuencia respiratoria, interferencia en la producción de energía, aumento de la energía de activación, reducción en la fotosíntesis, inactivación de enzimas, disfunción de la membrana, y alteración de la estructura celular (Artés y Fernández, 1996).

La conductividad eléctrica mide el daño del tejido celular. La firmeza de los frutos se reduce gradualmente después de la cosecha hasta la maduración, y esta disminución se correlaciona con el aumento de la conductividad eléctrica del tejido de la fruta, lo que sugiere una pérdida gradual de la membrana celular. En frutos, la conductividad eléctrica (EC) puede servir como

un buen indicador de la permeabilidad de la membrana, firmeza y está altamente correlacionada con la producción de etileno y de ablandamiento. La EC puede ser utilizada eficazmente como un índice de madurez física y de calidad de almacenamiento (Ahmed et al., 2010).

Los alimentos, especialmente los líquidos, conducen la electricidad. A diferencia de los metales, los portadores de carga en los alimentos son iones, en lugar de electrones. La concentración y la movilidad de los iones determinan la conductividad eléctrica. Temperatura e ingredientes en los alimentos afectan a la movilidad de iones (Zhang et al., 1995).

Considerando que existen altas pérdidas económicas en frutas causadas principalmente por el DF, existe la necesidad de alternativas más seguras y viables para reducir estos daños. Entre los métodos posibles de preservación no tóxicos se encuentran el uso de ácido salicílico, jasmónico y quitosan (Asghari y Agdam, 2010).

El ácido salicílico (SA) es una hormona de la planta que inhibe la biosíntesis de etileno y retrasa la senescencia (Ozeker, 2005); participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respuesta a estrés abiótico; así como la resistencia a enfermedades. Adicionalmente, interviene de manera indirecta en el metabolismo de las plantas alterando la síntesis y señalización de otras hormonas como el ácido jasmónico, etileno y auxinas (Asghari y Agdam, 2010). La aplicación exógena de SA ha reportado retrasar la maduración de la manzana (Yan et al., 1998), banano (Srivastava y Dwivedi, 2000) y melocotón (Han et al., 2003). SA y su derivado de ácido acetilsalicílico (ASA) han demostrado inhibir la producción de etileno en células de pera (Leslie y Romani, 1988) y de células de zanahoria en cultivos en suspensión (Roustan et al., 1990). Zainuri et al. (2001) atribuyeron los efectos de SA a la inhibición de la maduración de la piel del mango.

Una de las funciones más antiguas conocidas del SA es la producción de calor en la inducción de la flor en algunas especies de angiospermas (Raskin et al., 1987). Más tarde se encontró que regula la expresión de la patogénesis relacionada con los genes de las proteínas, lo que sugiere su papel como molécula de señal, ya que provee resistencia contra ataque de patógenos (Delaney et al., 1994).

Estudios realizados en diferentes frutas y a diferentes concentraciones del elicitor indican que el SA mantiene alta firmeza y bajo DF, debido a la capacidad para inducir los sistemas antioxidantes y proteínas de choque térmico (Wang, 2006).

El ácido jasmónico (MeJA) es uno de los reguladores de crecimiento de última generación, actúa principalmente como molécula señalizadora de respuesta a numerosas situaciones de estrés tanto bióticas como abióticas. La aplicación exógena de este ácido afecta los procesos fisiológicos, morfológicos y reproductivos, entre ellos la maduración de frutos, almacenamiento de proteínas; además, regula la defensa frente a patógenos (Moreno et al., 2007). El MeJA puede modular la producción de polen viable y crecimiento de la raíz. Este compuesto modula la expresión genética a nivel de la traducción, procesamiento del ARN, y la transcripción (Creelman y Mullet, 1997). Diferentes estudios reportan que utilizando MeJA a diferentes concentraciones en frutas, retrasa el incremento en la tasa de producción del radical O_2 y el H_2O_2 , muestra actividades más altas de superóxido dismutasa, catalasa y menor actividad de lipoxigenasa (Cao et al., 2009).

El quitosán es un compuesto biodegradable derivado de la piel de camarones y crustáceos. Se ha comprobado que previene numerosas enfermedades en varias frutas y hortalizas. Es una forma diacetil de la quitina y es un antígeno con un efecto directo en la morfología de los microorganismos tratados con este compuesto, reflejando su potencial fungicida.

Estructuralmente, el quitosan es un copolímero de cadena lineal compuesto de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que se obtiene por la desacetilación parcial de la quitina. El quitosan es un biopolímero que se compone de un único monómero de glucosa (Alvarenga, 1995). Posee propiedades únicas, incluyendo la capacidad de formar películas, características estructurales ópticas, entre otras (No y Meyers, 1989).

El quitosan presenta una carga iónica positiva, lo que le da la capacidad de unirse químicamente con las grasas cargadas negativamente, lípidos y ácidos biliares (Sandford, 1992). No es tóxico, es biodegradable y biocompatible. En los últimos años, los polímeros de quitina y quitosan especialmente, han recibido mayor atención como uno de los materiales poliméricos renovables prometedores por sus amplias aplicaciones en las industrias farmacéuticas y biomédicas para la inmovilización de enzimas y purificación, en fábricas de productos químicos para tratamiento de aguas residuales, y en la industria de alimentos para formulaciones como floculante, gelificante, espesante y agente estabilizador (Knorr, 1984). Se ha convertido en el aditivo de alimentos de origen biológico más usado, debido a sus propiedades antimicrobianas y su gran capacidad para formar películas (biofilms), reduciendo la tasa respiratoria, la pérdida de humedad y la producción de etileno y poligalacturonasa en las frutas (Fai et al., 2008).

Estudios realizados en diferentes frutas, indican que el quitosan disminuye las pérdidas producidas por el DF y no afecta significativamente a la firmeza, pero aún no está claro el mecanismo que utiliza para producir tolerancia al frío (Thommohaway et al., 2007).

Existen pocos estudios realizados con respecto a la inducción de resistencia al frío en la fruta del banano, y no existen en la epidermis. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del quitosan, ácido salicílico y ácido jasmónico sobre la tolerancia al frío y prevención

de daños celulares en la epidermis del fruto del banano. Además, determinar los cambios físicos y químicos sufridos por está a 4°C, 15°C y ambiente, midiendo la conductividad eléctrica (EC) y la acidez titulable y delimitar la permanencia de la inducción de resistencia en el tiempo con cada inductor frente al estrés por frío.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Materia Prima

Banano (*Musa acuminata Colla var. cavendish*), marca Dolé (cajas de 41,5 lb), de determinado grado de maduración cosechado en Babahoyo, Ecuador. Para establecer el grado de maduración se muestreo de forma simple aleatorizada, siguiendo la Norma INEN 1750 de muestreo de frutas y hortalizas, determinándose la acidez titulable y el color de las frutas.

2.2 Determinación de color del banano

Se utilizó la escala de color de Von Loesecke (Von Loesecke, 1950), que consiste en una escala del 1 al 7 (Figura 1), siendo 1 el color de arribo del banano al laboratorio y 7 el estado completamente maduro con mejor valor nutritivo y sabor para el consumidor.

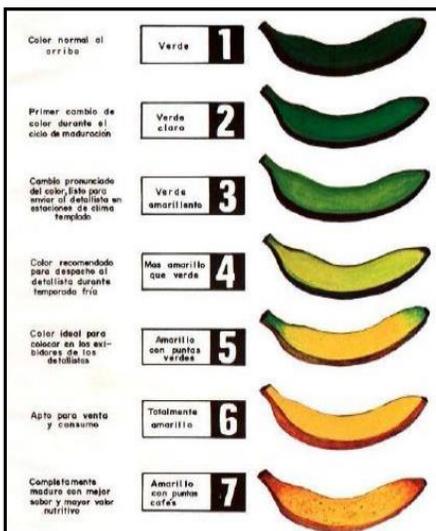


Figura 1: Escala de Von Loesecke.

Fuente: Von Loesecke, 1950.

2.3 Acidez titulable

50 g de epidermis del fruto del banano fueron licuados con 150 mL de agua destilada por 2 minutos. Se filtró la mezcla y en el filtrado fue determinada la acidez titulable utilizando NaOH estandarizado como titulante y fenolftaleína como indicador, de acuerdo al método AOAC 942.15 (AOAC, 2012).

2.4 Conductividad eléctrica (Electrolyte leakage test)

Pedazos de epidermis del fruto del banano de 1,6 cm de diámetro cortados con un sacabocados en forma de discos fueron colocados en tubos de vidrio de 13x100 mm con 10 mL de agua destilada. Fue medida la conductividad eléctrica, con un conductímetro (Jenway 4520), a las 24 horas de ser colocada la muestra en agua, siguiendo el método de Bajji et al. (2001), con modificaciones adaptadas para el banano.

3 Diseño Experimental y Análisis estadístico

3.1 Estudio preliminar

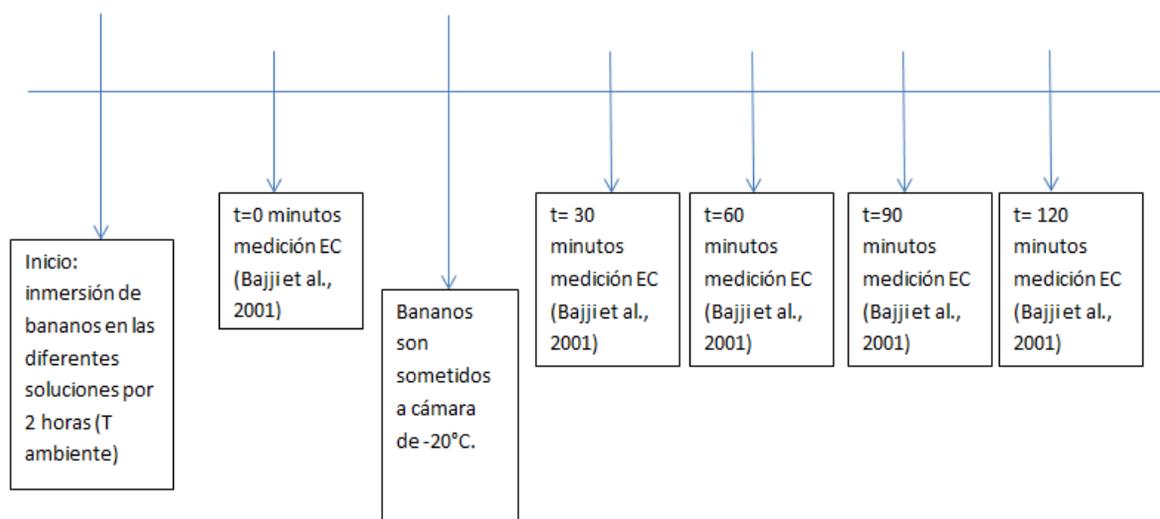
Tuvo como objetivo encontrar la mejor concentración de cada elicitador considerando una temperatura constante (-20°C). Los tratamientos fueron dispuestos en un Diseño en Bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial 3x3x5 correspondiente a la combinación de 3 factores: concentración del elicitador (3 niveles), tipo de elicitador (3 niveles) y tiempo (5 niveles). Se realizaron 5 repeticiones, dando un total de 45 tratamientos y 225 unidades experimentales, midiéndose la conductividad eléctrica (EC). Los datos fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante rango múltiple de la prueba de Tukey al 5% de probabilidad utilizando el Software IBM SPSS Statistics 19. En la Tabla 1 se presenta los factores con sus correspondientes niveles:

Tabla 1: Factores del DBCA con sus correspondientes niveles

Factores	Niveles		
1. Tipo de elicitador	Ácido Salicílico (SA)	Ácido jasmónico (MeJA)	Quitosan (CHT)
2. Concentraciones de cada elicitador	0,3 mmol	0,03 mmol	0,3%
	1,0 mmol	0,1 mmol	1%
	3,0 mmol	0,3 mmol	3%
3. Tiempos de determinación de conductividad eléctrica (minutos)	0, 30, 60, 90, 120		

Especificaciones del estudio preliminar:

- La temperatura estudiada (-20°C) fue en base a estudios realizados por Bajji et al. (2001), para discriminar rápidamente la concentración que expresó y activó los mecanismos de defensa.
- Según estudios realizados por León et al. (2009) y Zhang (2011), quitosan 1 %, 0,1 mmol de ácido jasmónico y 1 mmol de ácido salicílico, son las concentraciones óptimas para sobreexpresar o inducir los genes de defensa. Para obtener las demás concentraciones de la Tabla 1, se incrementó 3 veces más (3x) y se redujo 3 veces menos (0,33x) las encontradas en bibliografía.
- Las mediciones de la EC de la epidermis del fruto del banano fueron a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos una vez sometida a -20°C; siguiendo inicialmente el método de Bajji et al. (2001) con mediciones cada 15 minutos; sin embargo, luego del estudio preliminar se determinó que los cambios se apreciaban mejor cada 30 minutos. En la Figura 2 se presenta el procedimiento seguido.



