

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**"CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES *PG*, *MADS* Y *ACCO* EN
MESOCARPIO DE MANGO (*Mangifera indica* L.) POR EFECTO DE LA
APLICACIÓN DE TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO"**

POR:

MAGDA ADELINA PACHECO SÁNCHEZ

TESIS APROBADA POR:

**LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN VEGETAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA

ENERO DE 2011

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

“CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES *PG*, *MADS* Y *ACCO* EN
MESOCARPIO DE MANGO (*Mangifera indica* L.) POR EFECTO DE LA
APLICACIÓN DE TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO”

POR:

MAGDA ADELINA PACHECO SÁNCHEZ

TESIS APROBADA POR:

**LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN VEGETAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

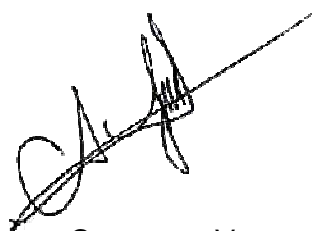
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Magda Adelina Pacheco Sánchez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna

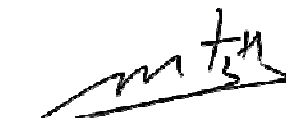
Director de tesis



Dra. Carmen Contreras Vergara



Dra. Adriana Muhlia Almazán




Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del Director de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

Esta tesis fue realizada en el Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Hermosillo, Sonora.
El apoyo financiero fue dado por el proyecto:

CONACYT 80511
EVALUACIÓN ANALÍTICA, ENZIMÁTICA Y MOLECULAR DEL METABOLISMO DE
COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE LA MADURACIÓN DE MANGO, PAPAYA,
PIÑA Y AGUACATE

DEDICATORIA

A mi mejor amigo, a mi compañero de vida, a quien es mi ejemplo, mi fuerza, a quien me impulsa a ser mejor con el simple hecho de compartir la vida a su lado, para quien tengo la fortuna de llamar mi esposo... para ti Arnulfo, te amo!!!.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo, y por el interés en la superación de los profesionistas mexicanos.

A CIAD, por darme la oportunidad de conocer y aprender del mundo de la investigación bajo sus instalaciones.

A mis sobrinos, Santiago y Emilio, porque todo el estrés se me olvidaba cuando me recibían con sus bracitos extendidos para saludarme después de un difícil día. Los amo con todo mi corazón.

A mis padres y hermanos, que aún desde lejos seguían alentándome a seguir estudiando.

A mi tía Angelita, porque nada de esto hubiera sido posible sin su ayuda.

A mis amigos Rodolfo y Rocío por estar siempre acompañándome en todo momento aunque sea de lejos....

A mi asesora, por ser una de las personas que me brindaron más apoyo y comprensión en los momentos difíciles personales y profesionales. Tuve la fortuna de tener a una gran persona como director de tesis.

A mi comité de tesis: Gracias por toda la orientación que recibí por parte de ustedes, por exhortarme a hacer las cosas mejor.

A la Dra. Carmen Contreras, por todo el apoyo académico y moral, nunca pensé tener tanta suerte rodeada de gente como tú.

A mis amigos de la maestría Salvador, Bertha, Blanquita, Vanessa, Gaby, Thania, Alex... muchas gracias por su amistad y por su apoyo...

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, al personal a cargo, a Emmanuel Hernández Aispuro, Marisol Ochoa Villareal, y Francisco Soto (Panchito) por su apoyo técnico. Gracias por recibirme como uno más de su equipo, son todos ustedes de lo mejor!!

Al Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Plantas, de manera especial al MC. Javier Ojeda (Don Javi) por todas las atenciones y por todo el apoyo durante todo este tiempo.

Al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Vegetales, al Dr. Gustavo González por su apoyo con el equipo de laboratorio, y por el apoyo técnico brindado por MC. Mariana Rodríguez Armenta.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, especialmente a Sandra Araujo, por el apoyo técnico.

Al Dr. Arturo Sánchez de CIBNOR por todo su apoyo técnico con las corridas de tiempo real.

Al MC. Ernesto Sánchez Sánchez de INIFAP por el apoyo técnico y con la recolección de las muestras de los frutos en el huerto de Guaymas y en Navojoa.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	2
El Mango y su Manejo.....	2
Tratamiento Hidrotérmico.....	4
Etileno y el estrés por calor.....	5
Cambios en la Pared Celular	8
La poligalacturonasa (PG)	9
Expresión Génica de Proteínas Asociadas a Maduración	10
Familia MADS de Factores de Transcripción.....	13
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
General	17
Particulares	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Obtención de Mangos Variedad ‘Kent’ y Determinación de Variables Fisiológicas	18
Recolección de mangos ‘Kent’.....	18
Aplicación del tratamiento hidrotérmico	18
Tasa respiratoria.....	18
Pérdida de firmeza.....	19
Expresión de los Genes <i>ACCO</i> , <i>MADS</i> y <i>PG</i> en Mesocarpio de Mango	19
Extracción de RNA total.....	19
Evaluación de la integridad del RNA total.....	20
Eliminación de DNA genómico	20

Síntesis de cDNA por transcripción reversa	21
Amplificación de los fragmentos internos de los genes <i>ACCO</i> , <i>MADS</i> y <i>PG</i> a partir de cDNA de mesocarpio de mango	21
Cuantificación relativa de la expresión génica de <i>ACCO</i> , <i>MADS</i> y <i>PG</i> por PCR en tiempo real	22
Análisis de Datos de Parámetros Fisiológicos y de PCR en Tiempo Real.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Tasa Respiratoria.....	24
Pérdida de Firmeza.....	27
Expresión Relativa de los Genes <i>ACCO</i> , <i>MADS</i> y <i>PG</i> en Mesocarpio de Mango	31
Extracción de RNA total y evaluación de la integridad	31
Eliminación de DNAg contaminante del RNA total	32
Amplificación de fragmentos de genes de interés por PCR.....	33
Expresión relativa de <i>ACCO</i> -Producción de etileno	34
Cambios en la expresión génica de <i>ACCO</i> por efecto del tratamiento hidrotérmico	37
Cambios en la expresión génica de <i>MADS</i> por efecto del tratamiento hidrotérmico	40
Cambios en la expresión génica de <i>PG</i> por efecto del tratamiento hidrotérmico.....	43
CONCLUSIONES.....	47
PERSPECTIVAS.....	48
BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de Yang	6
FIGURA 2. Modelo de regulación en la maduración del tomate.....	12
FIGURA 3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas tipo MADS	16
FIGURA 4. Producción de CO ₂ de los frutos de mango variedad 'Kent'	26
FIGURA 5. Pérdida de firmeza de los frutos de mango variedad 'Kent'	29
FIGURA 6. Análisis de RNA en Gel de agarosa 1% en condiciones desnaturalizantes.	31
FIGURA 7. Análisis de RNA en Gel de agarosa 1% en condiciones desnaturalizantes.	32
FIGURA 8. Análisis electroforético de los amplicones de los genes de interés	33
FIGURA 9. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima ACC oxidasa en la maduración del mango 'Kent'	35
FIGURA 10. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima ACCO por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Kent'	38
FIGURA 11. Expresión relativa del gen que codifica para el factor de transcripción MADS por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Kent'	41
FIGURA 12. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de los fragmentos de PGs de mango generadas con oligonucleótidos específicos.	44
FIGURA 13. Expresión relativa del gen que codifica para PG por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Kent'	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos para análisis de expresión génica	22
---	----

RESUMEN

Los mangos requieren la aplicación de tratamiento hidrotérmico para su exportación para asegurar la muerte de la larva de la mosca de la fruta. Sin embargo, el efecto que provoca el estrés por calor puede afectar parámetros de calidad en el fruto como la firmeza la cual disminuye principalmente por la acción de enzimas pectolíticas como la poligalacturonasa (PG). Esta enzima degrada el ácido poligalacturónico que compone la pectina presente en la lámina media y en la pared celular primaria de la célula vegetal. Por otro lado, en estudios de tomate mutantes que no maduran identificaron al factor de transcripción de la familia MADS como regulador clave de la maduración. Las proteínas MADS controlan la expresión génica de proteínas asociadas a este complejo proceso tales como las involucradas en la síntesis del etileno como aminociclopropanocarboxilato oxidasa (ACCO) la cual cataliza el último paso de la síntesis de etileno. También regulan la expresión de proteínas que hidrolizan la pared celular. El objetivo de este trabajo fue aplicar tratamiento hidrotérmico a frutos de mango y evaluar los efectos en parámetros fisiológicos, así como en la expresión de los genes *ACCO*, *MADS* y *PG*. La producción de etileno en los mangos se evaluó a nivel de transcripción de *ACCO*, observándose que hubo efecto por el tratamiento y que el nivel máximo en la producción de transcrito correlaciona con el pico climaterico. La aplicación de tratamiento hidrotérmico en los mangos 'Kent' generó una inhibición de la producción de etileno en el día 4 postratamiento, recuperándose en el día 6. Los niveles de expresión del factor de transcripción MADS se mantuvieron constantes, sugiriendo que es un gen muy regulado probablemente a diferentes niveles. Por otro lado, la expresión de *PG* aumentó en el día 12 postratamiento correlacionando con el climaterio de los frutos. En este estudio, se ha encontrado evidencia de al menos dos genes que codifican para PG en pulpa de mango. Por todo lo anterior, se concluye que el tratamiento hidrotérmico induce cambios en la expresión génica de mango de la variedad 'Kent' que se ven reflejados en aspectos fisiológicos del fruto.

INTRODUCCIÓN

La maduración de los frutos es un proceso que involucra una serie de cambios metabólicos, que aún no se encuentran completamente estudiados. En los frutos climatéricos estos cambios van acompañados por un aumento en la respiración y en la producción autocatalítica de etileno, mientras que en los no climatéricos la producción de etileno es constante y en menor cantidad. La producción de la fitohormona etileno desencadena un conjunto de reacciones que provocan la aceleración de la maduración (Prasanna *et al.*, 2007). El mango es un fruto climatérico y es consumido en todo el mundo por sus características físicas y sensoriales.

La exportación del fruto requiere un tratamiento basado en la aplicación de calor a través del agua para garantizar que éste se encuentre libre de larvas de la mosca de la fruta. La aplicación del tratamiento hidrotérmico causa cambios visibles en el fruto acelerando la maduración y por lo tanto, modificando la expresión de algunos genes relacionados con ese proceso (Vicente *et al.*, 2006). En la maduración, el cambio de textura como resultado de la degradación de los componentes de la pared celular, es uno de los factores más importantes que determina la calidad del fruto. Por lo anterior se ha enfocado el estudio en la expresión génica de proteínas y enzimas relacionadas con estos cambios.

El estudio de la expresión de genes que participan en el proceso de maduración de los frutos involucra a los factores de transcripción MADS y de proteínas estructurales que participan en la maduración. La expresión de genes que codifican para las proteínas reguladoras y para las relacionadas con el cambio en la firmeza de la pared celular, serían indicativos de los puntos de control de la maduración. La biotecnología permite la manipulación de las características asociadas a la maduración para lograr un producto atractivo para el consumidor. Con el estudio de la expresión de genes de las proteínas asociadas a la maduración se pretende la manipulación de los mismos para evitar el rápido deterioro de los frutos y eliminar problemáticas de exportación.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El Mango y su Manejo

El mango es un fruto tropical descrito como una 'gran drupa' por su mesocarpio comestible color amarillo y de sabor apetecible. Su forma es ovoide aplanada, el color exterior puede variar entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rojo y violeta, dependiendo de la variedad. El sabor de la pulpa es el resultado del contenido de ácidos orgánicos, terpenoides y azúcares libres. Por sus excelentes características sensoriales, el mango tiene gran demanda en todos los mercados (Ploy, 2006).

Los principales países productores de mango son India, México, Pakistán, Tailandia, China, Brasil, Filipinas e Indonesia (Ara *et al.*, 2005). En el mundo se cultivan y comercializan diferentes variedades de mango. Debido a que las diversas variedades de mango crecen de manera natural en áreas tropicales y subtropicales, se cosechan en todos los países de Latinoamérica. En México, las variedades más importantes son Tommy Atkins, Ataulfo y Kent. México es el principal país exportador del mundo donde se comercializan alrededor de 41 millones de cajas de mango con calidad de exportación, lo que equivale a 185 794 Ton de fruto fresco (Luna *et al.*, 2006). En el mercado existe gran demanda de la variedad de mango 'Kent' por ser un fruto de gran atractivo visual; sin embargo, los costos de transporte suelen ser elevados debido a que se requiere rapidez en su traslado, ya que es altamente perecedero (Osuna *et al.*, 2005).

