



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

**EXPRESIÓN DE LAS PECTIN METILESTERASAS Y SUS  
INHIBIDORES ASOCIADOS AL INICIO DE LA MADURACIÓN  
POSTCOSECHA EN MANGO (*Mangifera indica* L.)**

---

Por:

**Lourdes Karina Ulloa Llanes**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Lourdes Karina Ulloa Llanes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



---

Dra. María Auxilladora Islas Osuna  
Directora de tesis



---

Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Mitzuko Dautt Castro  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Elena Nohelí Moreno Córdova  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Expresión de las Pectina Metilesterasas y sus Inhibidores Asociados al Inicio de la Maduración Postcosecha en Mango (*Mangifera indica* L.)" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Lourdes Karina Ulloa Llanes, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Cáire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo prestado durante el posgrado.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por permitirme realizar mis estudios de maestría en su institución.

Agradezco a CONAHCYT por el proyecto CB2012-01-178296 “Estudios moleculares de la maduración del mango Ataulfo (*Mangifera indica* L.): uso de la transcriptómica para identificar los genes responsables de la pérdida de la firmeza” otorgado a la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna.

Agradezco a los miembros de mi comité:

Dra. Mary, gracias por abrirme las puertas a su laboratorio, por guiarme y alentarme a ser la mejor estudiante que puedo ser. Por su consejo y su confianza que me ayudó a seguir adelante en los momentos más difíciles.

Dra. Carmen, gracias por sus consejos y su disponibilidad para escuchar y responder mis dudas. Por ser tan atenta y comprensiva.

Dra. Mitzuko, gracias por confiar en mí y por empujarme a mejorar. Gracias por inspirarme con su dedicación.

Dra. Elena, gracias por su amabilidad y palabras de aliento. Por su paciencia y disponibilidad.

Agradezco al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas y a mis compañeros Andrea, Chema, Libertad, Miranda y Jorge, gracias por enseñarme tanto y aprender conmigo.

Agradezco a las bellas amistades que hice en el camino, Salma, Martha y Mitzi, gracias por su apoyo y compañía.

Agradezco a mi familia, gracias por darme su apoyo incondicional, amor y, sobre todo, gracias por creer en mi cuando yo no lo hacía.

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá, mi hermana y el tommy,  
los amo, gracias.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Enzimas Pectolíticas Causan el Ablandamiento o Endurecimiento de Tejidos Celulares .....	15
2.1.1. Pared Celular y Degradación Mediante Enzimas Pectolíticas .....	15
2.1.2. Pectin Metilesterasas.....	16
2.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas e isoformas .....	16
2.1.2.2. Estructura y Mecanismos de Acción.....	19
2.1.3. Proteínas Inhibidoras de la Pectin Metilesterasa .....	21
2.1.3.1. Propiedades Fisicoquímicas. ....	21
2.1.3.2. Estructura y Mecanismo de Acción. ....	22
2.2. Evolución y Función de Pectin Metilesterasas e Inhibidores de Pectina Metilesterasa en Distintas Plantas. ....	23
2.2.2. Pectin Metilesterasas y Proteínas Inhibidoras de Pectin Metilesterasas en Monocotiledóneas .....	24
2.2.3. Pectin Metilesterasas y Proteínas Inhibidoras de Pectin Metilesterasas en Eudicotiledóneas .....	25
2.3. El Estudio de PME y PMEI Provee Información Valiosa Para su Futura Aplicación en la Industria Alimenticia .....	27
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Específicos .....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
5.1. Identificación y Análisis de Estructura de MiPME y MiPMEI.....	31
5.2. Análisis de Localización Cromosómica y Duplicación de Genes.....	31
5.3. Alineamiento Múltiple y Análisis Filogenético de PME y PMEI.....	32
5.4. Identificación de Motivos Conservados de PME y PMEI.....	32