EC: Conductividad Eléctrica

Figura 2: Procedimiento del estudio preliminar.

Para el control se siguió el mismo procedimiento de la Figura 2 solo que la inmersión fue en agua destilada. Se esperaba que la conductividad eléctrica de las muestras sumergidas en los diferentes elicitores sea menor a la del control.

3.2 Estudio experimental con los elicitores

Se utilizó la mejor concentración de cada uno de los elicitores obtenida en el estudio preliminar. Los tratamientos fueron dispuestos en un Diseño en Bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial $4 \times 3 \times 5$ correspondiente a la combinación de 3 factores: tipo de elicitor (4 niveles), temperatura (3 niveles) y tiempo (5 niveles). Se realizaron 4 repeticiones, dando un total de 60 tratamientos y 240 unidades experimentales. Se midieron las variables conductividad eléctrica (EC) y acidez titulable. Los datos fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante rango múltiple de la

prueba de Tukey al 5% de probabilidad utilizando el Software IBM SPSS Statistics 19. En la Tabla 2 se muestra los factores con sus correspondientes niveles:

Tabla 2: Factores del DBCA con sus correspondientes niveles

Factores	Niveles
1.Tipo de elicitor	3,0 mmol de Ácido Salicílico (SA)
	0,03 mmol de Ácido jasmónico (MeJA)
	0,3% Quitosan (CHT)
	Control (H ₂ O destilada)
2.Temperatura (°C)	4 °C
	15°C
	Ambiente
3.Tiempo (horas)	0, 4 , 26 , 168 y 360

Especificaciones del estudio experimental:

- Las temperaturas estudiadas fueron: 4°C, porque a esta temperatura existe daño por frío (Meir, 1996; González, 2004; Wang, 2006; Sayyari, 2009); 15°C es la temperatura a la que se realiza el transporte de exportación del banano (Grierson et al., 1967) y temperatura ambiente para observar a la fruta en su estado natural, sin ser sometida a estrés (Pieterse et al., 1999).
- Las concentraciones de los elicitores fueron las mejores encontradas en el estudio preliminar.
- Las mediciones se realizaron en diferentes tiempos: 0, 4, 26, 168 y 360 horas, porque en estudios previos, se observó cambios relevantes en estos intervalos (Bajji et al., 2001; Zhang, 2011). En la Figura 3 se observa el procedimiento seguido.

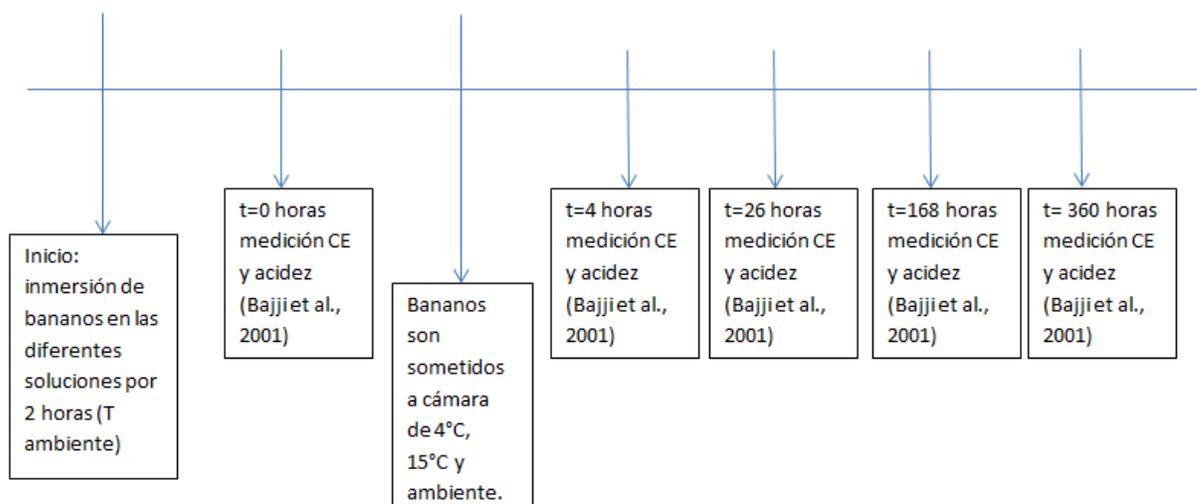


Figura 3: Procedimiento del Estudio Experimental con los elicitores.

Se esperaba que la conductividad eléctrica y la acidez titulable de las muestras sumergidas en los diferentes elicitores presentaran valores menores a los del control.

4 Resultados y Discusión

4.1 Estudio preliminar

Para demostrar el efecto de los inductores de resistencia frente a bajas temperaturas, los bananos fueron colocados en soluciones de los elicitores a diferentes concentraciones por 2 horas y luego a -20°C , por 120 minutos. La conductividad eléctrica (EC) se evaluó en la epidermis del fruto del banano cada 30 minutos. El objetivo de este estudio fue encontrar la mejor concentración de cada elicitor considerando una temperatura constante.

La Figura 4, muestra la relación de la conductividad eléctrica de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo. Quitosan 0,3 % (Figura 4a), ácido jasmónico 0,03 mM (Figura 4b) y ácido salicílico 3 mM (Figura 4c) presentaron una EC menor a la del control, mostrando menor daño en los tejidos después del tratamiento de cada elicitor.

En el Anexo 1 se observa el Análisis de Varianza (ANOVA) que indica diferencia significativa entre los tratamientos. La concentración y el tiempo influyeron en la conductividad eléctrica, tanto independientes como cuando interactuaron entre sí. El tipo de elicitor, solo influyó al actuar en combinación con los otros factores. La Figura (4abc*) muestra diferencia significativa entre los tratamientos a las 2 horas de medición, al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

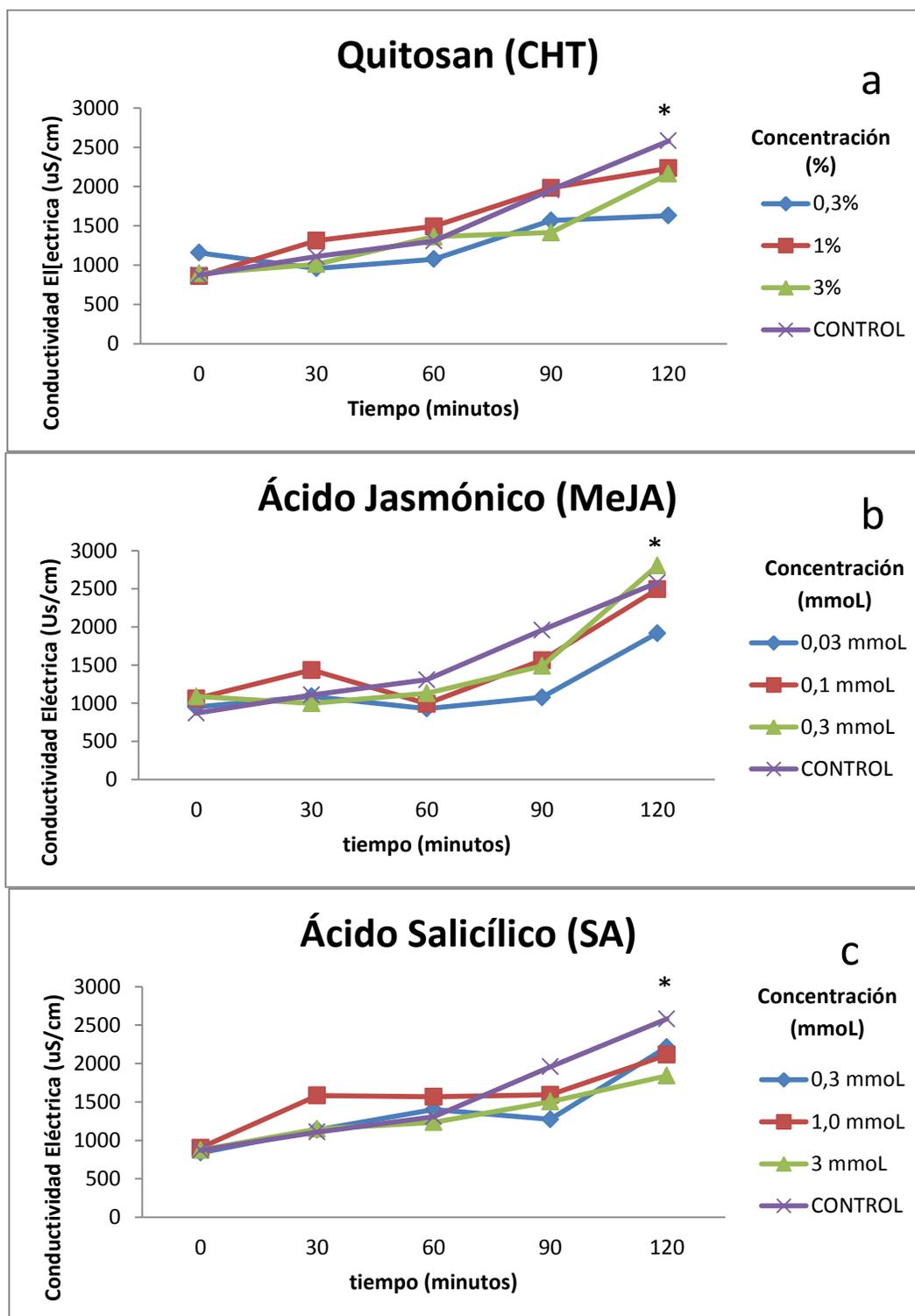


Figura 4: Relación de la Conductividad Eléctrica (EC) de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo, a diferentes concentraciones de los elicitores a una temperatura de -20°C , durante 2 horas. (*) Diferencia significativa entre los tratamientos a las 2 horas de medición, al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

4.2 Estudio Experimental con los elicitores (Inducción de resistencia al frío y grado de maduración)

4.2.1 Inducción de Resistencia al frío: Conductividad Eléctrica (EC)

Terminado el estudio preliminar, las concentraciones, quitosan 0,3 %, ácido jasmónico 0,03 mM y ácido salicílico 3 mM, fueron las óptimas para la inducción de resistencia al frío, al presentar una EC menor al control. Los bananos fueron colocados en la concentración respectiva de cada elicitor por 2 horas, y luego mantenidos a 4°C, 15°C y temperatura ambiente. La conductividad eléctrica (EC) y acidez titulable se evaluaron en la epidermis del fruto a 0, 4, 26, 168 y 360 horas. El objetivo de este estudio fue encontrar al mejor elicitor, es decir, el que presente valores menores de EC y acidez titulable que el tratamiento control.