El mango, por ser climatérico, es un fruto que se caracteriza por su rápida maduración, y debido a ello existe el interés en estudiarlo para entender los procesos metabólicos y solucionar a nivel genético este problema que representa altos costos. El proceso de maduración involucra una serie de procesos metabólicos tales como cambios en la coloración, producción de compuestos volátiles, degradación de almidón y síntesis de azúcares. El conjunto de reacciones que se llevan a cabo hacen inevitable

el deterioro fisiológico natural del fruto. Los frutos climatéricos son cosechados en su estado verde-maduro, para que durante la subsecuente maduración poscosecha tengan las características requeridas para su comercialización. Los factores decisivos en la producción de mango de alta calidad son la adecuada madurez fisiológica en la cosecha y el control poscosecha de ataques de patógenos y plagas (Neidhart *et al.*, 2007).

El fruto de mango ideal debe poseer una relación pulpa a semilla alta, consistencia firme y uniforme, un balance en la relación azúcar y ácido, aroma agradable y perdurabilidad del sabor (Aular y Rodríguez, 2005). La obtención de estas características implica el seguimiento de un programa estricto en la plantación del cultivo, el tiempo adecuado de cosecha, así como el manejo poscosecha. Esto, debido a que el periodo en el que toman lugar los cambios que proporcionan las características óptimas para el consumo es muy corto (Jain *et al.*, 2003). En los cambios de los componentes celulares se produce un incremento en el proceso catabólico y la iniciación de la senescencia. De esta manera, la maduración involucra cambios de color y olor, pérdida de firmeza, aumento en el contenido de azúcares y proteínas. El aumento de la solubilidad de polisacáridos pécticos es una de las características más importantes de la maduración de frutas carnosas (Huber *et al.*, 2001). Esos cambios son los que causan el ablandamiento del mango en su etapa de maduración, cuyas características resultan en atributos negativos para la calidad requerida en los frutos por el consumidor.

Tratamiento Hidrotérmico

Algunos países exigen la aplicación de tratamientos específicos al fruto del mango que importan, con el fin de evitar la introducción de insectos, esto porque el daño causado por plagas puede ser muy costoso cuando infestan cultivos locales. Así, se han implementado programas de control y restricciones de cuarentena en el comercio entre unas y otras regiones del mismo país o entre países. Los tratamientos basados en la aplicación de calor con agua y con aire, han mostrado ser eficaces en la protección del daño por ataque de patógenos. El tratamiento con aire caliente puede tener control de humedad, pero esto puede afectar el tiempo de exposición real al calor y no obtener los resultados deseados. Debido a que el agua es mejor medio de transferencia de calor que el aire, el tratamiento hidrotérmico (TH) es mayormente utilizado por no requerir demasiado tiempo de exposición que pudiera causar daños al fruto (Lurie, 1998).

Países como Japón, Chile, E.U.A. y Nueva Zelanda, exigen la aplicación del tratamiento hidrotérmico para el control de la mosca de la fruta como requisito indispensable para permitir la entrada de los mangos a sus mercados. Este tratamiento consiste en sumergir el fruto en agua a 46.1°C durante 65, 75 ó 90 min dependiendo de su peso, lo cual garantiza que los frutos estarán libres de la plaga (Yahia, 2006). Los estudios realizados sobre la aplicación en mango de agua caliente con temperaturas de 46°C a 55°C y con variaciones de 5 a 55 min, indican que a 46°C o más, se mueren las larvas de la mosca de la fruta y se reducen los daños ocasionados por hongos tal como la antracnosis (McIntyre *et al.*, 1993). Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento hidrotérmico puede afectar algunas características de calidad, sobre todo cuando el mango se almacena a menos de 12°C. Entre los efectos se puede mencionar que elimina la cera natural de la superficie de la fruta, se reduce el brillo y se acelera la pérdida de humedad (Eckert, 1985).

Las características fisiológicas alteradas por la aplicación de calor en un fruto dependen de múltiples factores tales como el cultivar, tamaño y morfología del fruto,

estado de madurez, transferencia de calor y balance de energía, duración de la exposición y temperatura de almacenamiento (Paull y Jung, 2000). El tratamiento hidrotérmico produce cambios en la fisiología del fruto como resultado del estrés ocasionado por la temperatura, traduciéndose en efectos negativos como la aceleración de la pérdida de firmeza como se ha observado en estudios realizados con mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico (Luna *et al.*, 2006). La respuesta a estos tratamientos depende de la temperatura y el tiempo de exposición, del fruto del cual se trate, así como de las condiciones pre y poscosecha de los mismos. Esta complejidad ha dado lugar a dificultades en la interpretación de los diversos estudios efectuados (Paull y Yung, 2000). En el mango, la aplicación de calor ha tenido resultados variables dependiendo del método de aplicación de calor que se utilice. Los factores fisiológicos afectados principalmente en mango, son la firmeza, la coloración y la pérdida de sabor en algunas variedades; sin embargo, las distintas variedades de mango muestran diferentes tolerancias al calor (Luna *et al.*, 2006). Por otro lado, la aplicación de otro tipo de tratamientos como soluciones químicas, tiene un efecto negativo sobre la salud y el medio ambiente. Por lo anterior, se investiga de manera constante la forma de mantener la calidad poscosecha de los mangos por más tiempo.

Etileno y el estrés por calor

El etileno es la fitohormona que provoca la maduración en frutos climatéricos y su síntesis es autocatalítica. Esta fitohormona además de sintetizarse durante el desarrollo y maduración de los frutos, se sintetiza en respuesta a diferentes tipos de estrés, tales como heridas, temperaturas muy bajas o muy altas, inundaciones, sequías, entre otros. También se induce por tratamientos con otras hormonas, metales pesados y ataque de patógenos (Soares y De Mello, 2006). La síntesis autocatalítica de etileno en los frutos es a partir de metionina vía S-adenosil metionina (AdoMet) y ácido-1-aminociclopronanocarboxílico (ACC) mediante el ciclo de Yang (Figura 1). Las enzimas que catalizan la conversión de AdoMet a ACC y de ACC a etileno son la ACC sintasa (ACCS) y ACC oxidasa (ACCO), respectivamente.

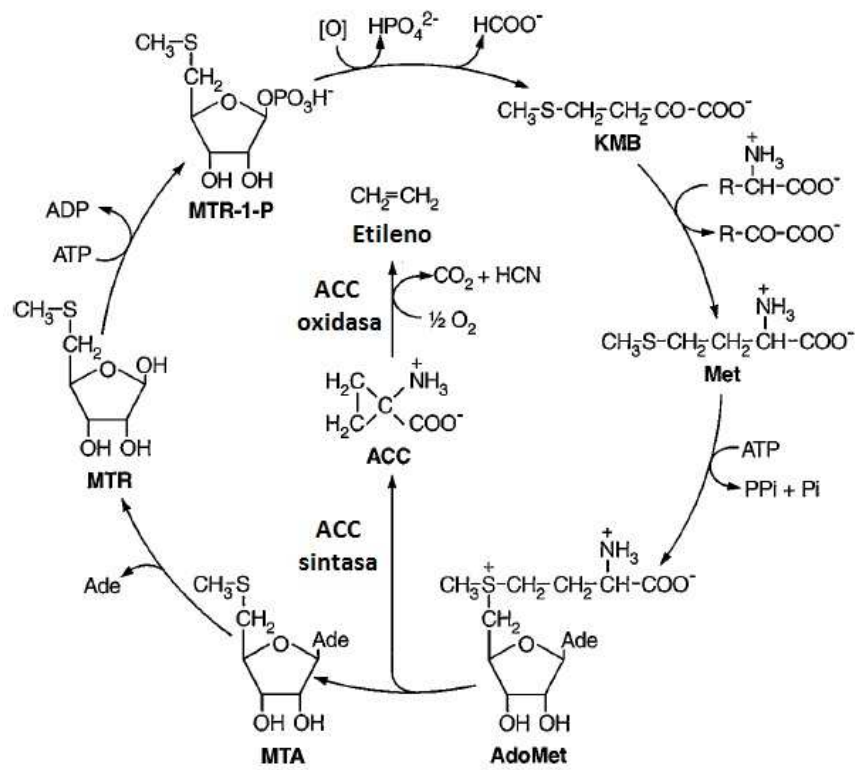


Figura 1. Ciclo de Yang. ACC, ácido-1-aminociclopropanocarboxílico; Ade, adenina; AdoMet, S-adenosil-L-metionina; KMB, 2-ceto-4-ácido metilbutírico; Met, L-metionina; MTA, 5'-metiladenosina; MTR, 5'-metilribosa; MTR-1-P, 5'-metilribosa-1-fosfato. Tomado de Bleecker y Kende (2000).

La actividad de ACCO (EC 1.14.17.4) es completamente dependiente de la presencia de CO₂ aunque esta dependencia no ha sido explicada. Se han encontrado isoformas de la enzima ACCO, codificadas por una pequeña familia de genes en la planta modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*. La enzima ACCS (EC 4.4.1.14) ha sido identificada como la enzima limitante en la regulación de la síntesis de etileno; sin embargo, los niveles de transcripción para ACCO aumentan en algunos tejidos de plantas cuando se induce la síntesis de etileno (Bleecker y Kende, 2000).

La conversión de ACC a etileno es altamente susceptible a daño por calor cuando se trata de temperaturas por arriba de los 30°C, observándose una reducción en la producción de etileno. Sin embargo, los frutos expuestos a largos periodos con altas temperaturas, recobran rápidamente su habilidad para llevar a cabo la síntesis de etileno (Paull y Jung, 2000). En manzana, la exposición del fruto a temperaturas por arriba de los 36°C causa la acumulación de ACC y reduce la producción de etileno (Lurie, 1998). En frutos con aplicación de calor por cortos periodos de tiempo la actividad de ACCO se reduce. Sin embargo, cuando el tiempo de aplicación de calor no produce daños en el fruto, la síntesis de etileno se restablece rápidamente. En mango, la actividad de ACCS después de la aplicación de calor no se recupera del todo, mientras que la actividad de ACCO se restablece rápidamente (Ketsa *et al.*, 1999).

Cambios en la Pared Celular

Los cambios de textura en el proceso de maduración de los frutos son el resultado de modificaciones en la pared celular. Los cambios ocurren en los polisacáridos que componen la pared celular generando un decremento en la adhesión intercelular y provocando la pérdida de firmeza. La mayoría de los cambios de la pared celular son el resultado de la acción de enzimas secretadas desde la parte interna de la membrana plasmática hacia la pared celular mediadas por radicales libres (Brummell, 2006). En frutos, los compuestos que forman parte de la pared celular son principalmente pectina, celulosa y hemicelulosa, siendo la pectina el compuesto más abundante en la pared celular (Owino *et al.*, 2005). La pectina es un polímero del ácido poligalacturónico (poliuronidos derivados del ácido galacturónico) cuya estructura está esterificada y la hemicelulosa es un polisacárido compuesto por más de un tipo de monómero unidos por enlaces β -1,4 que forman una cadena lineal. La hidrólisis de estos compuestos está relacionada con el ablandamiento en algunos frutos.

Debido a la complejidad de la pared celular, el ablandamiento de los frutos se debe a la acción de una gran variedad de enzimas hidrolíticas. En frutos como el tomate, el plátano y la guayaba, el ablandamiento se ha relacionado con enzimas pécticas tales como poligalacturonasa, pectato liasa y pectin metil-esterasa. De manera similar, para los frutos como el kiwi, la manzana y el tomate se ha observado una relación entre la pérdida de firmeza del fruto con las enzimas galactosidasa y galactanasa. En frutos como el aguacate y la pera, el ablandamiento se ha atribuido a la acción de hemicelulasas (Yashoda *et al.*, 2005). En el mango, el ablandamiento ha sido atribuido a la depolimerización y solubilización de poliuronidos de la lamela media por la acción de hidrolasas en la pared celular tales como pectinesterasa (PE), galactanasa y β -galactosidasa, provocando cambios en el espesor de la pared celular y en su composición, tamaño, forma y turgencia (Brummell *et al.*, 2004; Muda *et al.*, 1995). La pérdida de turgencia es debida a la acumulación de solutos osmóticos en el espacio extracelular y a la pérdida de agua del fruto (McIntyre *et al.*, 1993).

Las enzimas pectolíticas como la poligalacturonasa (PG) y la pectin-metil esterasa (PME), se relacionan con el decremento en el peso molecular de la pectina. Los cambios en la pectina son concomitantes a la pérdida de azúcares como arabinosa y galactosa. Éstos correlacionan con el ablandamiento de algunas variedades de mango (Yashoda *et al.*, 2005). Los cambios de firmeza son particularmente importantes debido a que ocasionan la pérdida de resistencia a infecciones microbianas por los procesos de deterioro de los tejidos (Moore *et al.*, 2002). El estudio de la pared celular y los cambios en su composición son necesarios para determinar los diferentes estados de firmeza en el fruto. En general, todos los componentes de la pared celular tales como pectinas, glicanos entrecruzados y celulosa son modificados durante la maduración (Ali *et al.*, 2004).

En frutos como el kiwi, el durazno, el melón, el pèrsimo, el plàtano y el mango se han realizado mediciones cuantitativas de los cambios en los polisacàridos pècticos de la pared celular (Prasanna *et al.*, 2003). Estas modificaciones muestran que el ablandamiento de los frutos es un proceso multifactorial que involucra el cambio de muchos polímeros. Sin embargo, en el proceso de maduración se presenta un decremento en el peso molecular de la pectina y un incremento en poliuronidos solubles. Esta disminución del peso molecular de la pectina está correlacionada con incrementos en la actividad de la enzima PG (Prasanna *et al.*, 2006).

La poligalacturonasa (PG)

Varias isoformas de PG se han reportado en frutos como la fresa, el tomate, el durazno, la pera, el aguacate y el plàtano (Singh y Dwivedi, 2008). En mesocarpio de mango, también se han observado isoformas de esta enzima expresadas durante la maduración. En mango de la variedad Alfonso, se han reportado tres isoformas en mesocarpio al igual que en la variedad Dashehari (Prasanna *et al.*, 2006; Sing y Dwivedi, 2008). La acción de las enzimas exo-poligalacturonasa y endo-poligalacturonasa cuyo sustrato es al àcido galacturónico, se diferencian en la posición del anillo en la cual intervienen durante la hidrólisis. La enzima exo-poligalacturonasa hidroliza la unión terminal α -1,4 entre los residuos de àcido galacturónico demetilado,

mientras que la enzima endo-poligalacturonasa hidroliza este mismo tipo de unión pero al azar (Suntornwar *et al.*, 2000). La actividad de éstas dos enzimas ha sido determinada en diferentes frutos durante la maduración; sin embargo, no se muestra un patrón de actividad enzimática característico, siendo diferente la poligalacturonasa que actúa en cada fruto (Brummell, 2006). La actividad de endo-poligalacturonasa ha permanecido constante en el mango de la variedad Nam Dok Mai en diferentes estados de desarrollo, mientras que la actividad de exo-poligalacturonasa presenta un incremento en las etapas más cercanas a la maduración (Suntornwat *et al.*, 2000).

Expresión Génica de Proteínas Asociadas a Maduración

La maduración de los frutos está acompañada por cambios importantes en la expresión de genes. Algunos cDNAs que han sido aislados corresponden a mRNAs que se acumulan abundantemente durante los procesos de desarrollo y maduración (Chaves y Mello-Farías, 2006). El tomate es el fruto climatérico modelo en el que más se ha estudiado la expresión de genes asociados a maduración debido a su importancia como alimento, además de la facilidad de manipulación a nivel experimental.

La evidencia más fuerte sobre el control de la maduración viene del análisis de la expresión génica de sus mutantes. Las mutantes *rin* (ripening-inhibitor) y *nor* (non-ripening) no presentan la síntesis autocatalítica de etileno y maduración respectivamente. Sin embargo, ambas mutantes muestran signos de sensibilidad a maduración en respuesta a la aplicación de etileno exógeno y a la señalización de la hormona, incluyendo la inducción de algunos genes de regulación o factores de transcripción. La mutante *rin* del tomate muestra múltiples efectos fenotípicos y fue utilizada para identificar cDNAs relacionados a la maduración. A partir de ésta, se estudiaron las proteínas receptoras de etileno. De igual forma, se utilizó la mutante *nor* para el estudio de la regulación de otros genes expresados durante la etapa de maduración (Chaves y Mello-Farías, 2006). Entre los genes que han sido asociados a los efectos del retraso en la maduración de la mutante *rin* se encuentran algunos

miembros de la familia de factores de transcripción conocidos como MADS (Moore *et al.*, 2002).

Se ha propuesto un modelo de regulación molecular en la maduración de tomate (Figura 2) en donde se relaciona a factores de transcripción MADS con la activación de la cascada de señalización de etileno, dando lugar a la expresión de genes asociados al ablandamiento, sabor, aroma, degradación de clorofila y acumulación de carotenoides (Giovannoni, 2004).

Los genes individuales, o de familias de genes específicos, son estudiados a profundidad en los diversos genotipos; sin embargo, hay pocos trabajos realizados para permitir la evaluación de la función de un gen considerando varias especies (Moore *et al.*, 2005). En mango, los genes más estudiados son los que codifican para proteínas con actividad catalítica que tienen relación con el cambio en la estructura de la pared celular. Estas proteínas están involucradas en el ablandamiento del fruto, característico en la maduración, que es un factor de calidad determinante para exportación.

En tomate, los cambios relacionados con la pared celular han sido estudiados, especialmente el gen de *PG*, el cual representa el 1% del mRNA de los frutos maduros. Los resultados han mostrado además actividad de otras enzimas hidrolíticas como pectinasas de acuerdo con la inducción de la maduración y el ablandamiento. La remoción de grupos pectinmetil-éster de la pared celular por la enzima PME antes de la maduración, facilita la disponibilidad de sustrato para la enzima PG (Giovannoni, 2004). Así como éstos, se han estudiado algunos genes que codifican proteínas relacionadas con la modificación de la pared celular en frutos, tales como β -galactosidasa, pectato liasa y expansinas (Wu y Burns, 2004; Chourasia *et al.*, 2006; Sane *et al.*, 2005). Los estudios de sus funciones biológicas, han permitido el entendimiento de los cambios fisiológicos del fruto en la maduración.

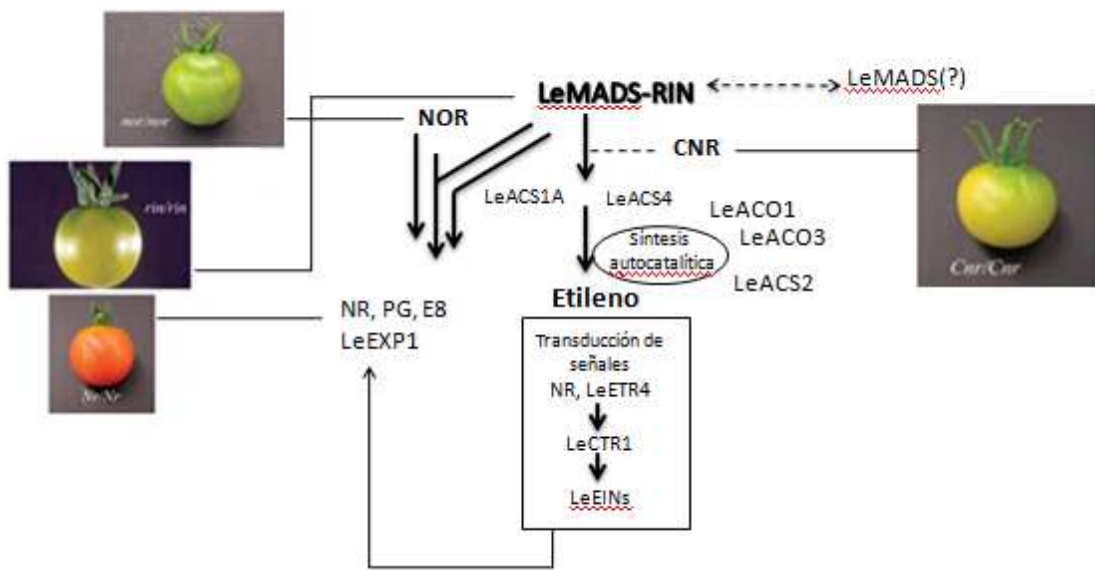


Figura 2. Modelo de regulación en la maduración del tomate. Tomado de Giovannoni, 2004.

Las herramientas genómicas son útiles para conocer los componentes regulatorios que impactan en el desarrollo y la madurez de los frutos. Para evitar el ablandamiento de los frutos se han realizado alteraciones en la expresión de genes asociados a la modificación de la pared celular. Este tipo de experimentos se han llevado a cabo en tomate en donde se incrementó el tiempo de vida comercial reduciendo los niveles de la enzima PG (Sheehy *et al.*, 1988). Una limitación en el uso de las manipulaciones genéticas, es la diferencia en la cantidad de los componentes de la pared celular entre diferentes frutos y variación en la expresión de genes que están asociados al ablandamiento. Si hubiera una vía de desarrollo conservada entre todos los tipos de frutas su descubrimiento crearía nuevas oportunidades para el control de su maduración (Causier *et al.*, 2002).

Familia MADS de Factores de Transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que participan en la regulación de la transcripción del DNA, controlando la transferencia de información genética de DNA a RNA. Generalmente realizan su función de unión al DNA formando un complejo proteico con otros factores de transcripción y con la RNA polimerasa. Estos factores de transcripción inician la transcripción a nivel basal formando el complejo de preiniciación de la transcripción con la RNA polimerasa II en los sistemas eucariontes (Klug *et al.*, 2006). Existen otros factores de transcripción que se unen a sitios intensificadores y afectan la tasa de transcripción. Estas proteínas pueden actuar como factores positivos incrementando la transcripción (activadores) o como factores negativos (represores) para disminuir la transcripción. El control de la expresión de genes así como la tasa de expresión está dado por estas proteínas (Klug *et al.*, 2006).

Un factor de transcripción que se ha relacionado con la maduración de los frutos es conocido como MADS. Su nombre proviene de los primeros cuatro miembros de la familia: MCM1, identificado en levadura *Saccharomyces cerevisiae*; AGAMOUS,

identificado en la planta *Arabidopsis*; DEFICIENS, identificado en la planta *Antirrhinum* y SRF, identificado en humanos (Theissen *et al.*, 2000). En la planta *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado que los factores de transcripción de la familia MADS están compuestos de cuatro dominios diferentes, el M (MADS), I, K, y C. El dominio MADS es distintivo para esta familia de factores de transcripción y es el sitio que se une a secuencias conservadas de DNA conocidas como caja CArG (Causier *et al.*, 2002). El dominio MADS es altamente conservado, consta de 56 a 60 aminoácidos y ha sido implicado en la formación de homodímeros y heterodímeros ya que es en ésta forma en la cual el factor de transcripción es activo. La región I y el dominio K están involucrados en las interacciones proteína-proteína, mientras que el C-terminal es necesario para la formación de complejos ternarios y en la función de la activación de la transcripción (Shore y Sharrocks, 1995). Los factores de transcripción MADS están relacionados en muchos otros aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la regulación del tiempo de floración, fertilidad, órganos e identidad del meristemo y la arquitectura de la raíz. Además, los genes *MADS* son expresados en los diferentes estados del ciclo de vida de las plantas y en una variedad de órganos y tipos de células, sugiriendo que se encuentran involucrados en aspectos del desarrollo que afectan múltiples tejidos y órganos. Las interacciones entre estos genes y sus productos suceden a nivel transcripcional y postranscripcional, con autorregulación y formación de complejos (Causier *et al.*, 2002).

En el tomate, la mutación *rin* de la maduración afecta a dos genes miembros de la familia de factores de transcripción MADS. Los análisis de complementación de la mutante y de expresión génica antisentido indican que el gen *LeMADS-RIN* regula la maduración. La identificación de cDNAs de MADS en frutos de fresa muy similares a *LeMADS-RIN* de tomate sugiere la posibilidad de que las proteínas MADS tienen una función conservada tanto en la maduración de frutos climatéricos como en los no climatéricos (Liu *et al.*, 2008). En estudios realizados en plátano se han identificado seis genes tipo *MADS* expresados en diferentes etapas de la maduración del fruto (Elitzur *et al.*, 2010) y los diferentes dominios de los factores de transcripción tipo MADS se

muestran en la Figura 3. La diversidad estructural y de secuencia son particularmente prevalentes en el dominio MADS de esta familia de factores de transcripción (Theissen *et al.*, 2000). Muchos miembros la familia de los genes *MADS* tienen una función importante en el desarrollo vegetal, aunque también se ha detectado la presencia de este factor de transcripción en el reino animal. Los genes *MADS* se expresan de un modo específico lo cual está determinado por otros genes o procesos de señalización (Taiz y Zeiger, 2006).