La Figura 5, muestra la conductividad eléctrica de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo. La Figura 5a indica que a 4°C existió un efecto protector de todos los elicitores a las 4 y 26 horas, en relación al control. Con el transcurso del tiempo, la EC de los tratamientos fue aumentando hasta igualarse con el control. A 15°C (Figura 5b) solo a las 4 horas, los elicitores ejercieron tolerancia al frío, observándose que sus conductividades eléctricas fueron menores que las del control. A temperatura ambiente (Figura 5c) no se observó ninguna protección de los elicitores en la epidermis del fruto del banano, porque esta no estuvo sometida a ningún tipo de estrés. Para que el elicitor manifieste su efecto de protección, la fruta debe estar sometida a factores adversos para su desarrollo (Pieterse et al., 1999). La Figura (5ab*) indica que existió diferencia significativa entre los tratamientos a las 4 y 26 horas a 4°C; y a las 4 horas a 15°C, al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

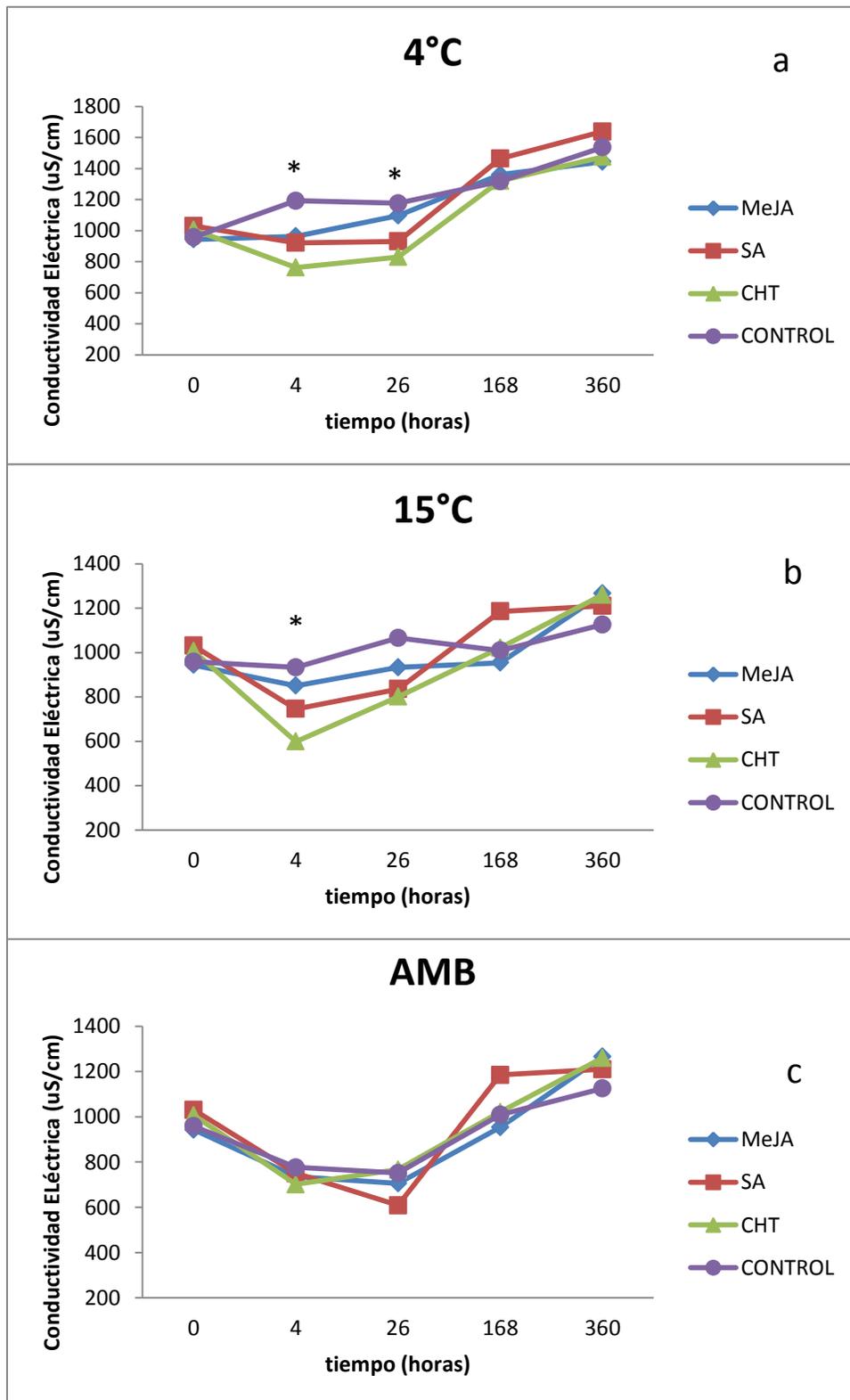


Figura 5: Relación de la Conductividad Eléctrica (EC) de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo, a 4°C (a), 15°C (b) y temperatura ambiente (c), durante 360 horas. (*) Diferencia significativa entre los tratamientos al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey. (MeJA: ácido jasmónico; SA: ácido salicílico; CHT: quitosán; AMB: temperatura ambiente).

En el Anexo 3 se presenta el Análisis de Varianza (ANOVA) existiendo diferencia significativa entre los tratamientos. El tipo de elicitor, la temperatura y el tiempo influyeron en la conductividad eléctrica, tanto independientes como cuando interactuaron entre sí. El Anexo 4 grafica la diferencia significativa entre todos los tratamientos. Para apreciar cuál fue el elicitor que ofreció mayor tolerancia al frío y su resistencia con respecto al tiempo, los resultados fueron graficados en horas como se muestra en la Figura 6. A las 4 horas de medición (Figura 6 a y c, a 4 y 15°C respectivamente), los 3 elicitores protegieron a la epidermis del fruto del banano, obteniéndose la mayor protección al frío con el CHT y la menor con el MeJA, en relación al control. A las 360 horas (Figura 6b y d), no hubo diferencia significativa entre los tratamientos (elicitores vs. control); mas si existió entre los elicitores a 4°C, el SA fue significativamente diferente del CHT y MeJA (Figura 6b) y a 15°C, SA fue diferente significativamente del CHT (Figura 6d). Desde las 4 horas (Figura 6e) hasta las 360 horas (Figura 6f) a temperatura ambiente, no existió diferencia significativa entre los tratamientos.

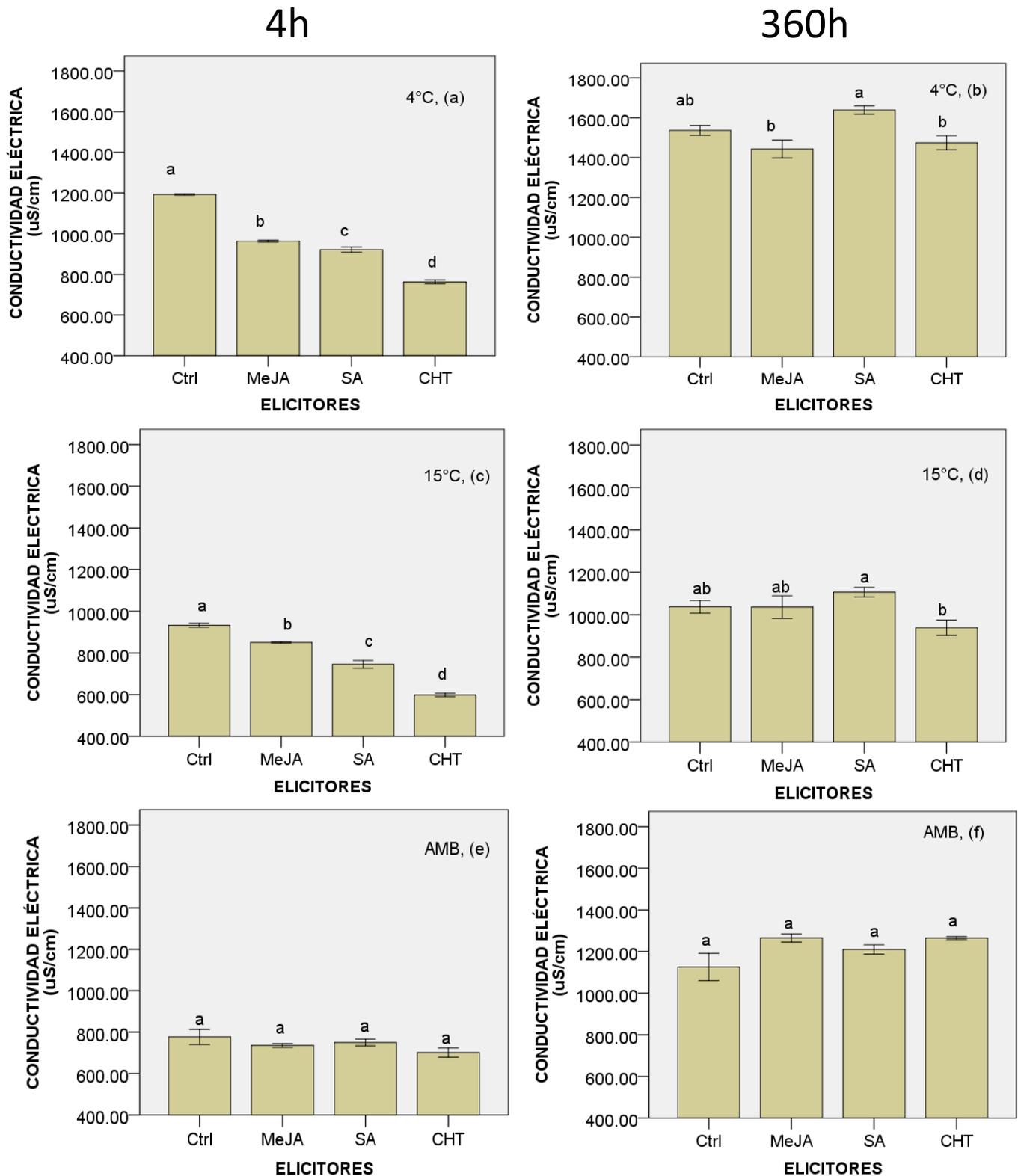


Figura 6: Conductividad Eléctrica (EC) de la epidermis del fruto del banano a las 4h de estar en contacto con los elicitores, a 4°C (a), 15°C (b) y temperatura ambiente (c); y a las 360 horas a 4°C (b), 15°C (d) y temperatura ambiente (f). Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey (MeJA: ácido jasmónico; SA: ácido salicílico; CHT: quitosán; Ctrl: control; AMB: temperatura ambiente).

A 4°C, el banano se encuentra en un estado de estrés, situación que trata de compensar para poder sobrevivir, aumentando el contenido de acetaldehído y etanol y acumulando alfa- keto ácidos en la epidermis del fruto (Artés y Artés-Hernández, 2003). Si el estrés por frío es prolongado, las alteraciones y disfunciones conducirán al desarrollo de una variedad de síntomas de daño por frío como las lesiones superficiales, decoloración interna, mal sabor y el fracaso para madurar normalmente (Saltveit y Morris, 1990).

Como muestra la Figura 5a, se produjo un daño por frío (DF) irreversible en la epidermis del fruto del banano, porque la conductividad eléctrica aumentó considerablemente después de las 26 horas de haber sido sometido a 4°C, y a partir de las 168 horas se originó pardeamiento total (Figura 7).

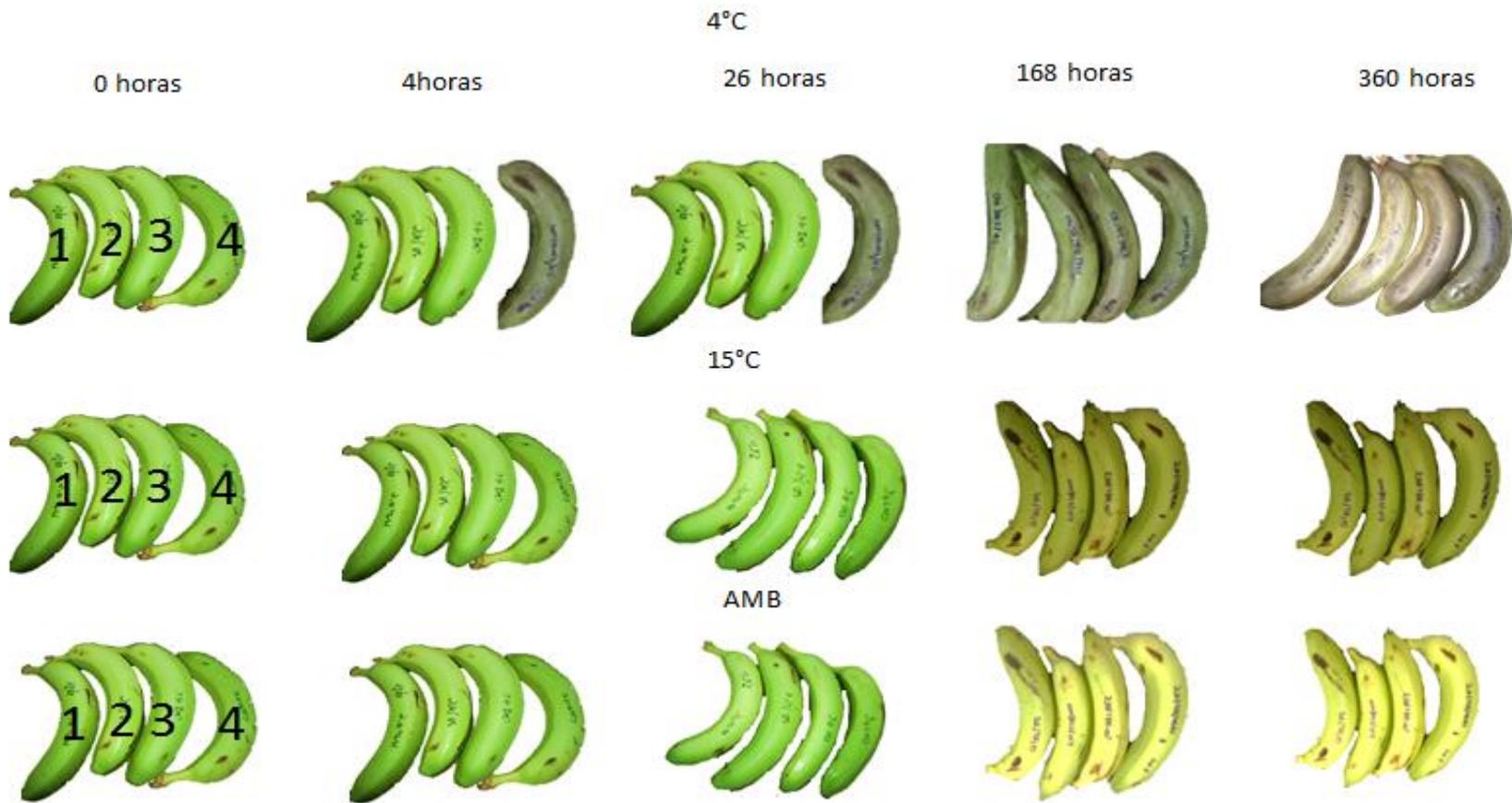


Figura 7: Cambio de color de la epidermis del fruto del banano desde las 0 horas hasta las 360 horas a 4°C, 15°C y temperatura ambiente (AMB). 1: tratamiento con MeJA, 2: tratamiento con SA, 3: tratamiento con CHT, 4: tratamiento control.