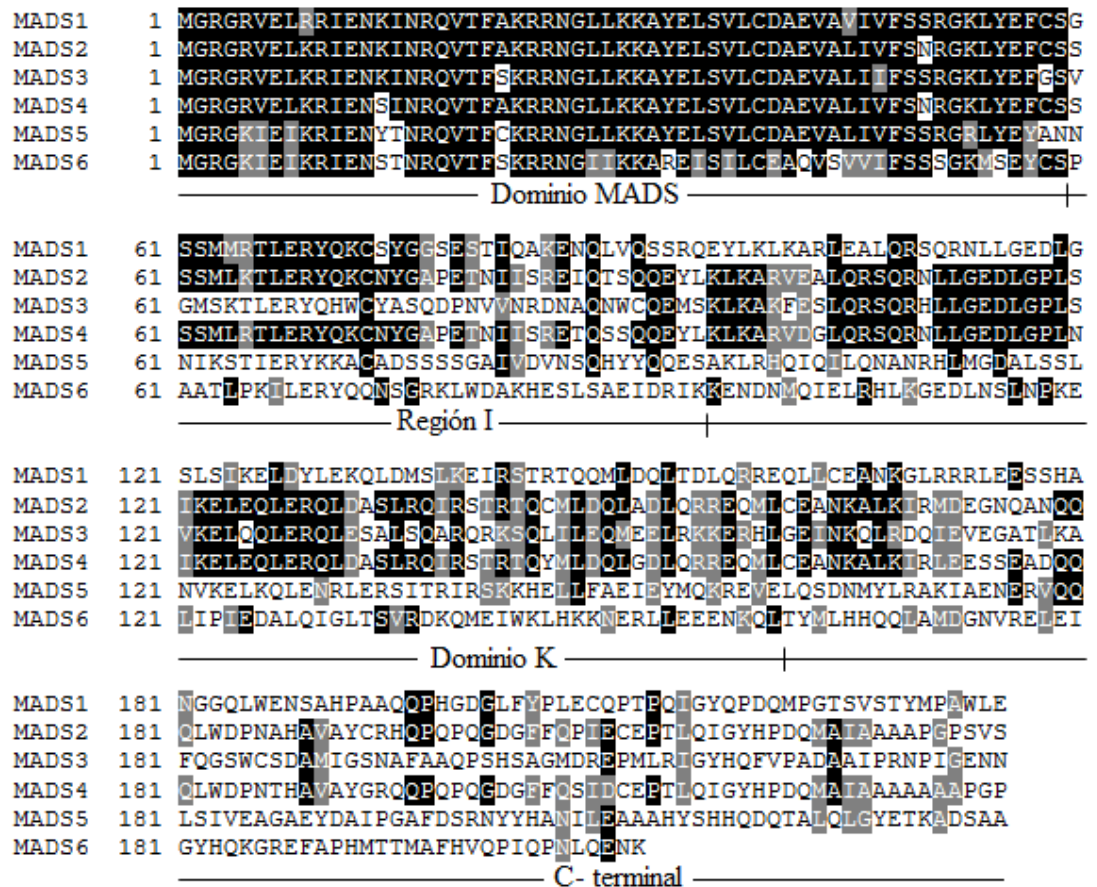


Figura 3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas tipo MADS identificadas en plátano: MADS 1(ACJ64679.1), MADS 2 (ACJ64678.1), MADS 3 (ACJ64680.1), MADS 4 (ACJ64681.1), MADS 5 (ACJ64682.1) y MADS 6 (ACJ64683.1). Se señalan los 4 dominios diferentes característicos de las proteínas MICK del tipo MADS.

HIPÓTESIS

Los genes que codifican para ACCO, MADS y PG presentan un aumento en su expresión y algunos parámetros fisiológicos se alteran después de la aplicación de tratamiento hidrotérmico en mango (*Mangifera indica* L. cv Kent).

OBJETIVOS

General

Evaluar los parámetros fisiológicos de firmeza y respiración, así como la expresión génica de ACCO, MADS y PG en los frutos de mango con aplicación de tratamiento hidrotérmico.

Particulares

- Determinar la producción de CO₂ en los mangos muestreados durante el periodo de maduración.
- Determinar el cambio de firmeza en mesocarpio de los mangos tratados hidrotérmicamente y de los no tratados.
- Evaluar la expresión génica de ACCO, MADS y PG en el mesocarpio de mangos control y tratados hidrotérmicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Mangos Variedad 'Kent' y Determinación de Variables Fisiológicas

Recolección de mangos 'Kent'

Los mangos fueron recolectados del rancho "San Isidro" en San José de Guaymas, Sonora (27°55'6"N, 110°53'56"O) y se transportaron al laboratorio en ambiente refrigerado. Los frutos se seleccionaron de acuerdo al tamaño y apariencia uniforme en su etapa de madurez fisiológica y fueron lavados en una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm. Después de secar los mangos, se procedió a almacenarlos a 20°C en condiciones de humedad relativa de 60-65% para los análisis fisiológicos, los muestreos y para la aplicación del tratamiento hidrotérmico.

Aplicación del tratamiento hidrotérmico

Los mangos se dividieron en dos lotes de 48 mangos cada uno. El tratamiento hidrotérmico (TH) se aplicó a un lote y el segundo lote se consideró como control (C). El TH consistió en sumergir el fruto en agua a 46.1°C durante 90 minutos. Una vez retirados del agua del tratamiento, los mangos se sumergieron en agua a 20°C con el fin de evitar la deshidratación del fruto. Posteriormente, ambos lotes (TH y C) fueron almacenados en una cámara de refrigeración a 20°C simulando la temperatura de mercadeo, con una humedad relativa entre 60 y 65%.

Tasa respiratoria

A tres frutos seleccionados en cada lote se les midió cada 3 días la producción de CO₂ (por triplicado), para lo cual se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 (Varian- USA). El cromatógrafo estaba equipado con detectores de ionización de flama (FID) y de conductividad térmica (TCD), una columna metálica de 2 metros de largo y 1/8" de diámetro interno, empacada con Hayesep N 800/100 (Watada y Massie, 1981). Los frutos se colocaron en contenedores sellados con condiciones de temperatura y tiempo controlados. Los gases se obtuvieron de la cabeza del contenedor y se realizó la lectura en el cromatógrafo utilizando un estándar de 5% de CO₂ (Praxair). Para calcular la producción de CO₂ de los mangos se utilizó la fórmula:

$$\text{mLCO}_2/\text{Kgh} = \frac{(\text{área de la muestra})(\text{concentración estándar})(\text{área espacio de cabeza})}{(\text{tiempo de incubación})(\text{área estándar})(\text{peso muestra})}$$

Pérdida de firmeza

La firmeza de los frutos se midió utilizando un penetrómetro digital Chatillon modelo TCM200. Se utilizó un punzón cónico de 8mm de diámetro y la medición se realizó en la pulpa del fruto para lo cual se retiró cuidadosamente la cáscara en la zona de evaluación. Se midió firmeza a los frutos tratados y no tratados hidrotérmicamente, la cual se representó en Newtons (N) y se realizaron cuatro repeticiones en cada caso.

Expresión de los Genes ACCO, MADS y PG en Mesocarpio de Mango

Extracción de RNA total

Para la obtención de RNA total se siguió la metodología descrita por López-Gómez y Gómez-Lim (1992), la cual se basa en la precipitación selectiva de carbohidratos utilizando iones potasio y 20% de etanol. Se tomaron 0.5 g de tejido pulverizado de mesocarpio de mango, al cual se le adicionó 1 mL de una solución de extracción (Tris-Base 150 mM, pH7.5, ácido bórico 1 M, SDS al 2%, EDTA 50 mM y β -mercaptoetanol al 1%), el último añadido inmediatamente antes de realizar la extracción. Se mezcló por vórtex y se le añadió 0.25 volúmenes de etanol absoluto y 0.11 volúmenes de acetato de potasio 5 M. Se agitó vigorosamente por 1 min y se adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1. Se agitó vigorosamente con la mano y posteriormente se centrifugó a 20,000 x g a 4°C durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionaron 2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 49:1 formando una emulsión por agitación vigorosa con la mano, se centrifugó nuevamente en bajo las mismas condiciones y se recuperó la fase acuosa.

El RNA total se precipitó utilizando cloruro de litio en una concentración final en la muestra de 3 M. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 20000 x g por 10 minutos a 4°C. El RNA precipitado se lavó dos veces con etanol al 75% y por último se resuspendió en agua libre de RNasas. Se realizó la cuantificación utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis y se midió la relación de las absorbancias para la estimación de la pureza del RNA las cuales indican la contaminación a causa de la presencia de proteínas, fenoles, sales o solventes. Se obtuvo RNA de la pulpa de los mangos muestreados los días 4, 6, 8 y 12 después de aplicado el tratamiento.

Evaluación de la integridad del RNA total

Se llevó a cabo un análisis electroforético para observar la integridad de RNA extraído de cada muestra empleando un gel desnaturizante de agarosa al 1% preparado con solución de corrida MOPS 1X (MOPS 0.2 M, pH 7.0, acetato de sodio 20 mM y EDTA 10 mM, pH 8.0), al cual se le adicionó 5.1 mL de formaldehído. Se cargó 1 µg de RNA total utilizando solución de carga para RNA 6X (0.75 mL de formamida deionizada, 0.15 mL de MOPS 10X, 0.24 mL de formaldehído, 0.1 mL de agua libre de RNasas, 0.1 mL de glicerol y 0.08 mL de azul bromofenol al 10%) y se adicionó bromuro de etidio directamente a la muestra en una concentración de 1mg/ µL (Fourney *et al.*, 1988). Se realizó el análisis del gel utilizando un transiluminador UV y un equipo de fotodocumentación digital (Kodak DS DC120).

Eliminación de DNA genómico

Para eliminar el DNA contaminante de las muestras de RNA total, se empleó la enzima DNasa I (Roche) dando resultados favorables en un tiempo de incubación de 23 min a 35°C utilizando 2.5 unidades de enzima por cada 1 µg de RNA total. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió con la eliminación de la enzima, para lo cual se aforó la reacción a 100 µL empleando agua libre de RNasas. Se adicionó 1 µL de EDTA 0.5 M a pH 8.0, 2 µL de acetato de sodio 3 M a pH 5.2 y 100 µL de solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Se mezcló mediante vórtex y

se centrifugó a 12000 x g durante 6 min a 4°C. La fase superior se transfirió a un tubo limpio y se adicionaron 300 µL de etanol absoluto frío y 10 µL de acetato de amonio 5 M para llevar a cabo a precipitación del RNA incubando por 2 h a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 13000 x g durante 20 min a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNasas.

Síntesis de cDNA por transcripción reversa

Para evaluar la expresión de los genes que codifican para las enzimas ACCO, MADS y PG en mesocarpio de mango, se procedió como primer paso a la síntesis de DNA complementario (cDNAs). Se utilizaron 2 µg de RNA total para la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa, utilizando el sistema comercial QuantiTect RT de QIAGEN. Este protocolo consistió en agregar a los 2 µg de RNA total, 4 µL de solución 7X (DNAg wipe out buffer) que elimina el DNAg que pudiera estar contaminando la muestra, se ajustó el volumen a 28 µL con agua libre de RNasas y se incubó por 2 min a 42°C. Ésta reacción se pasó a hielo inmediatamente. Para la reacción de la transcripción reversa, se agregaron 2 µL de la enzima transcriptasa reversa, 8 µL de solución amortiguadora 5X (Quantiscript RT Buffer) y 2 µL de mezcla de oligonucleótidos (RT Primer Mix). La reacción se incubó a 42°C por 30 minutos y para inactivar la enzima se incubó por 3 min a 95°C. Se realizó la síntesis de cDNA de cada uno de los frutos ó unidades experimentales correspondientes a los días 4, 6, 8 y 12 poscosecha de los mangos control y con tratamiento hidrotérmico.

Amplificación de los fragmentos internos de los genes ACCO, MADS y PG a partir de cDNA de mesocarpio de mango

Se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando como templado 50 ng de cDNA, bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 min como paso de desnaturalización y posteriormente 35 ciclos de: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Las reacciones de amplificación se realizaron con los siguientes componentes: 2 µL de solución para PCR 10X (compuesta por Tris-HCl 200 mM pH 8.4 y KCl 500 mM), 2 µL de dNTPs 10 mM, 2 µL de oligonucleótidos 10 µM, 0.6

μL de MgCl_2 y 1.25U de la enzima polimerasa (Invitrogen), ésta reacción fue aforada a 20 μL con agua libre de DNAsas. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador DNAEngine® de BIO-RAD. Los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de los diferentes genes se muestran en la Tabla 1.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando como solución de corrida TBE 0.5X compuesta por Tris-base 0.2 M, ácido bórico 0.4 M y EDTA 0.5 M, pH 8.0. La corrida electroforética se realizó a 60 V por 1 h, cargando en el gel 10 μL de reacción de PCR y 2 μL de solución de carga 6X. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). El gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.67 mg/mL durante 5 minutos para su tinción. El gel se fotografió utilizando un transiluminador UV y un equipo de fotodocumentación digital.

Tabla 1. Oligonucleótidos para análisis de expresión génica

Nombre	Fw 5'-3'	Rv 5'-3'	Amplificación
PG	AATCCACCTGCAGAACTC	AATCCACCTGCAGAACTC	200 pb
ACCO	AAGSTGGGCAGTGGATTGAT	TTGCCATCTCTTTGAGCAAC	133 pb
MADS	GTGATGCTGAAGTTGCTCTC	ACACCTTTGGTATCGCTCAAGAG	104 pb
GAPDH	GTGGCTGTTAACGATCCCTT	GTGACTGGCTTCTCATCGAA	140 pb

Cuantificación relativa de la expresión génica de ACCO MADS y PG por PCR en tiempo real

El análisis de la expresión relativa para cada gen de interés, se realizó utilizando 12.5 μL de la mezcla comercial iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD), 0.7 μL de oligonucleótido Fw y 0.7 μL de oligonucleótido Rv de una concentración de 5 μM , se utilizó 50 ng de cDNA (equivalentes de RNA poliadenilado) como templado, derivado de 2 μg de RNA total, y las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 μL adicionando 10.1 μL de agua libre de DNAsas. Como control negativo se hicieron tres reacciones en las cuales el templado (cDNA) fue sustituido por agua. Las reacciones se realizaron por triplicado y se corrieron bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 min,

40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 35s, 72°C por 5 5s en un termociclador de tiempo real Rotor-Gene™ Real-time Analyzer (Corbett Life Science).