A las 4 horas de medición a 4°C (Figura 6a), los 3 elicitores protegieron a la epidermis del fruto del banano, obteniéndose el mayor efecto con el CHT, el menor con el MeJA y un efecto intermedio con el SA. Según Wang (2006) en mango (*Mangarifera anarcardiaceae*), con 1 mM de ácido salicílico (SA) se mantuvo alta firmeza y bajo DF, debido a la capacidad de SA para inducir los sistemas antioxidantes y proteínas de choque térmico. Sayyari (2009), reportó que en la fruta de granada (*Punica granatum*), la concentración de 2 mM de ácido salicílico fue muy eficaz en la reducción de DF. En el presente estudio, se utilizó una concentración de 3 mM de ácido salicílico (Figura4c) y los resultados coincidieron con los obtenidos por Wang (2006) y Sayyari (2009), apreciándose en la epidermis del fruto del banano, una misma tendencia de inducir tolerancia al frío reduciendo las lesiones. Sin embargo, este efecto se presentó solo hasta las 26 horas de estar sometida a 4°C (Figura 5a), observándose a partir de este punto un daño irreversible con un pardeamiento total.

Meir et al. (1996), obtuvieron una reducción en el DF realizando una inmersión de aguacate Hass (*Persea americana*) en MeJA 2,5 M, aguacate Etinger (*Persea americana*) en MeJA 10 M y pimiento rojo (*Capsicum annuum*) en MeJA 25 M. González et al. (2004) observaron que en la guaba (*Inga edulis*) concentraciones de 0,1 mM y 0,01 mM de ácido jasmónico redujeron el DF en la fruta. Cao et al. (2009), reportaron que utilizando una concentración de MeJA de 10 $\mu\text{mol/l}$ en la fruta loquat (*Eriobotrya japónica*) se retrasó el incremento en la tasa de producción del radical O_2 y el contenido de H_2O_2 . Podría ser entonces que el MeJA medie la respuesta natural de la planta a diferentes tipos de estrés, y mediante su aplicación reduzca las lesiones en los tejidos por bajas temperaturas. Con la epidermis del fruto del banano, se utilizó una concentración de 0,03 mM de ácido jasmónico y los resultados coincidieron con los de

Meir (1996), González (2004) y Cao (2009) observándose reducción del DF; sin embargo, fue el elicitador que mostró el menor efecto protector a 4°C.

Según Thommohaway et al. (2007), quitosan a concentraciones de 0,05, 0,1 y 0,2 % retrasó la pérdida de peso y redujo sólidos solubles totales en guaba (*Inga edulis*), sin afectar significativamente la firmeza. Aún no está claro el mecanismo que emplea el quitosan para producir tolerancia al frío. En esta investigación, se utilizó una concentración de 0,3 % de quitosan y los resultados coincidieron con los obtenidos por Thommohaway (2007), induciendo tolerancia al frío reduciendo las lesiones.

La temperatura de 15°C usada en esta investigación, es un tipo de control, para poder observar el comportamiento natural del banano, fruto que se transporta alrededor de 12 a 14°C (Grierson et al., 1967). Solo a las 4 horas de medición a 15°C (Figura 6c), los 3 elicitores protegieron a la epidermis del fruto del banano, obteniéndose el mayor efecto con el CHT, el menor con el MeJA y un efecto intermedio con el SA.

Según Asgar et al. (2011), en estudios realizados con papaya (*Carica papaya*) a 12°C, el quitosan mantuvo la firmeza y retrasó los cambios de color durante 5 semanas de almacenamiento. En este estudio, los resultados coincidieron con lo reportado por Asgar (2011), conservándose menores valores de CE en la epidermis del fruto del banano con la aplicación de este elicitador.

Según González (2004), el MeJA redujo el deterioro y maduración en calabacín (*Curcubita pepo*), mango (*Mangarifera anarcardiaceae*), aguacate (*Persea americana*), y papaya (*Carica papaya*), sin embargo en la epidermis del fruto del banano fue el elicitador que menor efecto tuvo a 15°C.

A temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) el daño en la epidermis del fruto del banano observado, es propio de la maduración, porque no se encuentra sometido a ningún tipo de estrés, y no existió diferencia significativa entre los tratamientos a ninguna de las horas medidas (Figura 5c). La aplicación de los elicitores no se justificaría a esta temperatura a los tiempos experimentados (Figura 6 e y f).

4.2.2 Grado de maduración: acidez titulable

El estado de madurez que poseen los productos al ser cosechados, es especialmente importante para su manejo, transporte y comercialización repercutiendo directamente en su calidad. La acidez es un importante indicador de la maduración y calidad organoléptica en las frutas, debido a la presencia de los ácidos málico y cítrico, que son los principales ácidos orgánicos encontrados en las frutas maduras (López, 2003; Etienne et al., 2013). El ácido orgánico predominante en las frutas maduras varía entre especies, en el banano se observan diferencias de la acidez total o en el equilibrio de ácidos orgánicos (Etienne et al., 2013). En la pulpa del banano, la cantidad total de ácido aumenta durante la maduración, los principales ácidos que la componen son: ácido málico, cítrico y oxálico. Mientras que los dos primeros ácidos son responsables de la acidez en el banano inmaduro, el ácido oxálico contribuye al sabor astringente de la fruta (Seymour, 1997). Cuando la fruta madura, el ácido oxálico se reduce y, el sabor cambia a un sabor dulce, principalmente del azúcar hidrolizada de la degradación del almidón (Siriboon y Banlusilp, 2004). En este estudio se observó que la epidermis del fruto del banano mostró el mismo comportamiento que la acidez de la pulpa.

La Figura 8, muestra la acidez de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo. A 4°C existió un efecto reductor de la maduración de los tratamientos SA y CHT a las 26 horas, observándose valores menores de acidez, en relación al control (Figura 8a). Con el transcurso del tiempo, la acidez de los tratamientos fue aumentando hasta igualarse con el control. A 15°C (Figura 8b) a las 26 horas solo el quitosan mostró valores menores que el control. Después de las 26 horas este efecto no se apreció más. A temperatura ambiente (Figura 8c) no se observó ningún efecto de los elicitores en la epidermis del fruto del banano, porque esta no estuvo sometida a ningún tipo de estrés. La Figura (8ab*) evidencia que existió diferencia significativa entre los tratamientos a las 26 horas a 4°C y 15°C, al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

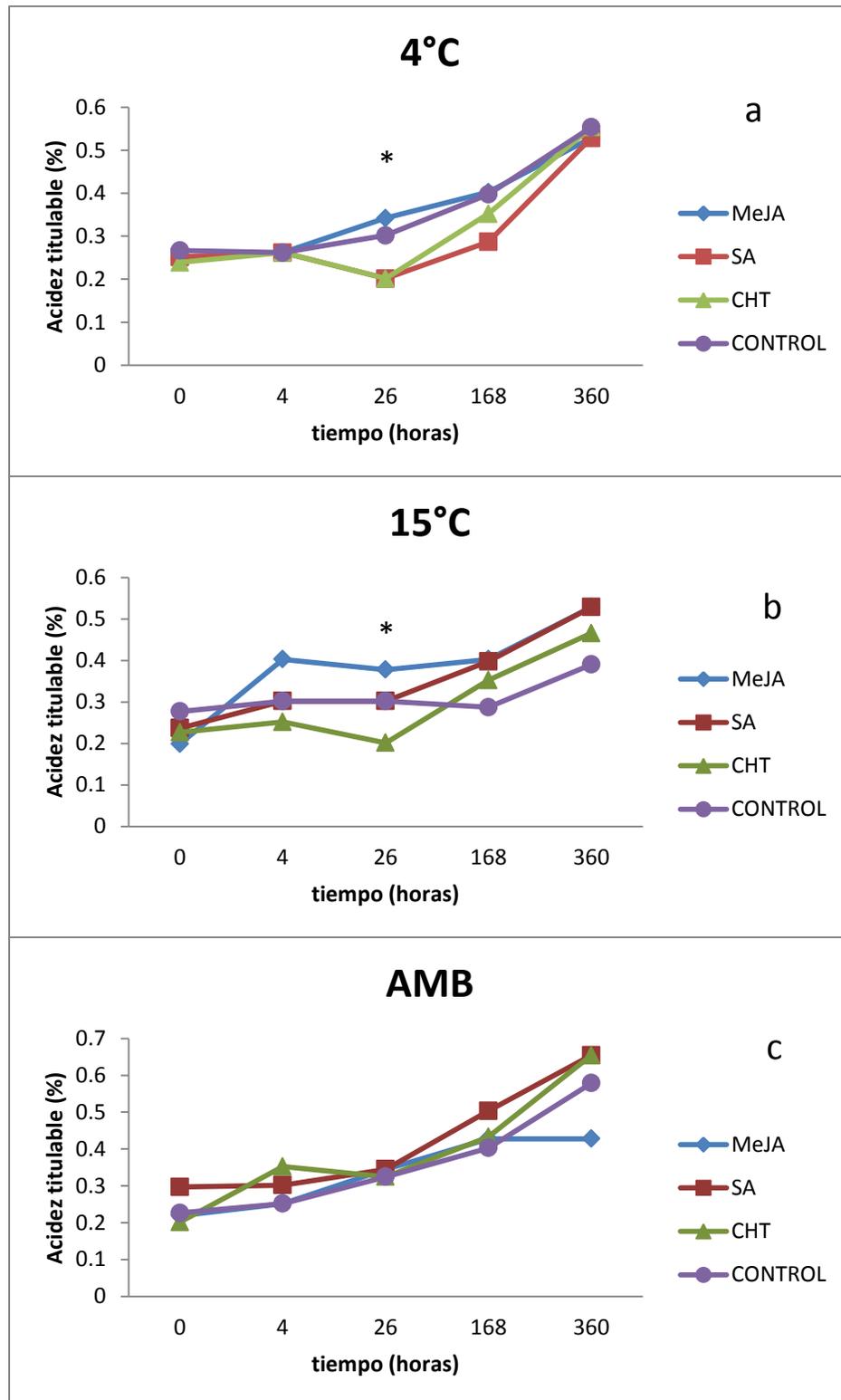


Figura 8: Relación de la Acidez Titulable de la epidermis del fruto del banano en función del tiempo, a 4°C (a), 15°C (b) y temperatura ambiente (c), durante 360 horas. (*) Diferencia significativa entre los tratamientos al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey (MeJA: ácido jasmónico; SA: ácido salicílico; CHT: quitosán; AMB: temperatura ambiente). Acidez expresada en ácido málico.

Según el análisis de varianza (ANOVA) existió diferencia significativa entre los tratamientos para la acidez titulable (Anexo3). La temperatura y el tiempo influyeron en esta variable cuando actuaron independientemente, no en su interacción. El tipo de elicitador solo afectó a la acidez titulable al interactuar con la temperatura. El Anexo 7 grafica la diferencia significativa entre todos los tratamientos. Para apreciar cuál fue el elicitador que provocó menores valores de acidez titulable y la permanencia de la inducción en el tiempo, los resultados fueron graficados en horas como se indica en la Figura 9. A las 26 horas de medición (Figura 9a) a 4°C, todos los elicitadores fueron diferentes significativamente al control, siendo el CHT y SA, los que mostraron menores valores de acidez, sin diferencia significativa entre estos y el MeJA no ejerció ningún efecto, comportándose peor que el control. A 15°C (Figura 9c), el CHT evidenció un mayor efecto (más resistencia) en relación al control con diferencia significativa, los otros dos elicitadores no ejercieron efecto sobre la epidermis del fruto del banano, porque el SA se comportó significativamente igual al control y el MeJA tuvo un comportamiento peor a este. A las 360 horas, a 4 y 15°C respectivamente (Figura 9 b y d), no existió diferencia significativa entre los tratamientos. Desde las 26 horas (Figura 9e) hasta las 360 horas (Figura 9f) de medición a temperatura ambiente, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos.