Análisis de Datos de Parámetros Fisiológicos y de PCR en Tiempo Real

Para la determinación de las diferencias estadísticas de los resultados obtenidos en las mediciones de los parámetros fisiológicos y de expresión génica, se realizó un análisis de varianza simple con diseño completamente al azar. Los análisis estadísticos de varianza fueron calculados tomando en cuenta los tratamientos y el tiempo de almacenamiento usando el programa estadístico NCSS, 2001. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

En el análisis de la expresión génica se llevaron a cabo corridas experimentales con el fin de corroborar la amplificación de un solo producto en la reacción de PCR, observándose mediante PCR en tiempo real la curva de disociación y la ausencia de formación de dímeros de los oligonucleótidos. Para llevar a cabo el análisis de expresión génica se empleó el valor de Ct (cycle threshold) por sus iniciales en inglés. El Ct es un valor matemático que indica el ciclo en el cual la fluorescencia generada cruza un punto umbral que indica el producto amplificado generado durante la primera fase exponencial de la reacción. El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de transcrito presente en la muestra.

El cambio en la expresión génica durante el periodo de almacenamiento para los mangos control fue analizado con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ según el procedimiento de Livak y Schmittgen (2001). Se consideró el cambio en la expresión génica realizando una comparación con los niveles de expresión génica en el día de madurez menos avanzado (día 4). Éste análisis se hizo mediante la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = (Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen constitutivo}})_{\text{Tiempo } x} - (Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen constitutivo}})_{\text{Tiempo } 0}$$

En donde el tiempo 0 es el tiempo de referencia (día 4) y el tiempo X son los días de almacenamiento poscosecha en este estudio. Para determinar el cambio en la expresión de los genes de interés por efecto de la aplicación del tratamiento

hidrotérmico, se empleó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ siguiendo el procedimiento descrito por Schmittgen y Livak (2008) en donde se empleó la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{[Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen constitutivo}] (\text{Frutos con TH})}{[Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen constitutivo}] (\text{Frutos control})}$$

En ambos casos, la normalización de los datos se realizó con la expresión del gen constitutivo gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, GAPDH, por sus siglas en inglés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tasa Respiratoria

Los resultados de la producción de CO₂ de los mangos con y sin tratamiento hidrotérmico se muestran en la Figura 4, en donde se observa un incremento en la respiración con respecto al tiempo de almacenamiento. No se encontraron diferencias significativas en la respiración en los mangos con TH en comparación con el lote control ($p>0.05$). Sin embargo, en la gráfica se puede observar el comportamiento climatérico característico en la respiración de los mangos. Se observa un máximo en la producción de CO₂ en el día 12 para los mangos control, con una producción de 59.54 mL/kg h y en los mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico se observó un máximo de respiración en el día 14 con una producción de 64.54 mL de CO₂/kg h. Lo anterior indica un retraso en el climaterio de los mangos con aplicación de tratamiento hidrotérmico. Este retraso de dos días en la aparición del pico climatérico se ha observado en mango con aplicación de estrés por calor con vapor de agua a una temperatura de 46°C durante 4 h (Mitcham y McDonald, 1993). También se ha observado en frutos de chirimoya con aplicación de tratamiento hidrotérmico con agua a 52°C durante 60 min (Alique *et al.*, 2009) sin ser significativo este retraso en la vida poscosecha de los frutos. Sin embargo, se observa que la aplicación de calor genera cambios en el mecanismo de respiración.

Por otro lado, los valores máximos de respiración obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por Zamora y cols. (2004) para mango 'Kent' tratado hidrotérmicamente que presentó un máximo de respiración en el día 6 en condiciones de 27°C produciéndose una cantidad de 62.7 mL CO₂/Kg h. La diferencia en la temperatura de almacenamiento entre nuestro estudio (20°C) y el reportado por Zamora y cols., puede explicar la diferencia en días del pico climatérico de los mangos.

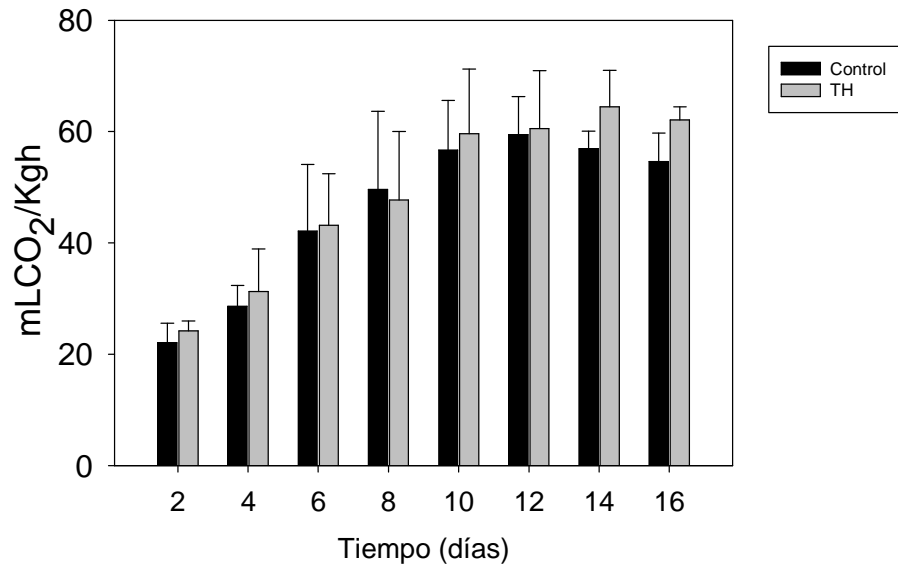


Figura 4. Producción de CO₂ de los frutos de mango variedad 'Kent' cosechados en su estado de madurez fisiológica y almacenados a 20°C durante 16 días. Se representa la media de tres repeticiones ± desviación estándar (DS) ($p > 0.05$).

La temperatura tiene gran influencia en la actividad metabólica del tejido vegetal, en donde las reacciones del metabolismo del fruto incrementan cuando se aumenta la

temperatura (Bron *et al.*, 2005). De tal manera que los mangos almacenados a 27°C maduraron más rápido que nuestros mangos almacenados a 20°C.

En estudios realizados en mango de la variedad Tommy Atkins, con tratamiento hidrotérmico (Pérez-Rivero *et al.*, 2004), bajo condiciones experimentales similares a las del presente estudio, la producción de CO₂ presentó valores más bajos que los mangos control. Lo anterior se puede deber a que la respiración de los frutos en respuesta a la aplicación de calor, depende de factores pre y postcosecha, tiempo de exposición al estrés por calor y la variedad del fruto (Lurie, 1998).

Pérdida de Firmeza

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos de la medición de firmeza (Newtons) en los frutos tratados hidrotérmicamente y los controles. Los valores máximos de firmeza se encontraron en el día 2 de almacenamiento para ambos lotes de mangos, mientras que los valores mínimos se observaron en el día 16 de almacenamiento, encontrándose diferencias entre mangos tratados por el efecto del TH ($p < 0.05$).

En el día 8 de almacenamiento se observó que la firmeza de los mangos tratados hidrotérmicamente se redujo en un 74.2% y en el día 10 un 44.5%, con respecto a los mangos control en esos días, mientras que para los mangos control, la firmeza se redujo en el día 12 de almacenamiento, presentando una disminución de firmeza de 84% con respecto a la observada en el día 10. La pérdida en firmeza de los mangos con TH respecto a los controles, presentaron un adelanto de 4 días. La pérdida de firmeza en los frutos sometidos a tratamiento hidrotérmico se ha observado que es más acentuada cuando la exposición al calor es por periodos cortos, esto pudiera deberse a que el tratamiento con agua caliente contribuye a la activación de enzimas hidrolíticas (Luna *et al.*, 2006). Esta activación se lleva a cabo en un corto periodo de tiempo siendo la razón por la cual se observa la drástica pérdida de firmeza de los mangos tratados con respecto al control (Paull y Jung, 2000). Luna y cols. (2006), reportaron que en mango de la variedad 'Ataulfo' sometidos a tratamiento hidrotérmico la firmeza disminuía en un 50% con respecto a los mangos control en el día 6 de su almacenamiento a temperatura ambiente. De manera que en los mangos con tratamiento hidrotérmico en nuestro estudio, la pérdida de firmeza es mayor en porcentaje, pero se observa hasta el día 8 de almacenamiento a 20°C.

La respuesta del mango a tratamientos con aplicación de calor depende de la variedad del mango, la madurez del fruto, las condiciones de crecimiento, y de manera específica, el tiempo de exposición del fruto al estrés por calor (Ketsa *et al.*, 1998). En la

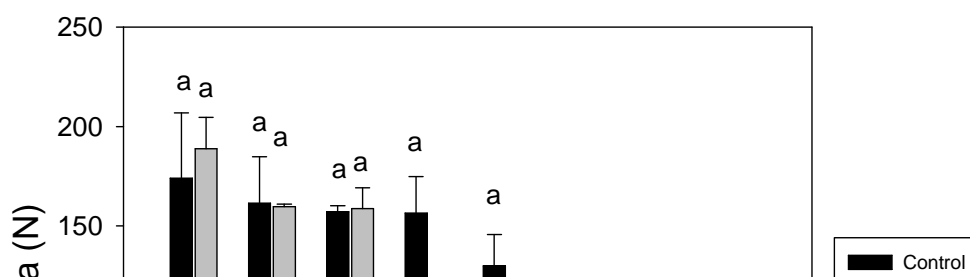


Figura 5. Pérdida de firmeza de los frutos de mango variedad 'Kent' en el proceso de maduración de frutos tratados hidrotérmicamente y controles por efecto del TH. Se representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar (DS). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

aplicación de tratamiento con calor en frutos se ha observado una drástica pérdida de firmeza en frutos de zapote mamey, mango y pèrsimo, atribuido principalmente por los

acelerados cambios que se presentan en la síntesis de las enzimas PME y PG en la pared celular (Ariza-Flores *et al.*, 2009; Luna *et al.*, 2006; Özdemir *et al.*, 2009).

Expresión Relativa de los Genes *ACCO*, *MADS* y *PG* en Mesocarpio de Mango

Extracción de RNA total y evaluación de la integridad

En la Figura 6 se observan las bandas correspondientes a las subunidades de RNA ribosomal indicando que el RNA total obtenido del mesocarpio del mango no se encontraba degradado por el proceso de extracción. Las relaciones de absorbancia 260/280 se obtuvieron con un promedio de 2.0 mientras que la relación 260/230 fue de 2.4 indicando de esta manera un RNA total con buena integridad.

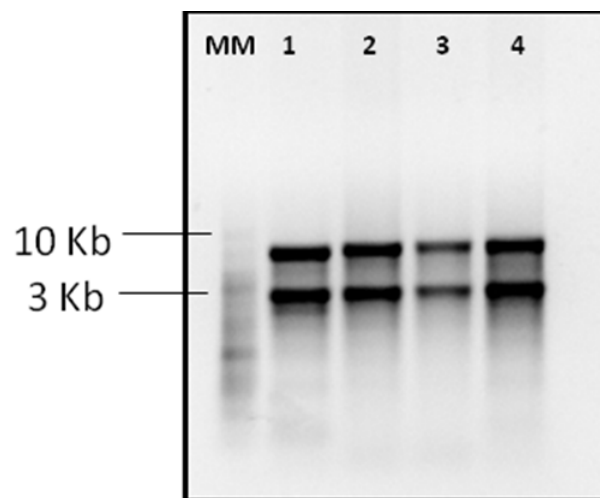


Figura 6. Análisis de RNA en Gel de agarosa 1% en condiciones desnaturalizantes. MM: Marcador molecular 0.5-10 Kb RNA Ladder. Carriles 1-4: RNA total de mesocarpio de mango.

Eliminación de DNAg contaminante del RNA total

En la Figura 7 se observaron muestras de RNA total después del proceso de eliminación de DNA genómico utilizando la enzima DNasa I y su posterior eliminación con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La presencia de las bandas correspondientes a RNA ribosomal demuestra la integridad del RNA total. El RNA libre de DNA genómico se utilizó para las reacciones de transcripción reversa (RT) para la síntesis de cDNAs.

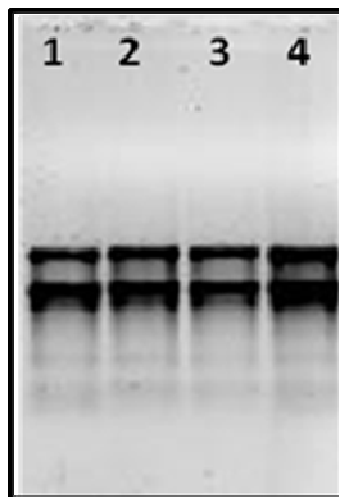


Figura 7. Análisis de RNA en Gel de agarosa 1% en condiciones desnaturizantes. Carriles 1-4: RNA total de mesocarpio de mangos de diferentes días de almacenamiento poscosecha libre de DNA genómico.