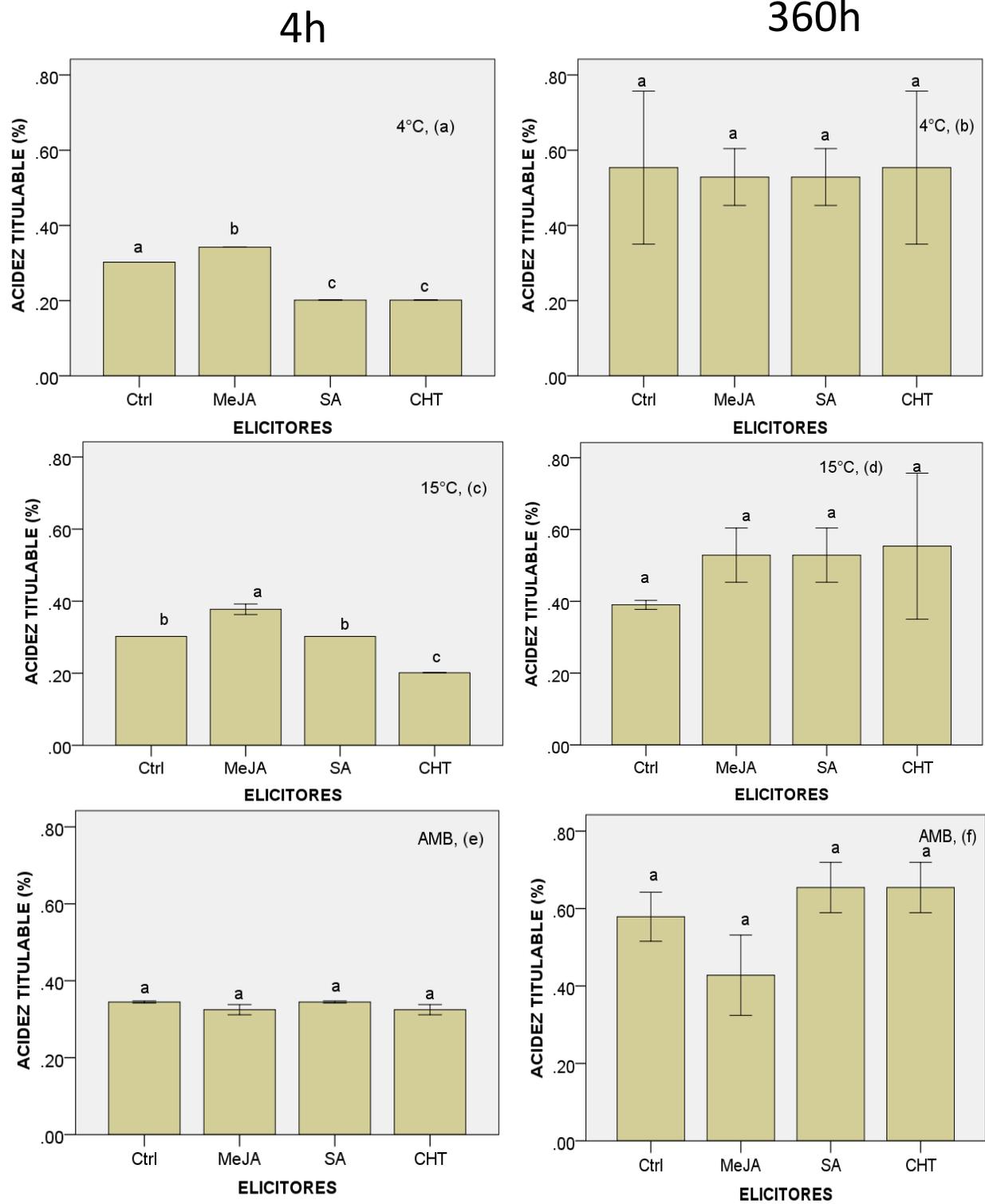


Figura 9: Acidez Titulable de la epidermis del fruto del banano a las 4h de estar en contacto con los elicitores, a una temperatura de 4°C (a), 15°C (b) y temperatura ambiente (c); y a las 360 horas a 4°C (b), 15°C (d) y temperatura ambiente (f). Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey. (MeJA: ácido jasmónico; SA: ácido salicílico; CHT: quitosán; Ctrl: control; AMB: temperatura ambiente). Acidez expresada en ácido málico.

A 4°C, la acidez se vio afectada por el DF, observándose irregularidad en la maduración y el pardeamiento de la epidermis del fruto del banano fue irreversible (Figura 7).

La acidez aumentó considerablemente en la epidermis del fruto del banano a partir de las 26 horas de haber sido sometida a 4°C (Figura 8a). El CHT y SA indujeron valores menores de acidez a esta hora de medición (Figura 9a).

Según Srivastava (2000), las actividades de las principales enzimas degradadoras de paredes celulares, celulasa, poligalacturonasa y xilanasa bajaron en presencia del ácido salicílico durante la maduración del banano, al igual que los principales antioxidantes enzimáticos como la catalasa y la peroxidasa. Zhang (2003) afirmó que, la aplicación de SA retrasó la maduración de mango (*Mangarifera anarcardiaceae*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) probablemente a través de la inhibición de la biosíntesis de etileno. Adicionalmente, Duan et al. (2007) encontraron que el tratamiento con SA en post-cosecha de cerezas (*Prunus cerasus*) causó la disminución de acidez de la fruta y menor infección por hongos. Estudios realizados en manzana (*Annona squamosa L.*) indican que SA acortó la producción del radical libre O₂ y el etileno observándose una reducción en la maduración (Gong et al., 2008). Huang (2008), en su estudio en naranja (*Citrus sinensis*) encontró que la baja temperatura de almacenamiento y la aplicación exógena de SA redujeron la peroxidación de lípidos, regulando y manteniendo así el sistema antioxidante beneficioso para el almacenamiento disminuyendo la senescencia. SA prolongó la vida de almacenamiento de diversas frutas, como bananos (*Musa paradisiaca*) y melocotones (*Prunus Persica*) (Mo et al., 2008). En este estudio, los resultados coincidieron con los obtenidos por Srivastava (2000), Zhang (2003), Duan (2007), Gong (2008), Huang (2008) y Mo (2008), mostrándose en la Figura 8a, una reducción de la senescencia con la

aplicación de SA. Sin embargo, el efecto solo se observó a las 26 horas de estar sometido a 4°C.

Según González (2004), el MeJA redujo el deterioro y maduración en calabacín (*Curcubita pepo*), mango (*Mangarifera anarcardiaceae*), aguacate (*Persea americana*), y papaya (*Carica papaya*). En la epidermis del fruto del banano, este elicitor aumentó el porcentaje de acidez a medida que pasó el tiempo, provocando mayor daño que el control (Figura 8a y 9a), por lo que no se justificaría su aplicación.

El quitosán puede formar una capa semipermeable, que modifica la atmósfera interna del tejido y consecuentemente retarda la maduración (Bai et al., 1988). Según, Ghaouth (1992) el recubrir el tomate (*Solanum lycopersicum*) con soluciones de 1 % y 2 % de quitosán disminuyó la tasa de respiración y la producción de etileno, obteniéndose mejores resultados con 2 %. Según, Ghaouth (2007) recubrir pimiento (*Capsicum annum*) y pepino (*Cucumis sativus*) con una concentración de quitosán de 1,0 y 1,5% p/v acortó notablemente la pérdida de peso, la tasa de respiración, pérdida de color, marchitamiento y la infección micótica. En esta investigación, usando una concentración de 0,3 % CHT (Figura 8a), se observó efectos similares a los obtenidos por Bai (1988), Ghaouth (1992) y Ghaouth (2007), obteniendo menores valores de acidez que podrían retardar la maduración.

A 15°C, el CHT mostró valores menores de acidez a las 26 horas de medición (Figura 9c) coincidiendo con Asgar et al. (2011), que en estudios realizados con papaya (*Carica papaya*) a 12°C, el CHT redujo la pérdida de agua y la acidez durante 5 semanas de almacenamiento.

Tratamientos con ácido salicílico alrededor de 15°C mostraron buenos resultados en el retraso de la maduración de tomate (*Solanum lycopersicum*), cereza dulce (*Prunus cerasus*), fresa (*Fragaria vesca*), espárragos (*Asparragus officinalis*) y Haward Kiwi (*Actinidia chinensis*)

(Ali, 2013). A esta temperatura, el SA tuvo sobre la acidez en la epidermis del banano el mismo efecto que el control; el CHT fue el que mostró mayor efecto y el MeJA el peor, ya que, la acidez fue mayor que la del control (Figura 9c). No se justificaría la aplicación de SA y MeJA a esta temperatura.

A temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$), la acidez que se observó en la epidermis del fruto del banano es propia de la maduración, ya que no estuvo sometido a ningún tipo de estrés y por tanto, no existió diferencia significativa entre los tratamientos a ninguna de las horas de medición (Figura 8c). La aplicación de los elicitors no se justificaría a esta temperatura a ninguno de los tiempos (Figura 9 e y f).

5 Conclusiones

La epidermis del fruto del banano (*Musa acuminata Colla var. cavendish*) pretratada con moléculas inductoras de resistencia mostró menores valores de CE y de acidez titulable en diferentes mediciones. Todos los elicitores CHT 0,3 %, SA 3 mM y MeJA 0,03 mM presentaron una conductividad eléctrica (CE) menor que el control, pero el CHT fue el que presentó mayor resistencia al frío a 4°C y 15°C a las 4 horas de medición. En cuanto a la acidez titulable, CHT 0,3 % y SA 3 mM redujeron la maduración y presentaron menores valores de esta variable a las 26 horas de medición a 4°C. A 15°C, CHT 0,3 % mostró el mejor comportamiento de todos los elicitores, SA 3mM tuvo un efecto igual al del control y MeJA 0,03mM ejerció el peor efecto ya que la acidez titulable fue mayor que la del control. A temperatura ambiente no se observó ningún efecto, en ninguna de las dos variables en medición, porque la fruta no estuvo sometida a ningún tipo de estrés.

El tratamiento con metil jasmonato (MeJA) en la concentración utilizada, otorgo niveles altos de acidez titulable y niveles bajos de recuperación en cuanto a conductividad eléctrica, habiendo compartido el rango estadístico (Figura 6 a y c) e incluso superando al control (Figura 9 a y c). Además, obtuvo menores niveles de recuperación que SA. Al respecto, es extensamente conocido que las aplicaciones exógenas de MeJA activan la vía metabólica de defensa conocida como del JA y por lo tanto de defensa contra insectos (Truman et al., 2007; Koornneef et al., 2008), el mismo que a la vez antagoniza con la vía del SA (León-Reyes et al., 2010), lo cual sugiere que, la vía del SA parece ser la vía de defensa metabólica involucrada con el estrés hídrico.

La aplicación de los inductores de resistencia en la epidermis del fruto del banano (*Musa acuminata Colla var. cavendish*) influyó en la maduración y cantidad de daño en la fruta provocado por el frío. Se halló menores valores de CE y acidez titulable con el CHT 3 % a 4°C y 15°C. Este elicitor forma una capa semipermeable que modifica la atmósfera interna del tejido y consecuentemente retarda la maduración y por lo tanto, fue el que presentó mayor efectividad y resistencia. El tratamiento con base de quitosán (CHT), mostró mayor efecto de recuperación cuando se lo comparó con el testigo, habiéndose registrado su mayor expresión con la dosis de 0,3 % (Figura 4), mientras que, las concentraciones más altas (1 % y 3 %) disminuyeron su efectividad debido al probable efecto de fitotoxicidad.

Se produjeron cambios físicos a partir de las 168 horas, observándose un pardeamiento irreversible en la cáscara sometida a 4°C. A 15°C y temperatura ambiente el cambio de color fue el esperado en el proceso de maduración del plátano según la escala de Von Loesecke (Figura 7).

6 Recomendaciones

Aplicar MeJA a manera de vapor (Chang et al., 2002), ya que en estudios con mango se redujo los síntomas del DF y el desarrollo del color de la piel mejoró (González et al., 2001).