Amplificación de fragmentos de genes de interés por PCR

En la Figura 8 se muestra los análisis de la amplificación de los genes de interés en geles de agarosa al 1%. En los paneles a) y b) se observa la amplificación de una sola banda de los genes *ACCO*, *MADS*, y *GAPDH*, este último empleado como gen normalizador de los datos de expresión. En el panel c), la amplificación para PG de una sola banda (carril 3) se logró con los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 1. En el carril 2 se muestra la amplificación de un fragmento de otro gen de PG (banda más intensa) de la cual no fue posible analizar su expresión debido a la amplificación de otras bandas (poco visibles de mayor tamaño).

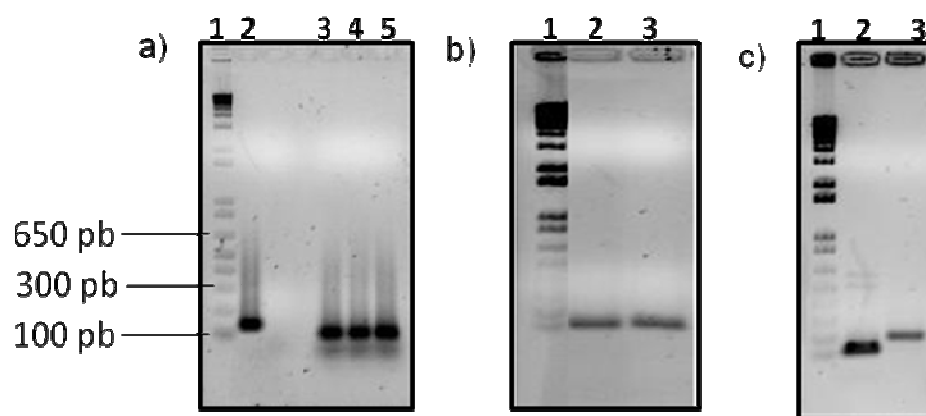


Figura 8. Análisis electroforético de los amplicones de los genes de interés utilizados en la evaluación de la expresión génica. Panel a): Carril 1 Marcador molecular (MM) 1Kb DNA Ladder Plus; Carril 2, amplificación de *GAPDH*; Carriles 3 al 5, amplificación de *MADS*; Panel b): Carril 1 MM; Carriles 2 y 3, amplificación de *ACCO*. Panel c): Carril 1 MM; Carril 2, amplificación de *PG*; Carril 3, Amplificación de *PG*.

Expresión relativa de ACCO -Producción de etileno

En las mediciones realizadas para la detección de la producción de etileno en la maduración de los mangos 'Kent' durante el almacenamiento, no fue posible la detección de este gas debido a que generalmente se producen escala de nL/gh. Sin embargo, en estudios realizados en frutos climatéricos tales como kiwi chino, albaricoque japonés, aguacate y papaya (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 1999; Mitaa *et al.*, 1999; López-Gómez *et al.*, 2004; Hershkovitz *et al.*, 2009), y no climatéricos como naranja y pimiento verde (Whittaker *et al.*, 1997; John-Karuppiah y Burns, 2010), se ha podido correlacionar los niveles del transcrito de ACCO con la producción de etileno.

En la Figura 9 se muestra la expresión relativa del gen que codifica para ACCO en los mangos durante su maduración. Para el análisis de expresión génica, se seccionó de manera arbitraria como nivel de referencia la cantidad de transcrito del día 4 de almacenamiento que se encontraba en el estado fisiológico conocido como verde-maduro. Se encontraron diferencias en los niveles de expresión cuando se comparó entre los días 4 y 12 de almacenamiento ($p < 0.05$). Se observó que para los días 6 y 8, la expresión de ACCO aumentó 4 veces y se alcanzaron los niveles máximos para el día 12 en el cual la expresión aumentó 8 veces sin existir diferencias estadísticas en la expresión génica entre los días 6, 8 y 12. Sin embargo, existe una correlación muy clara entre la producción de etileno en el día 12 y el pico climatérico que se muestra en la Figura 4 en la respiración de los frutos de mango control. Lo mismo se observó en estudios de expresión génica de ACCO en papaya, en donde el incremento en la producción de etileno durante la maduración se pudo correlacionar con un aumento de transcrito de ACCO, además de observarse un incremento dramático en mRNA de ACCO en el punto máximo de producción de etileno (López-Gómez *et al.*, 2004).

En las evaluaciones fisiológicas realizadas a los frutos, se observó que la firmeza para los frutos control, disminuyó de manera significativa en el día 12 de almacenamiento ($p < 0.05$). Lo anterior demuestra que la elevada expresión de ACCO se encuentra correlacionada con el aumento autocatalítico de etileno ya que la pérdida de

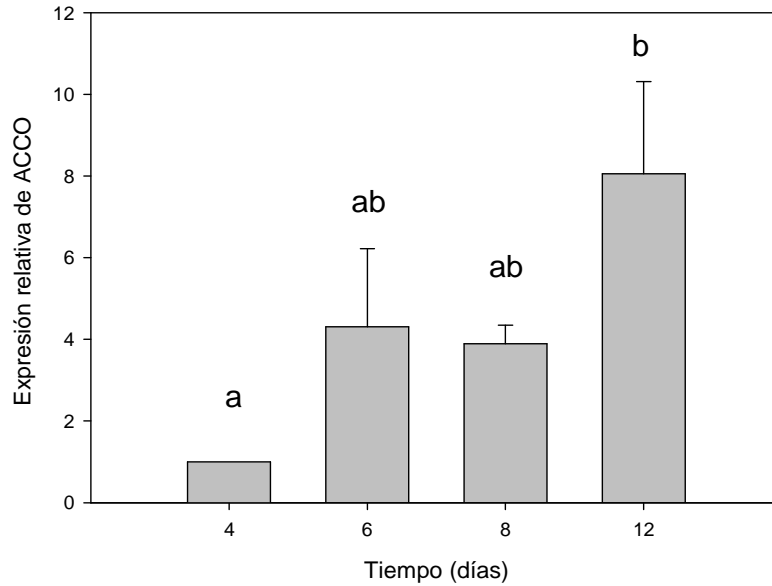


Figura 9. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima ACC oxidasa en la maduración del mango 'Kent' (Mangos control). Las barras muestran la media \pm ES de seis mediciones ($n=6$). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Duncan ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como referencia el día 4 poscosecha.

firmeza es uno de los procesos más sensibles al etileno y se ha demostrado que la acumulación de mRNA de PG es regulada por el etileno (Osuna-García *et al.*, 2007). La expresión génica de ACCO mostrada en este estudio en el transcurso de la maduración de los mangos, correlaciona con los cambios fisiológicos presentados en la maduración. Resultados similares se han observado en frutos climatéricos como el tomate, en donde la expresión de ACCO se encuentra relacionada con la maduración y producción de etileno del fruto (Anjanasree *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios de cosupresión de la expresión de ACCO en papaya, no inhiben la producción total de etileno en el fruto, sugiriendo que la maduración de este fruto requiere de la expresión de más de un miembro de la familia de ACCO (López-Gómez *et al.*, 2009).

Cambios en la expresión génica de ACCO por efecto del tratamiento hidrotérmico

Los efectos de la aplicación del tratamiento hidrotérmico sobre la producción de etileno se estudió cuantificando la expresión relativa de ACCO en el mesocarpio de los mangos tratados comparados con el control, esto debido a que los niveles de etileno fueron indetectables con el equipo disponible. En la Figura 10 se observa que para el día 4 de almacenamiento la expresión de ACCO se redujo 10 veces debido al TH aplicado a los frutos, encontrándose diferencias con respecto a los otros días de almacenamiento ($p < 0.05$). La reducción en los niveles de expresión de ACCO concuerda con lo reportado en mango de la variedad 'Nam Dokmai', en donde la producción de etileno se inhibe en su totalidad en el día 3 después de la aplicación del estrés por calor, superando posteriormente la producción de etileno de los mangos control. Este comportamiento es similar al observado en otros frutos climatéricos sometidos a estrés por calor o frío (Ketsa *et al.*, 1999; Hershkovitz *et al.*, 2009). La disminución observada en los niveles de ACCO se esperaba por el efecto del calor, así como la recuperación en la expresión. Los resultados obtenidos muestran que los niveles del transcrito o mRNA de ACCO concuerdan con los niveles de la enzima codificada, la ACCO, y sirven de referencia para estudios futuros.

En estudios reportados para mango 'Keitt' con TH, los niveles de producción de etileno aumentaron después de la aplicación de calor, alcanzando un máximo en el día 4 de almacenamiento a 12°C. El comportamiento de la producción de etileno en los mangos 'Keitt' fue diferente al reportado por Ketsa y cols (1999), quienes detectaron 5 días de retraso en la aparición de la producción máxima de etileno, en mangos tratados con aire caliente a 38°C por 3 días. Estas diferencias se atribuyen mayormente a la duración de la aplicación de calor en los frutos en ambos estudios (Bender, *et al.*, 2003). El retraso en la aparición del climaterio en los frutos de mango con TH se observó en nuestro estudio coincidiendo con lo reportado por Ketsa y cols. (1999).

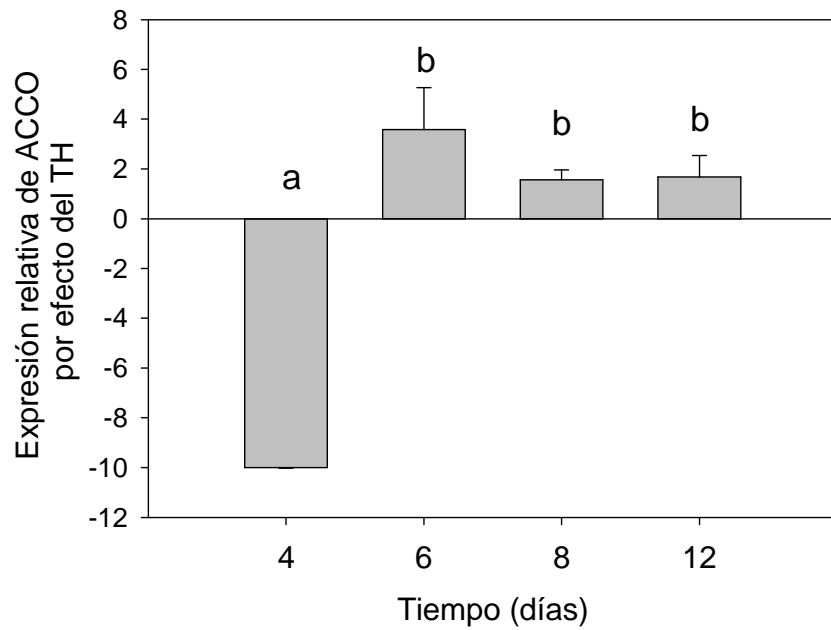


Figura 10. Expresión relativa del gen que codifica para la enzima ACCO por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Kent'. Las barras muestran la media \pm ES de seis mediciones ($n=6$). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Duncan ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Schmittgen y Livak (2008).

Investigaciones realizadas en mango 'Manila' (Lagunes *et al.*, 2007) y con aplicación de TH, la producción de etileno presentó un aumento en el día 5 de almacenamiento existiendo una correlación con la actividad de ACCO. Los autores concluyeron que la aplicación del TH no afecta la actividad de la enzima; sin embargo, en ese estudio no se evaluó la expresión génica de ACCO.

El comportamiento de las diferentes variedades de mangos en respuesta al estrés por calor, es variable debido a que existen múltiples factores que intervienen en la respuesta del fruto, tales como la variedad, las condiciones pre y poscosecha, así como el tipo de aplicación de calor (aire o agua). La duración de la exposición del fruto a elevadas temperaturas e incluso el tiempo de eliminación de calor después de la aplicación del tratamiento también afecta los resultados (Lurie, 1998; Paull y Jung, 2000). En nuestro trabajo, los efectos en la producción del etileno por la aplicación del TH, fueron similares al mango de la variedad 'Nam Dokmai' expuesto a un periodo prolongado de calor mediante aire, sugiriendo que la variedad 'Kent' es muy susceptible al daño por calor y que afecta principalmente la producción de etileno.

Cambios en la expresión génica de *MADS* por efecto del tratamiento hidrotérmico

En la Figura 11 se muestra la expresión relativa del gen del factor de transcripción *MADS* y los efectos de la aplicación del TH a los mangos, en los días 4, 6 y 8 postratamiento. En los días de almacenamiento no se detectaron diferencias ($p > 0.05$) en la expresión de *MADS* en los mangos, se mantuvieron niveles constantes. En nuestro análisis, a pesar de no encontrar diferencias estadísticas, la expresión génica de *MADS* por efecto del TH en la maduración aumentó levemente en el día 8 de almacenamiento.

En trabajos realizados en manzana indican que un gen *MADS* (*MADS4*) se expresa durante el desarrollo del fruto, mientras que otros genes *MADS* identificados en este fruto se expresan en el meristemo floral (Sung *et al.*, 2000). Estudios dirigidos a la expresión génica de *MADS* en las diferentes etapas de maduración de los frutos son escasos. La atención se ha centrado a identificar factores de transcripción tipo *MADS* relacionados con la identidad y desarrollo de órganos florales (García-Moroto *et al.*, 2003). Sin embargo, es necesaria la identificación de estos genes que regulen el proceso de maduración de frutos de interés particular o especial.