Realizar mediciones cada 6 horas a partir de las 26, para determinar hasta qué punto se puede inducir la tolerancia al frío usando los elicitores sin observar pardeamiento.

Como se observó que las concentraciones utilizadas en este estudio solo mostraron un efecto hasta las 26 horas, se recomienda realizar un mayor tiempo de inmersión, y aumentar la concentración de los elicitores hasta un punto en donde no expresen fitotoxicidad y se mejoren los resultados.

Mezclar el quitosan con ácido ascórbico para inhibir el efecto del pardeamiento y mantener la integridad de la membrana (Sun, 2010).

Estudios realizados en Litchi indican que 1000 mg/L de quitosan combinados con 50 mg/L de ácido salicílico, muestran mejor tolerancia al frío y sufren menos daños (GuangWen et al., 2011), por lo tanto, se recomienda mezclar quitosan con ácido salicílico y aplicarlo a la epidermis del fruto del banano.

Continuar realizando investigaciones sobre la permanencia de los inductores con diferentes frutas para obtener más evidencias de sus efectos.

Realizar cuantificación de acetaldehído que es exclusivo para indicar daño tisular por frío.

7 Referencias Bibliográficas

- Ahmed, D., Yousef, A., & Hassan, H. (2010). Relationship between electrical conductivity, softening and color of Fuerte avocado fruits during ripening. *Agricultural and Biology Journal of North America*, 2151-7525.
- Ali, S., Masud, T., Abbasi, K., Mahmood, T., & Ali, A. (2013). Effect of Different Concentrations of Salicylic Acid on Keeping Quality of Apricot cv. Habi at Ambient Storage. *Journal of Biology and Food Science Research*, 2, 69- 78.
- AOAC Official Method 942.15. Acidity (Titratable) of Fruit Products. Official method of Analysis of AOAC International, ed. 18, 2012, Cap. 37, p.10.
- Alvarenga, E. (1995). Characterization and properties of chitosan. *Biotechnology of biopolymers*, 92 104.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., & Pilkauskas, P. (2003). The world banana economy. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Artés, F., & Fernández, J. (1996). Recent studies on postharvest behaviour of peaches. *Research Development Agricultural Food Chemistry*, 3, 471-487.
- Artés, F., & Artés- Hernández, F. (2003). Daños por frío en la postrecolección de frutas y hortalizas. *Avances en Ciencias y Técnicas del Frío*, 1, 299- 310.
- Asgar, A., Muhammad, M., Sijam, K., & Siddiqui, Y. (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya L*) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 124, 620-626.

- Asghari, M., & Aghdam, M. (2010). Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science and Technology*, *21*, 502–509.
- Bai, R., Huang, M., & Jiang, Y. (1988). Selective permeabilities of chitosan-acetic acid complex membrane and chitosan-polymer complex membranes for oxygen and carbon dioxide. *Polymer Bulletin*, *20*, 83-88.
- Bajji, M., Kinet, J., & Lutts, S. (2001). The use of the Electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 1-10.
- Cao, S., Zheng, Y., & Rui, H. (2009). Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chemistry*, *115*, 1458-1463.
- Chien, P., Sheu, F., & Lin, H. (2007). Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry*, *100*, 1160–1164.
- Come, D., & Corbineau, F. (1994). Effects cellulaires et metaboliques du froid sur les produits végétaux. *Institute International du Froid Brest*, *5*, 17-28.
- Cortés, H., Barrios, P., Dorta, F., Polanco, V., Sánchez, C., Sánchez, E., & Ramírez, I. (2005). Involvement of Jasmonic Acid and Derivatives in Plant Responses to Pathogens and Insects and in Fruit Ripening. *Plant and Growth Regulation*, *23*, 246-260.
- Couey, H. (1982). Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. *Horticultural Science*, *17*, 162- 165.
- Creelman, R., & Mullet, J. (1997). Biosynthesis and action of jasmonatos in plants. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *48*, 355-381.

- Dadzie, B., & Orchard, J. (1997). Routine Post-harvest screening of banana/plantain hybrids criteria and methods. International network for banana and plantain (INIBIAP): Italy: 75-76.
- De Costa, D., & Erabadupitiya, H. (2005). An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology*, *36*, 31-39.
- Delaney, T., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., & Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, *266*, 1247- 1250.
- Ding, C., Wang, C., & Gross, K. (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis- related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, *214*, 895- 901.
- Duan, X., Su, X., Yanli, Y., Qu, H., Li, Y., & Jiang, Y. (2007). Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan Fruit in relation to phenolic metabolism. *Food Chemistry*, *104*, 571-576.
- ESPAC. 2012. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua.
- Etienne, A., Génard, M., Bancel, D., Benoit, & S., Bugaud, C. (2013). A model approach revealed the relationship between banana pulp acidity and composition during growth and post-harvest ripening. *Scientia Horticulturae*, *162*, 125-134.
- Fai, A., Montenegro, T., & Montenegro, L. (2008). Potencial Biotecnológico de quitosana em sistemas de conservacao de alimentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, *9*, 435-451.
- FAO. (2010). Statistics Division of Crops production. <http://faostat.fao.org>. Last accessed. 24/09/2013.

- FAO. (1993). Prevención de pérdidas de alimentos postcosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos. <http://www.fao.org/docrep/t0073s/T0073S00.htm#Contents>. Last accessed. 24/09/2013.
- Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., & Boulet, M. (2007). Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *Food Processing and Preservation*, *15*, 359- 368.
- Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., & Arul, J. (1992). Chitosan Coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience*, *27*, 1016-1018.
- González, G., Tiznado, M., Zavaleta, R., & Martinez, M. (2004). Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava Fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*, 694-701.
- González, G., Buta, J., & Wang, C. (2001). Methyl jasmonate reduces chilling injury symptoms and enhances colour development on Kent mangoes. *Science of Food and Agriculture*, *81*, 1244-1249.
- Grierson, E., Grierson, W., & Soule, J. (1967). Chilling injury in tropical fruit. I. Bananas (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* cv. *Lacatan*). *HortScience*, *11*, 82-94.
- Gross, K., Wang, C., & Saltveit, M. (2002). The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Crops. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html>. Last accessed. 25/10/2013.
- GuangWen, Z., Tian, Z., & Shi, Y. (2011). Effects of chitosan and salicylic acid on cold resistance of litchi under low temperature. *Agricultural Science and Technology*, *12*, 26-29.
- Hardenburg, R., Watada, R., & Yang, C. (1990). The commercial storage of fruits vegetables and florist and nursery stocks. *Agricultural Handbook 66*. Ed. USDA: Washington, 130.

- Huang, R., Liu, J., & Xia, R. (2008). Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of “Cara Cara” navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 168- 175.
- Kader, A. (1983). Postharvest quality maintenance of fruits and vegetables in developing countries. In *Postharvest physiology and crop preservation*, New York: Plenum.
- Knorr, D. (1984). Use of chitinous polymers in food- A challenge for food research and development. *Food Technology*, 38, 85-97.
- Koorneef, A., Pieterse, C. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146 (3), 839-844.
- León, A., Spoel, S., De Lange, E., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., Millenaar, F., Welschen, R., Ritsema, T., & Pieterse, C. (2009). “Ethylene Modulates the Role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in Cross Talk between Salicylate and Jasmonate Signaling”. *Plant Physiology*, 4, 1797- 1809.
- Leslie, C., & Romani, R. (1988). Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. *Plant Physiology*, 88, 833-837.
- López, A. Manual para la preparación y venta de frutas. Boletín de servicios agrícolas de la FAO 151: Argentina, 2003. <http://www.fao.org/docrep/006/y4893s/y4893s00.htm#Contents>. Last accessed. 24/09/2013.
- López, H., Dat, J., Foyer, C., & Scott, I. (1998). Tolerance to low temperature, induced by salicylic acid and hydrogen peroxide in potato microplants. *Experimental Botany*, 49, 713-720.
- Marcellin, P., & Ulrich, R. (1983). Comportement des Fruits et légumes en conditions modules et programées. *International Journal of Refrigeration*, 6, 329- 336.

- Meir, S., Philosoph, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Cohen, E., & Fuchs, Y. (1996). Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Canadian Journal of Botany*, 74(6), 870-874.
- Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J., & Li, W. (2008). Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *Science of Food and Agriculture*, 88, 2693- 2699.
- Moreno, A., Arzola, M., Barbarita, C., González, M., Pino, Y., Aragón, C., Pina, D., Michelena, G., & González, J. (2007). Efectos del ácido jasmónico, interacción plátano-*Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 en condiciones de aclimatización. UTEQ.
- No, H., & Meyers, S. (1989). Crawfish Chitosan as a Coagulant in Recovery of Organic Compounds from Seafood Processing Streams. *Food Chemistry*, 37(3), 580-583.
- Ozeker, E. (2005). Salicylic acid and its effects on plants. *Journal of Agriculture*, 42(1), 213-223.
- Pieterse, C., & Van Loon, L. (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science* 4(2), 52-58.
- Raskin, A., Ehmann, A., Melander, W., & Meeuse, B. (1987). Salicylic acid: a natural inducer of heat production in Arum Lillies. *Science*, 237, 1601–1602.
- Raskin, A. (1992). Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology*, 99, 799–803.
- Roustan, J., Latché, A., & Fallot, J. (1990). Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. *Biology Plant*, 32, 273-275.

- Saltveit, M. (1999). Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 279-292.
- Sandford, P. (1992). High purity chitosan and alginate: Preparation, analysis, and applications. *Carbohydrates Research*, 2, 250-269.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Serrano, M., & Valero, D. (2009). Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stores pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 152- 154.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., & Dixon, K. (2000). Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*, 30, 157- 161.
- Srivastava, M., & Dwivedi, U. (2000). Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science*, 158, 87-96.
- Seymour, G. (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 Physiology* 115, 453–461.
- Siriboon, N., & Banlulsilp, P. (2004). A Study on the Ripening Process of “Namwa” Banana. http://www.journal.au.edu/au_techno/2004/apr04/vol7num4_article02.pdf. Last accessed. 1/04/2014.
- Sun, D., Liang, G., Xie, J., Lei, X., & Mo, Y. (2010). Improved preservation effects of litchi fruit by combining chitosan coating with ascorbic acid treatment during postharvest storage. *African Journal of Biotechnology*, 9(22), 3272-3279.

- Thommohaway, C., Kanlayanarat, S., Uthairatanakij, A., & Jitareerat, P. (2007). Quality of fresh-cut guava (*Psidium Guajava L.*) as affected by chitosan treatment. *Acta Horticulture*, 746, 449-55.
- Truman, W., Bennett, I., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., Grant, M. (2007). Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(3), 1075- 80.
- Von Loesecke, H. (1950). Bananas. 2nd ed. Interscience, New York.
- Wang, C. (1982). Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *HortScience*, 17,173–186.
- Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., & Archbold, D. (2006). Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 244-251.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., & Tang, Y. (2011). Effect of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum L.*). *Food Chemistry*, 124, 1443- 1450.
- Yan, T., Shen, J., & Liu, C. (1998). Effects of salicylic acid on ripening fruits. *Chinese Bull of Botanic*, 15(3), 61-64.
- Zainuri, D., Wearing, A., Coates, L., & Terry, L. (2001). Effects of phosphonate and salicylic acid treatments on anthracnose disease development and ripening of ‘Kensington Pride’ mango fruit. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41, 805-813
- Zhang, H., Li, R., & Liu, W. (2013). Effects Chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of Fruits: a review. *International Journal of Molecular Science*, 12, 917-934.

Zhang, Q., Barbosa, G., & Swanson, B. (1995). Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Food Engineering*, 25, 261- 281.

Zhang, Y., Chen, K., Zhang, S., & Ferguson, I. (2003). Effects of Acetylsalicylic Acid (ASA) and Ethylene Treatments on Ripening and Softening of Postharvest Kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 67-74.

8 Anexos

8.1 Análisis de Varianza (ANOVA) de la conductividad eléctrica de los tratamientos en el estudio preliminar.

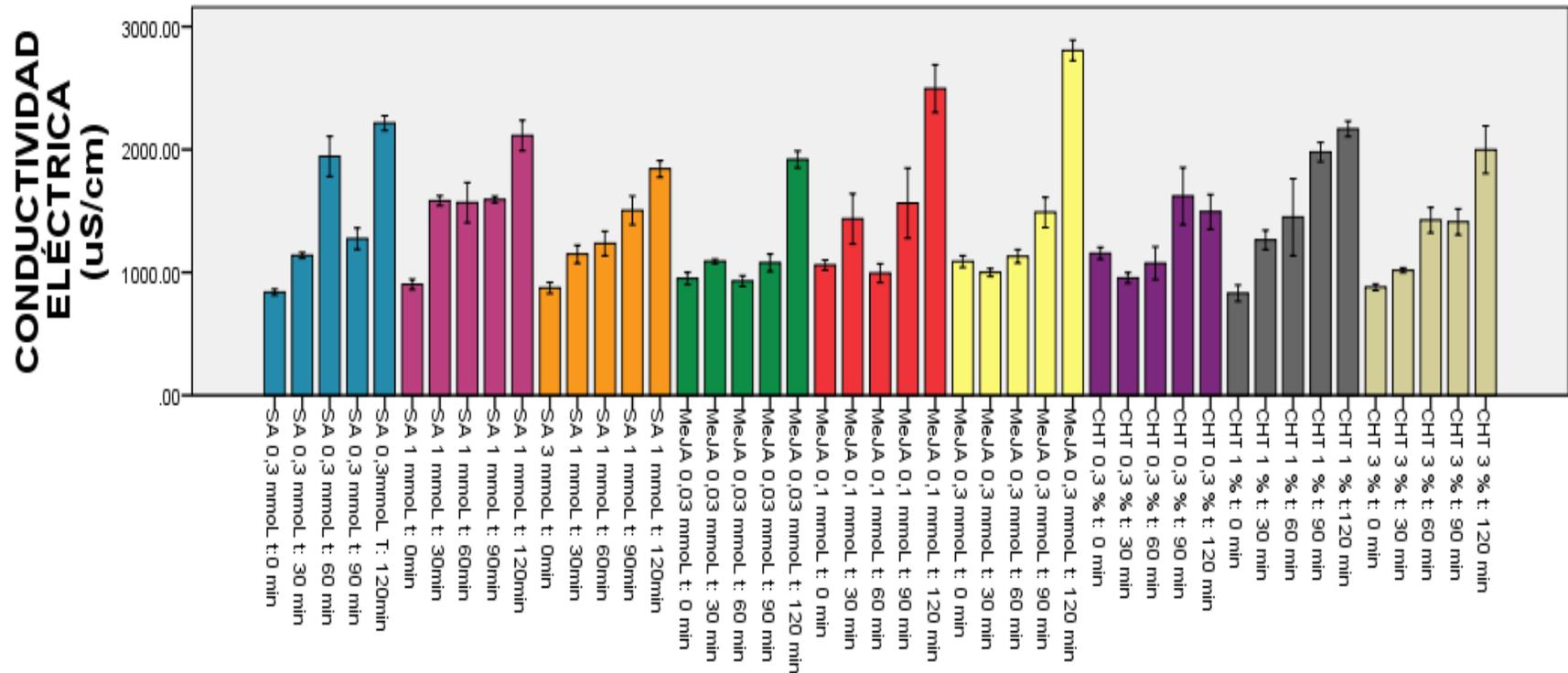
Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor calculado F	Valor F tabulada al 5%
Tratamientos	44	49838628.16	1132696.095	16.816*	1.46
Elicitor	2	195787.28	97893.640	1.498n.s.	3.04
Concentración	2	1898679.12	949339.560	14.524*	3.04
Tiempo	4	35076717.98	8769179.496	134.165*	2.41
Elicitor* Concentración	4	1455509.52	363877.380	5.567*	2.41
Elicitor* Tiempo	8	5530719.30	691339.912	10.577*	1.98
Concentración* Tiempo	8	2012437.86	251554.732	3.849*	1.98
Elicitor*Concentración*Tiempo	16	3668777.10	229298.569	3.508*	1.69
Bloque	4	620874.52	155218.629	2.375n.s.	2.41
Error	176	11503595.08	65361.336		
Total	225	510300000.00			

Anexo1: Análisis de Varianza (ANOVA) de la conductividad eléctrica de los tratamientos en el estudio preliminar

* Significativo al 5% de probabilidad por la Prueba de F

n.s. No significativo al 5% de probabilidad por la Prueba de F

8.2 Conductividad eléctrica (EC) en cada tratamiento del estudio preliminar.



Anexo 2: Gráfico de la conductividad eléctrica en cada tratamiento del estudio preliminar. Se muestra diferencia significativa entre los tratamientos. SA: ácido salicílico, MeJA: Metil jasmonato, CHT: quitosan.

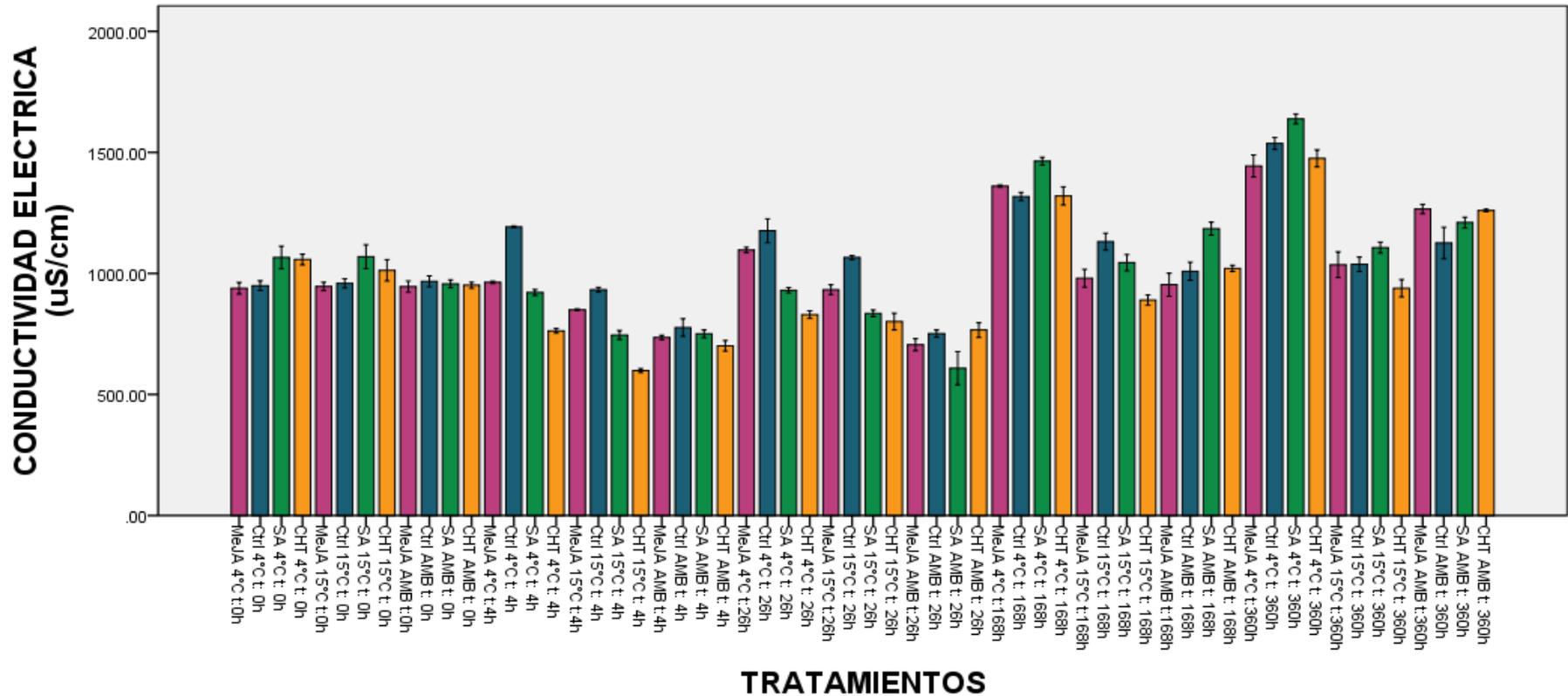
8.3 Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de la conductividad eléctrica y acidez de los tratamientos en el estudio experimental con los elicitores

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios	
		Conductividad (uS)	Acidez (%)
Tratamientos	59	210013,94*	0,058*
Elicitor	3	115208,722*	0,005n.s.
Temperatura	2	1451932,679*	0,039*
Tiempo	4	1552193,692*	0,672*
Elicitor* Temperatura	6	36856,901*	0,029*
Elicitor* Tiempo	12	65060,639*	0,015n.s.
Temperatura* Tiempo	8	190405,601*	0,014n.s.
Elicitor*Temperatura*Tiempo	24	16976,761*	0,007n.s.
Bloque	3	2456,644n.s.	0,078n.s.
Error	177	3343,772	0,013
Total	240		

Anexo 3: Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de la conductividad eléctrica y acidez de los tratamientos en el estudio experimental con los elicitores.

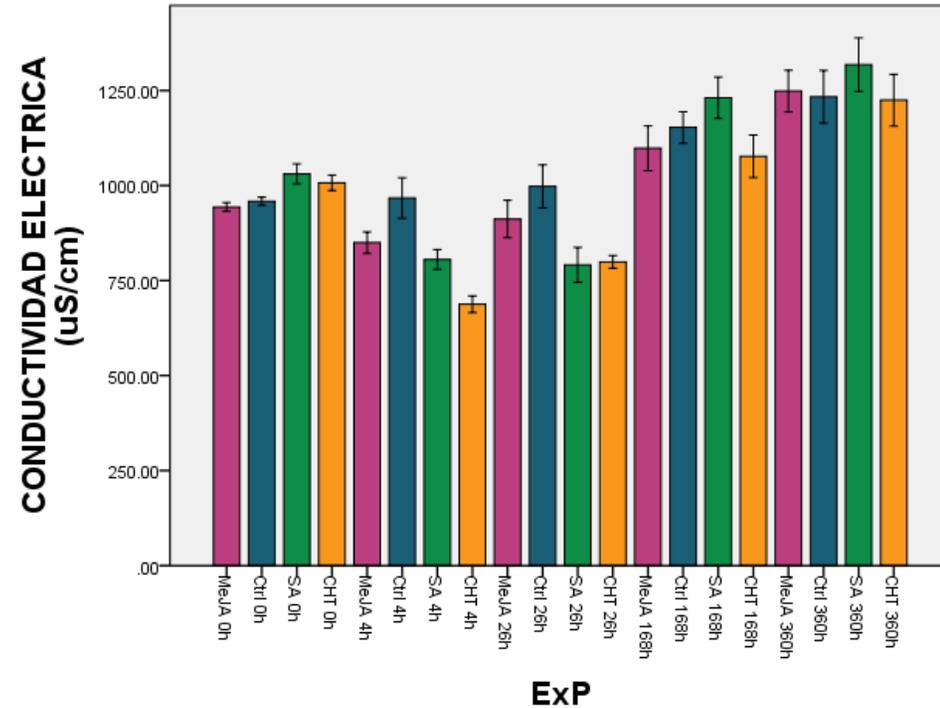
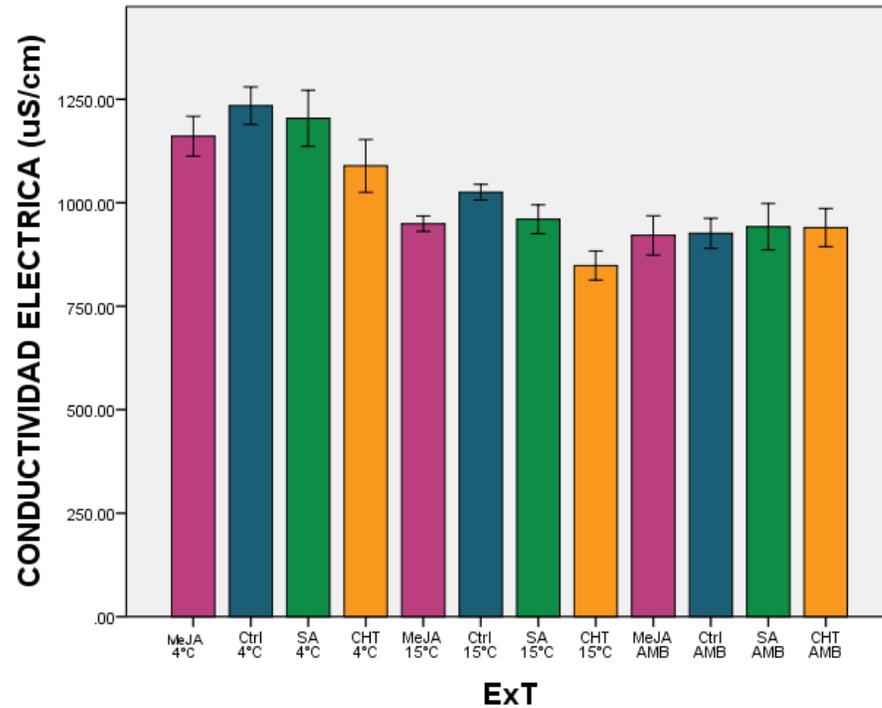
* Significativo al 5 % de probabilidad por la Prueba de F
n.s. No significativo al 5% de probabilidad por la Prueba de F