En la pulpa del plátano se identificaron 6 genes *MADS*, y se observó que *MADS* 3, 4, 5 y 6 correlacionan con la producción de etileno, aumentando su expresión hasta 16 veces en la presencia de etileno. Por otro lado, *MADS* 1 y 4 son regulados negativamente por el etileno en el climaterio. Éstos resultados sugieren que la expresión de genes *MADS* tiene una función durante el climaterio del fruto (Elitzur *et al.*, 2010). De igual manera, en el estudio realizado por Liu y cols (2009) en plátano, se observó que la expresión génica de dos genes *MADS* es inducida por etileno durante la maduración.

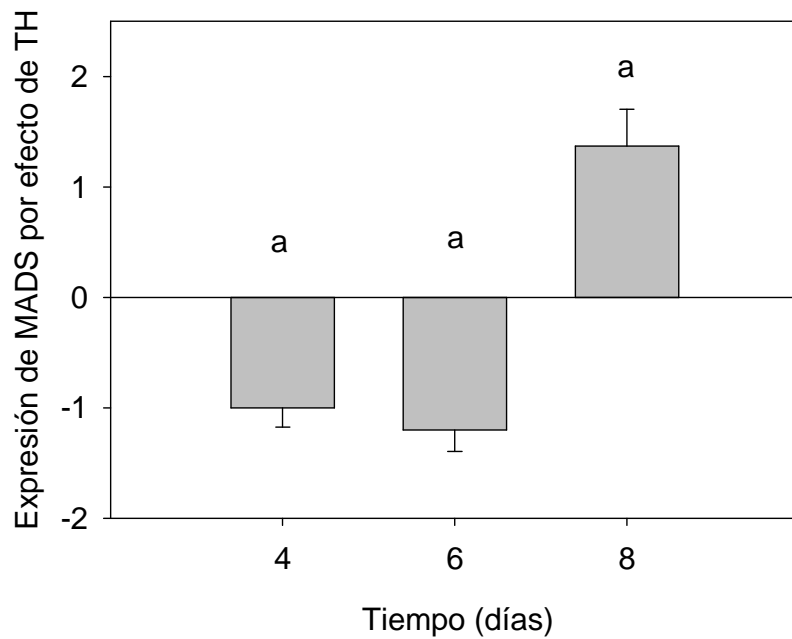


Figura 11. Expresión relativa del gen que codifica para el factor de transcripción MADS por efecto del TH en mangos 'Kent'. Las barras muestran la media \pm ES de seis mediciones ($n=6$). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Duncan ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Schmittgen y Livak (2008).

Debido a que en éste estudio no se observó un efecto sobre la expresión de *MADS* por el TH, a diferencia de lo observado en *ACCO* en donde el tratamiento provocó el aumento en la producción de etileno, es posible que *MADS* esté regulado negativamente por el etileno. Sin embargo, es necesario un análisis más amplio en la expresión génica de *MADS* que incluya más días de almacenamiento poscosecha ya que debido a problemas técnicos no fue posible un análisis de expresión para *MADS* en el día 12 postratamiento. Estudios de mutantes de tomate *rin* indican que los genes *MADS* participan regulando la maduración de los frutos, incluso en frutos no climatéricos como la fresa, sugiriendo la posibilidad que los genes *MADS* actúen como reguladores globales del desarrollo del fruto (Causier *et al.*, 2002).

Cambios en la expresión génica de *PG* por efecto del tratamiento hidrotérmico

La amplificación y clonación de los productos de PCR en donde se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento del gen de *PG* en mesocarpio de mango, indican que existen al menos dos isoformas de *PG*. Las secuencias nucleotídicas de los clones obtenidos que fueron analizadas se muestran en la Figura 12. En otras variedades de mango como 'Alphonso' y 'Dashehari' se han identificado diferentes isoformas de *PG* denominadas PGI, PGII y PGIII. En la variedad 'Alphonso' se observaron diferencias entre las tres isoformas en cuanto a la especificidad por diferentes sustratos derivados de polímeros de pectina (Prassana *et al.*, 2006; Yashoda *et al.*, 2006). Las isoformas encontradas en mango de la variedad 'Dashehari' presentaron diferencias en las propiedades fisicoquímicas comparadas con las encontradas en la variedad 'Alphonso'.

En este trabajo, el estudio de la expresión génica de *PG* en mango sólo pudo llevarse a cabo de la isoforma II, esto debido a que los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la isoforma I mostraron productos inespecíficos tal como se muestra en la Figura 8, panel c, y fue imposible realizar nuevos diseños de iniciadores debido al tamaño de la secuencia de tan sólo 161 pb, las bandas de mayor tamaño que se observan de manera tenue no se obtuvieron en los clones analizados y queda pendiente su clonación y análisis de secuencias.