8.4 Conductividad eléctrica (EC) en cada tratamiento del estudio experimental con los elicitores.



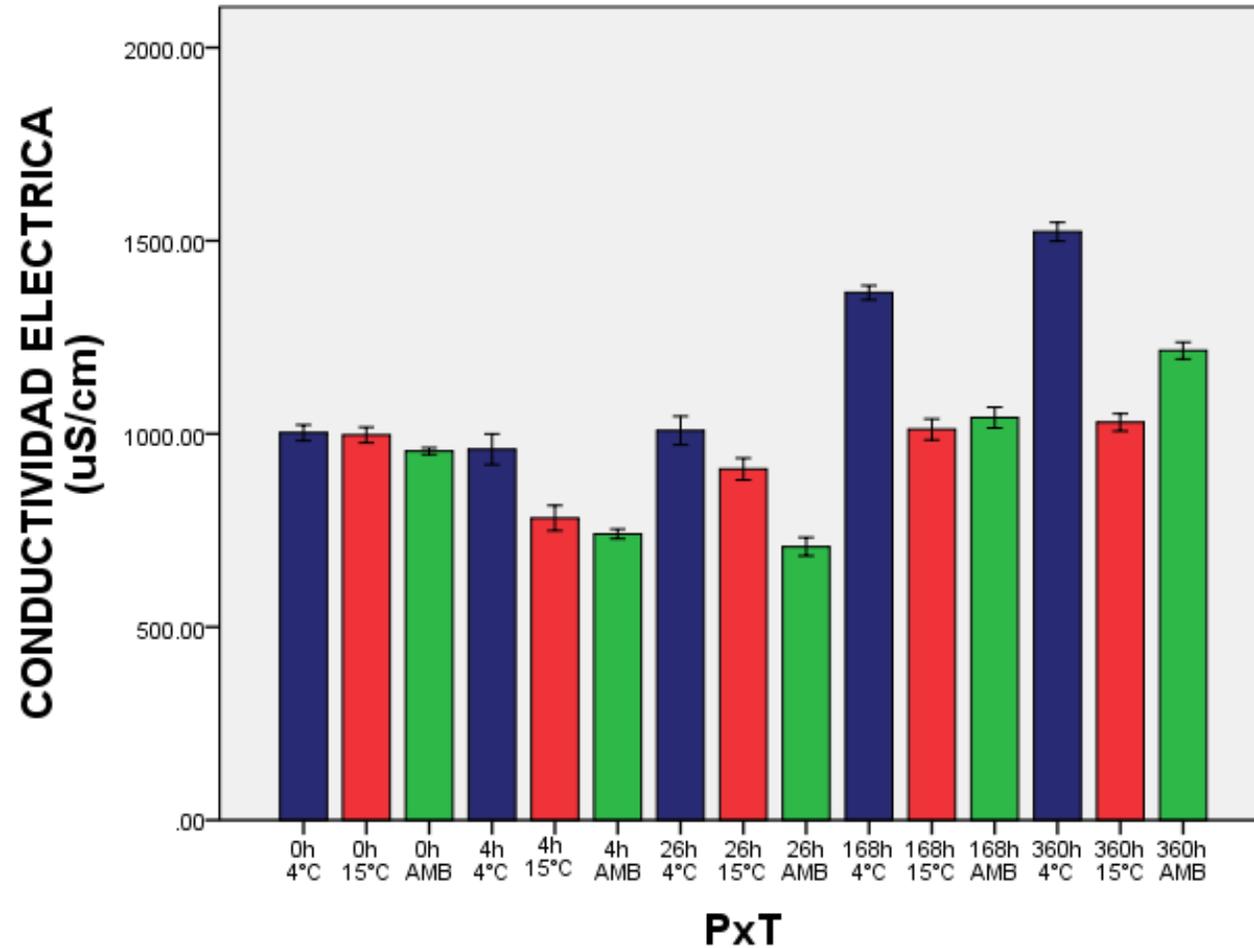
Anexo 4: Gráfico de la conductividad eléctrica en cada tratamiento del estudio experimental con los elicitores. Se muestra diferencia significativa entre los tratamientos. SA: ácido salicílico, MeJA: Metil jasmonato, CHT: quitosán, Ctrl: Control, AMB: temperatura ambiente.

8.5 Conductividad eléctrica (EC) del estudio experimental con los elicitores.



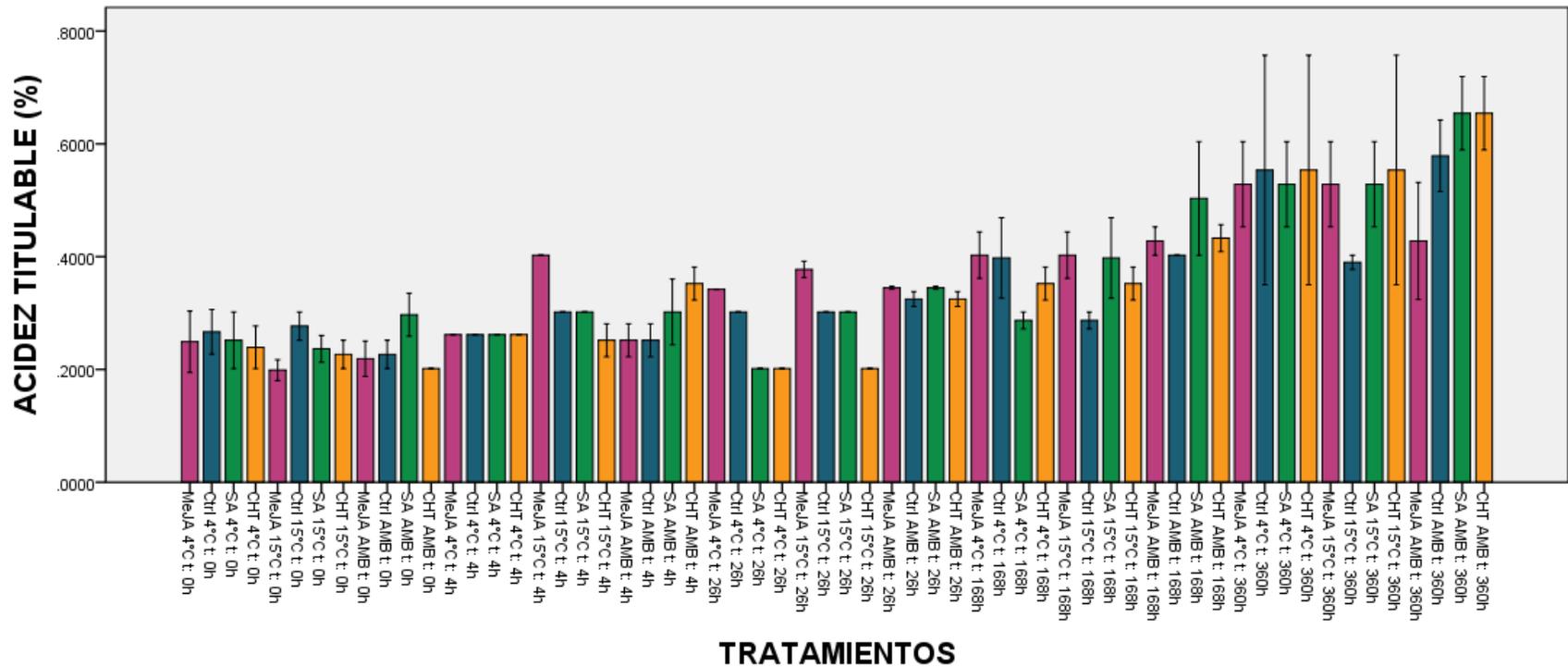
Anexo 5: Gráficos de la conductividad eléctrica del estudio experimental con los elicitores. En el gráfico izquierdo se muestra diferencia significativa entre la interacción Elicitor*Temperatura (ExT). En el gráfico derecho se muestra diferencia significativa entre la interacción Elicitor*Tiempo (ExP). SA: ácido salicílico, MeJA: Metil jasmonato, CHT: quitosan, Ctrl: Control, AMB: temperatura ambiente.

8.6 Conductividad eléctrica (EC) del estudio experimental con los elicitores.



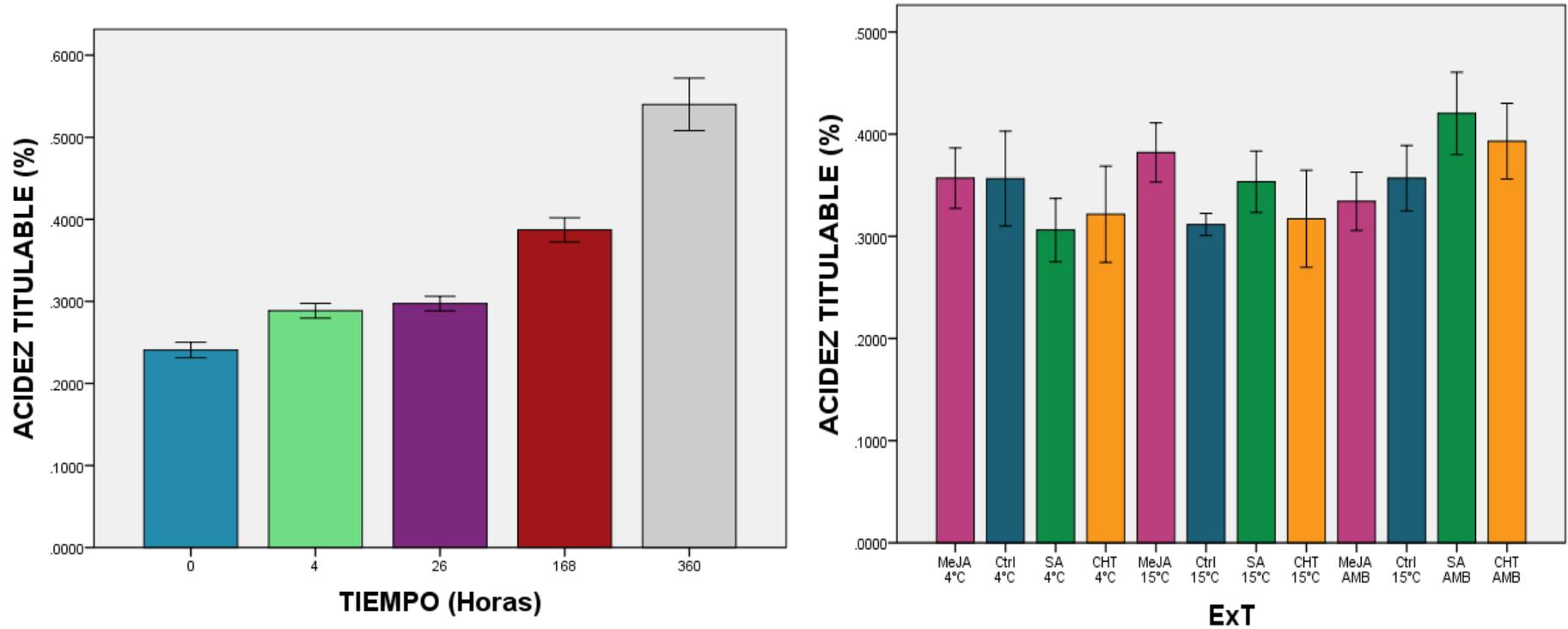
Anexo 6: Gráfico de la conductividad eléctrica del estudio experimental con los elicitores. Se muestra diferencia significativa entre la interacción Tiempo*Temperatura (PxT). AMB: temperatura ambiente.

8.7 Acidez titulable de cada tratamiento del estudio experimental con los elicitores.



Anexo 7: Gráfico de la acidez titulable de cada tratamiento del estudio experimental con los elicitores. Se muestra diferencia significativa entre los tratamientos. Acidez expresada en ácido málico. SA: ácido salicílico, MeJA: Metil jasmonato, CHT: quitosán, Ctrl: Control, AMB: temperatura ambiente.

8.8 Acidez titulable del estudio experimental con los elicitores



Anexo 8: Gráficos de la acidez titulable del estudio experimental con los elicitores. En el gráfico derecho se muestra diferencia significativa entre la interacción Elicitor*Temperatura (ExT). En el gráfico izquierdo se muestra que existe diferencia significativa en relación al tiempo. Acidez expresada en ácido málico. SA: ácido salicílico, MeJA: Metil jasmonato, CHT: quitosan, Ctrl: Control, AMB: temperatura ambiente.