El efecto de la aplicación de estrés por calor en los frutos de mango 'Kent' en la expresión del gen que codifica para *PG*, se muestra en la Figura 13. Se observan diferencias en la expresión de *PG* en el día 12 después de aplicado el tratamiento, la cual aumentó 16 veces con respecto al control ($p < 0.05$). Estos resultados correlacionan con la producción máxima de etileno evaluada como expresión de *ACCO* que se muestra en la Figura 9.


```

IsoformaI -----
IsoformaII GGCTTCTAACACCGATGGAATCCACCTGCAGAACTCCCAAAATGTGCTCATTATAGCAG 60

IsoformaI -----GGCTTCTAA--CACCGATGGAATCCACATTACGGCA-TCACATCG 42
IsoformaII CACTCTTGCTTGTGGTAATTCTAAACCTCCAACACACTTCATCCTTTTACAATCACAAC 120
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

IsoformaI TGTTCAAGTCAAAAAGTGCATTGTAAGAACAGGAGATGACTGTGTCTCTATAGTCAGCAA 102
IsoformaII AATACTGAGTTACCACTGCATTTTA---GCAGGAGATGATTGTGTATCTATATAAACCCAG 177
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IsoformaI TTCTTCACGAATCCAAATCAAAAATATTGTCTGTGGACCAGGCCATGGAATCAGAAGCC 161
IsoformaII ATGTTCTAACGTATACATTACAATGTGAAGTGTGGACCAGGCCATGGAATCAGAAGCC 236
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 12. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de los fragmentos de PGs de mango generadas con oligonucleótidos específicos.

Los cambios detectados en la firmeza de los frutos por efecto del TH no correlacionan con la expresión de *PG* en donde los niveles más altos de expresión se detectaron en el día 12, sin embargo, el cambio en la firmeza observado en los días 14 y 16 postratamiento, pudiera deberse a los cambios en la expresión de *PG* observado en el día 12.

Estudios realizados en kiwi demuestran que las isoformas de *PG* actúan en diferentes etapas de la maduración, en donde una de las isoformas de *PG* se expresa en el último estado de maduración del kiwi, la cual coincide con el máximo en la producción de etileno (Wang *et al.*, 2000), lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio. De igual manera, evidencia de expresión de *PG* en etapas tempranas de maduración en kiwi sugieren que la falta de correlación entre la firmeza observada en los mangos y la expresión de *PG* en nuestro estudio, pudiera deberse a la presencia de isoformas, mismas que se amplificaron en mesocarpio de mango y que se muestran en la Figura 8, panel c. La presencia de dos isoformas de *PG* en mesocarpio de mango sugiere que la pérdida de firmeza en los mangos pudiera estar relacionada con la expresión de alguna de las otras isoformas identificadas en las reacciones de RT-PCR a partir de la pulpa de los mangos del estudio. Los genes que codifican para *PG* son generalmente familias compuestas por más de un miembro (Hadfield y Bennett, 1998). Sin embargo, estudios realizados en papayas tratadas con 1-MCP (un inhibidor de la maduración por competencia con el etileno en las proteínas receptoras) reportaron la inhibición de la transcripción de *PG* pero no se observó inhibición del ablandamiento del fruto. Lo anterior pone en evidencia que el cambio en la firmeza es el resultado de la acción de un conjunto de enzimas hidrolíticas pre-existentes o independientes de etileno (Fabi *et al.*, 2009). Por lo que el cambio en la firmeza de los mangos por efecto del TH pudiera deberse a la acción de otras enzimas como la β -galactosidasa y pectato liasa ya que se ha encontrado que la actividad de estas enzimas se encuentra correlacionada con la pérdida de firmeza en mango de la variedad 'Harumanis' y 'Dashehari', respectivamente (Ali *et al.*, 1994; Chourasia *et al.*, 2006).

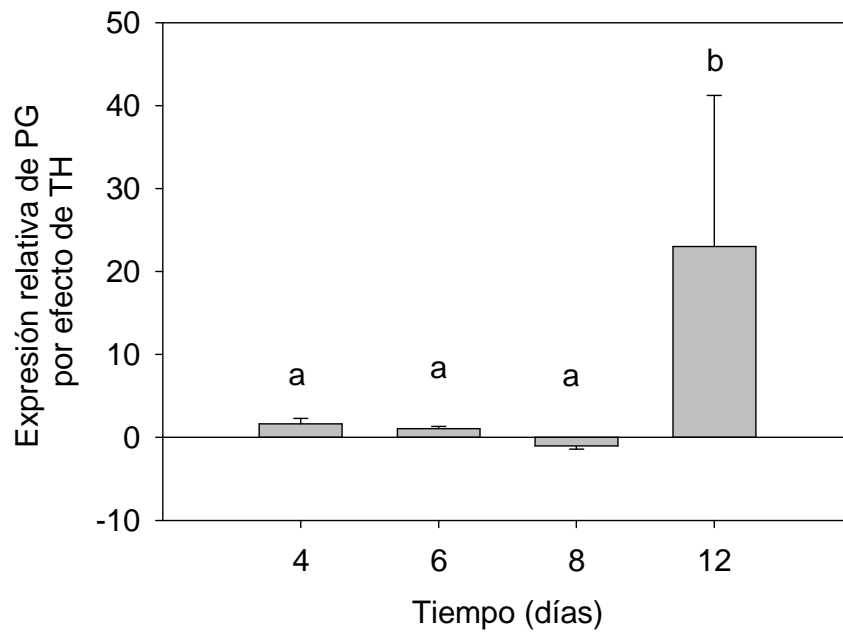


Figura 13. Expresión relativa del gen que codifica para PG por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Kent'. Las barras muestran la media \pm ES de seis mediciones ($n=6$). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Duncan ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Schmittgen y Livak (2008).

CONCLUSIONES

El TH aplicado en mangos de la variedad 'Kent' retrasa el climaterio en los frutos y afecta parámetros de calidad como la firmeza, mientras que la producción de etileno se ve reducida en los primeros días después de la aplicación de estrés por calor y se recupera posteriormente, continuando con su maduración normal. De esta manera, los cambios en la fisiología de frutos por efecto del TH son mínimos tomando en cuenta las ventajas que presenta su eficacia al eliminar la larva de la mosca de la fruta, por lo que el TH se aplica siempre a frutos de mango que serán exportados o comercializados en zonas libres de la plaga.

Al evaluar los efectos de la aplicación de TH a nivel de expresión de genes, se encontró que la expresión de los genes que codifican para *ACCO* y *PG* se ve afectada por el TH. Los niveles de *PG* aumentaron de manera significativa coincidiendo con el climaterio de los frutos. Lo anterior concuerda con la pérdida de firmeza en los frutos en estado de maduración avanzados. Mientras que los niveles de *ACCO* disminuyeron en el día 4 postratamiento, recuperándose posteriormente y los frutos maduraron normalmente. Por otro lado, los niveles de expresión de *MADS* se mantuvieron constantes en los días evaluados, sugiriendo que la expresión de éste factor de transcripción es muy regulada, y apoya su función como regulador clave en el proceso de maduración de los frutos.

Las alteraciones a nivel génico por efecto de la aplicación de este tipo de estrés, podrían ser útiles para entender los mecanismos de regulación en la expresión de genes asociados a maduración. Sin embargo, es necesario incluir familias completas de esos genes reguladores y de los que afectan el metabolismo de la pared celular, mecanismos de percepción y señalización de etileno entre otros.

PERSPECTIVAS

Realizar la clonación y secuenciación de las isoformas de PG y llevar a cabo el análisis de expresión génica de *PG*, para observar si existe correlación con el cambio de la firmeza por efecto de la aplicación de TH.

Analizar la expresión génica de otras enzimas asociadas con cambio en la firmeza en la maduración de los mangos como β -galactosidasa y expansinas. Los cambios en la expresión de éstas enzimas ayudarían a conocer el grado de implicación en el cambio de la firmeza de los mangos por la acción de éstas enzimas que actúan en la pared celular.

Realizar el análisis de expresión génica del factor de transcripción tipo MADS en distintas etapas del desarrollo del mango. La determinación de la etapa exacta en donde la expresión génica sufre un cambio podría ayudar en la explicación de su función en la maduración.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, Z.M., Armugan, S. y Lazan, H. (1994). β -Galactosidase and its significance in ripening mango fruit. *Phytochemistry*. 38: 1109-1114.
- Ali, Z.M., Chin, L.H. y Lazan H. (2004). A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*. 167: 317–327.
- Alique, R., Luna, P., Hernández, T. y Martínez, M.A. (2009). Residual effect of atomised water vapour treatment on carbohydrate metabolism during ripening of cv “Fino de Jete” cherimoya fruit. *European Food Research and Technology*. 229:661-669.
- Anjanasree, K.N., Praveen Kumar Verma, P.K. y Bansal. K.C. (2005). Differential expression of tomato ACC oxidase gene family in relation to fruit ripening. *Current Science*. 89: 1394-1399.
- Ara, H., Jaiswal, U. y Jaiswal, V.S. (2005). Mango (*Mangifera indica* L.). Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. 45: 229–246.
- Ariza-Flores, R., Yahia, E.M., Vázquez-García, E., Barrios-Ayala, A., Garrido-Ramírez, E.R., Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A y Alia-Tejacal, I. (2009). Control de *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) y calidad de los frutos de zapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq) Moore & Stearn tratados con aire caliente forzado. *Revista de Chapingo Serie Horticultura*. 15: 9-15.
- Aular, J y Rodríguez, Y. (2005). Características Físicas y Químicas y prueba de preferencia de tres tipos de mangos criollos venezolanos. *Bioagro*. 3: 171-176.

- Bender, R. J., Eduardo Seibert, E. y Brecht, J.K. (2003). Heat treatment effects on ACC oxidase activity of 'Keitt' mangoes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 15: 145-148.
- Bleecker, A.B. y Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 16: 1-18.
- Bron, I.U., Vasconcelos, R., Cavalini, F.C., Jacomino, A.P. y Trevisan, M.J. (2005). Temperature-related changes in respiration and Q_{10} coefficient of guava. *Scientia Agricola*. 62: 458-463.
- Brummell, D.A., Dal Cin, V., Crisosto, C.H. y Labavitch, J.M. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2029–2039.
- Brummell, D.A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*. 33: 103-119.
- Causier, B., Kieffer, M. y Davies, B. (2002). MADS-Box Genes Reach Maturity. *Science*. 296: 275-276.
- Chaves, A.L.S. y P.C. de Mello-Farias. (2006). Ethylene and fruit ripening: from illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 508-515.
- Chourasia, A., Sane, V.A y Nath, P. (2006). Differential expression of pectate lyase during ethylene-induced postharvest softening of mango (*Mangifera indica* var. Dashehari). *Physiologia Plantarum*. 128: 546-555.
- Eckert, J.W., Ogawa, J.M. (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical. *Annual Review of Phytopathology*. 23: 421-54.

- Elitzur, T., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J., Goldschmidt, E.E y Friedman, H. (2010). The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*. 61: 1523-1535.
- Fabi, J.P., Cordenunsi, B.R., Seymour, G.B., Lajolo, F.M y Oliveira do Nascimento, J.R. (2009). Molecular cloning and characterization of a ripening-induced polygalacturonase related to papaya fruit softening. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1075–1081.
- Fourney, R.M., Miyakoshi, J., Day III, R.S. y Paterson, M.C. (1988). Northern Blotting: Efficient RNA Staining and Transfer. *Focus*. 10: 5-6.
- García-Moroto, F., Carmona, M.J., Garrido, J.A., Vilches-Ferrón, M., Rodríguez-Ruiz, J y López Alonso, D. (2003). New roles for MADS-box genes in higher plants. *Biologia Plantarum*. 46: 321-330.
- García-Pineda, E. y Lozoya-Gloria, E. (1999). Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant Science*. 145: 11-21.
- Giovannoni, J. (2004). Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The plant cell*. 16: 170-180.
- Hadfield, K. y Bennett, A.B. (1998). Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function. *Plant Physiology*. 117: 337-343.
- HersHKovitz, V., Friedman, H., Goldschmidt, E.E., Feygenberg, O. y Pesis, E. (2009). Induction of ethylene in avocado fruit in response to chilling stress on tree. *Journal of Plant Physiology*. Artículo en prensa.
- Huber, D.J., Karakurt, Y. y Jeong, J. (2001). Pectin degradation in ripening and wounded fruits. *Horticultural Sciences Department*. 13: 224-241.

- Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S y Singh, R. (2003). Biochemistry of Fruit Ripening of Guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and Enzymatic Changes. *Plant Foods for Human Nutrition*. 58: 309-315.
- John-Karuppiyah, K-J y Burns, J.K. (2010). Degreening behavior in 'Fallglo' and 'LeexOrlando' is correlated with differential expression of ethylene signaling and biosynthesis genes. *Postharvest Biology and Technology* 58: 185-193.
- Ketsa, S., Chidtragool, S., Klein, J.D. y Lurie, S. (1999). Ethylene synthesis in mango fruit following heat treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 15: 65-72.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A. (2006). *Conceptos de genética*. Octava edición. Ed. Prentice Hall.
- Lagunes, L., Tovar, B., Mata, M., Vinay-Vadillo, J.C., De la Cruz, J. y Garcia, H.S. (2007). Effect of Exogenous Ethylene on Content and Oxidase Activity During Ripening of Manila Mangoes Subjected to Hot Water Treatment. *Plant Foods for Human Nutrition*. 62: 157-163.
- Liu, J., Xu, B., Hu, L., Li, M., Su, W., Wu, J., Yang., J y Jin, Z. (2008). Involvement of a banana MADS-box transcription factor gene in ethylene-induced fruit ripening. *Plant cell*. 28: 103-111.
- Livak, K.J y Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 25: 402-408.
- López-Gómez, R., Cabrera-Ponce, J.L., Saucedo-Arias, L.J., Carreto-Montoya, L., Villanueva-Arce, R., Díaz-Pérez, J.C., Gómez-Lim, M.A y Herrera-Estrella, L. (2009). Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression. *Transgenic Research*. 18: 89-97.

- López-Gómez, R y Gómez-Lim. (1992). A Method for extracting Intact RNA from Fruits Rich in Polysaccharides. *HortScience*. 27: 440-442.
- López-Gómez, R., Morales-Domínguez, F., Mendoza, O y Gómez-Lim, M.A. (2004). Identification of a Genomic Clone to ACC Oxidase from Papaya (*Carica papaya* L.) and Expression Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 794-800.
- Luna, G., Arévalo, M., Anaya, S., Villegas, A., Acosta, M. y Leyva, G. (2006). Calidad de mango 'Ataulfo' sometido a tratamiento hidrotérmico. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29: 123-128.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*. 14: 257–269.
- McIntyre, A., Wickham, L.D., Wilson, L.A. y Malins, A. (1993). Hot water treatments for the postharvest control of fruit fly and anthracnose in the caribbean mango 'Julie'. *Acta Horticulturae*. 341: 533-539.
- Mitaa, S., Kiritab, Katob, C.M. y Hyodob, H. (1999). Expression of ACC synthase is enhanced earlier than that of ACC oxidase during fruit ripening of mume (*Prunus mume*). *Physiologia Plantarum*. 107: 319-328.
- Mitcham, E.J. y McDonald, R.E. (1993). Respiration rate, internal atmosphere, and ethanol and acetaldehyde accumulation in heat-treated mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 3: 77-86.
- Moore, S., Vrebalov, J., Payton, P. y Giovannoni, J. (2002). Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2023-2030. *Plant Cell Rep* 28: 103–111.

- Moore, S., Vrebalov, J., Payton, P., Wright, M., Tanksley, S. y Giovannoni, J. (2005). Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*. 56: 2885-2895.
- Muda, P., Seymour, G.B., Errington, N. y Tuckera, G.A. (1995). Compositional changes in cell wall polymers during mango fruit ripening. *Carbohydrate Polymers* 26: 255-260.
- Neidhart, S., Vásquez-Caicedo A.L., Mahayothee B., Pott, I., Mühlbauer, W., Sruamsiri, P. y Carle, R. (2007). The Control of Postharvest Ripening Processes and its Implications for the Productivity of Mango Processing. *Environmental Science and Engineering*. 3: 134-146.
- Osuna-García, J.A., Cáceres-Morales, I., Montalvo-González, E., Mata-Montes de Oca, M. y Tovar-Gómez, B. (2007). Efecto del 1-metilciclopropeno (1-MCP) y tratamiento hidrotérmico sobre la fisiología y calidad del mango 'Keitt'. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13:157-163.
- Osuna, J.A., Beltrán, J.A. y Urías, M.A. (2005). Efecto del 1-metilciclopropeno (1-MCP) sobre la vida de anaquel y calidad del mango para exportación. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28: 271-278.
- Owino, W.O., Ambuko, J.L. y Mathooko, F.M. (2005). Molecular basis of cell wall degradation during fruit ripening and senescence. *Stewart Postharvest Review*. 3: 3-10.
- Özdemir, A.E., Çandır, E.E., Toplu, C., Kaplankıran, M., Yıldız, E. y Inan, C. (2009). The effects of hot water treatments on chilling injury and cold storage of fuyu persimmons. *African Journal of Agricultural Research*. 4: 1058-1063.
- Paull, R.E. y Jung, N. (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*. 21: 21-37.

- Pérez-Rivero, B., Bringas, E., Mercado J.N., Saucedo, C., Cruz, L. y Báez-Sañudo, R. (2004). Aplicación de cera comestible en mango. Parte II: Estudios fisiológicos asociados a la maduración del fruto durante el almacenamiento comercial. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 6: 24-33.
- Ploy, Du. (2006). Mango. University of Pretoria. 35: 23-36.
- Prasanna, V., Prabha, T.N. y Tharanathan, R.N. (2006). Multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L. cv Alphonso) fruit. *Food Chemistry*. 95: 30-36.
- Prasanna, V., Prabha, T.N. y Tharanathan, R.N. (2007). Fruit Ripenin Phenomena –An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47: 1-19.
- Prasanna, V., Yashoda, H.M., Prabha, T.N. y Tharanathan R.N. (2003). Pectic polysaccharides during ripening of mango (*Mangifera indica* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83:1182–1186.
- Sane, V.A., Chourasia, A. y Nath, P. (2005). Softening in mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) is correlated with the expression of an early ethylene responsive, ripening related expansin gene, *MiExpA1*. *Postharvest Biology and Technology*. 38: 223-230.
- Schmittgen, T. y Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 3: 1101-1108.
- Sheehy, R.E., Kramer, M. y Hiatt, W.R. (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85: 8805-8809.
- Shore, P. y Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry*. 229: 1-13.

- Singh, P. y Dwivedi, U.N. (2008). Purification and characterization of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) fruit. *Food Chemistry*. 111: 345-349.
- Soares, A.L. y De Mello, P.C. (2006). Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 508-515.
- Sung, S.K., Yu, G.H., Nam, J., Jeong, D.H. y An, G. (2000) Developmentally regulated expression of two MADSbox genes, *MdMADS3* and *MdMADS4*, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple. *Planta*. 210: 519-528.
- Suntornwat, O., Lertwikoon, N., Bungaruang, L. y Chaimanee, P. (2000). Cloning and characterization of a putative endo-polygalacturonase cDNA from ripening mango (*Mangifera indica* Linn cv. Nam Dok Mai). *Acta Horticulturae*. Sixth International Mango Symposium.
- Taiz, L. y Zeiger E. (2006). *Plant Physiology. Gene Expression and Signal Transduction*. Fourth Edition.
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T. Münster, T., Winter, K. y Saedlert, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*. 42:115–149.
- Vicente, A.R., Martínez, G.A., Chaves, A.R., Civello, P.M. (2006). Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 40: 116–122.
- Wang, Z. Y., MacRae, E.A., Wright, M.A., Bolitho, K.M., Ross G.S. y Atkinson, R.G. (2000). Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Molecular Biology* 42: 317-328.

- Watada, H. y Massie, D. (1981). A compact automatic system for measuring CO₂ and C₂H₂ evolution by harvest horticultural crops. *HortScience*. 19: 39-41.
- Whittaker, D.J., Smith, G.S. y Gardner, R.C. (1997). Expression of ethylene biosynthetic genes in *Actinidia chinensis* fruit. *Plant Molecular Biology*. 34: 45-55.
- Wu, Z. y Burns, J.K. (2004). A b-galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis*). *Journal of Experimental Botany*. 55: 1483–1490.
- Yahia, E. (2006). Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. *Stewart Postharvest Review*. 5: 6.
- Yashoda, H.M., Prabha, T.N., y Tharanathan, R.N. (2005). Mango ripening: changes in cell wall constituents in relation to textural softening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 1-10.
- Yashoda, H.M., Prabha, T.N., y Tharanathan, R.N. (2006). Multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.cv Alphonso) fruit. *Food Chemistry*. 95: 30-36.
- Zamora, E., García, H., Mata, M. y Tovar, B. (2004). Aceleración de la maduración en mango 'Kent' refrigerado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27: 359-366.