## CONTENIDO (continuación)

5.5. Análisis de Elementos en <i>cis</i> de las Regiones Promotoras de <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> .....	32
5.6. Material Vegetal .....	33
5.7. Extracción de RNA Total y Síntesis de cDNA.....	33
5.8. PCR Cuantitativa y Análisis de Expresión Génica Relativa .....	34
5.9. Análisis de Datos .....	34
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
6.1. Identificación y Análisis de Estructura de <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> .....	36
6.1.1. Características de las Secuencias Nucleotídicas y Aminoacídicas de <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> .....	36
6.1.2. Análisis de Estructura de los genes <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> .....	44
6.2. Análisis de Localización Cromosómica y Duplicación de Genes .....	46
6.3. Alineamiento Múltiple y Análisis Filogenético .....	50
6.4. Identificación de Motivos Conservados .....	56
6.5. Análisis de Elementos en <i>cis</i> de las Regiones Promotoras.....	58
6.5.1. Análisis de Elementos en <i>cis</i> de las Regiones Promotoras de <i>MiPME</i> .....	58
6.5.2. Análisis de Elementos en <i>cis</i> de las Regiones Promotoras de <i>MiPMEI</i> .....	60
6.6. Expresión Génica Relativa de <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> en Frutos de Mango Ataulfo Postcosecha.....	61
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación de los dominios que integran los distintos tipos de pectin metilesterasas (PME) y proteína inhibidora de pectin metilesterasa (PMEI).....	19
2. Mecanismos de acción de PME, efectos de la desmetilesterificación en las cadenas de HG y en la estructura.....	20
3. Estructura de los genes <i>MiPME</i> tipo-I.....	42
4. Estructura de los genes <i>MiPME</i> tipo-II.....	43
5. Estructura de los genes <i>MiPMEI</i> .....	44
6. Distribución cromosómica de los genes <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> .....	45
7. Duplicación segmental de pares de genes <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> .....	47
8. Análisis filogenético y motivos conservados <i>MiPME</i> .....	49
9. Relación filogenética de 46 <i>MiPMEs</i> y 66 <i>AtPMEs</i> .....	50
10. Relación filogenética de 46 <i>MiPMEs</i> y 56 <i>PMEs</i> de <i>S. lycopersicum</i> .....	52
11. Análisis filogenético y motivos conservados de <i>MiPMEI</i> .....	53
12. Relación filogenética de 12 <i>MiPMEI</i> y 71 <i>AtPMEI</i> .....	54
13. Elementos en <i>cis</i> en las regiones promotoras <i>MiPME</i> .....	57
14. Elementos en <i>cis</i> en las regiones promotoras <i>MiPMEI</i> .....	59
15. Expresión génica relativa de 7 <i>MiPMEs</i> a 0, 6 y 24 horas postcosecha.....	62
16. Expresión génica relativa de 4 <i>MiPMEs</i> a 0, 6 y 24 horas postcosecha.....	63
17. Expresión génica relativa de 3 <i>MiPMEIs</i> a 0, 6 y 24 horas postcosecha.....	65

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Propiedades fisicoquímicas de la familia de genes PME y PMEI en distintos frutos.....	17
2 Iniciadores sentido (FW) y antisentido (RV) de <i>MiPME</i> y <i>MiPMEI</i> utilizados en qPCR.....	34
3 Características principales de las pectin metilesterasas ( <i>MiPME</i> ) tipo-I de mango.....	36
4 Características principales de las pectin metilesterasas ( <i>MiPME</i> ) tipo-II de mango .....	39
5 Características principales de los inhibidores de pectin metilesterasas ( <i>MiPMEI</i> ) de mango .....	41
6 Sustituciones sinónimas y no sinónimas de pares de genes duplicados <i>MiPME</i> .....	46
7 Sustituciones sinónimas y no sinónimas de pares de genes duplicados <i>MiPMEI</i> .....	48
8 Secuencias consenso de los diez motivos MEME de las proteínas <i>MiPME</i> .....	55
9 Secuencias consenso de los ocho motivos MEME de las proteínas <i>MiPMEI</i> .....	56

## RESUMEN

Las pectin metilesterasas (PME, EC 3.1.1.11) son enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis de pectinas en la pared celular y son esenciales en la regulación de modificaciones en la pared celular. La actividad PME es regulada principalmente por la proteína inhibidora de pectin metilesterasa (PMEI), la cual se une al sitio activo de la enzima generando un complejo 1:1. Los genes PME y PMEI se distribuyen ubicuamente en plantas y se han explorado y caracterizado ampliamente en plantas modelo. Sin embargo, no se ha realizado una descripción sistemática de estas familias de genes en mango (*Mangifera indica* L.). El mango es un fruto climatérico de importancia comercial que se caracteriza por su notable pérdida de firmeza durante la maduración. El objetivo de esta investigación es evaluar la expresión de *PMEs* y *PMEIs* asociadas a la degradación de la pared celular al inicio de la maduración postcosecha del mango ‘Ataulfo’, a partir del genoma del mango. Se identificaron 46 genes putativos *PME* de *M. indica* (*MiPME*) y 12 genes putativos *PMEI* de *M. indica* (*MiPMEI*). La estructura de los *MiPME* varía de 1 a 9 exones y los *MiPMEI* de 1 a 3 exones. Además, en las proteínas codificadas se identificaron los dominios conservados PME (PF01095) y PMEI (PF04043), donde se identificaron 10 motivos conservados en *MiPME*, de los cuales, del motivo 1 al 5 codifican para el dominio PME y el motivo 10 codifica para el dominio PMEI. Respecto a las *MiPMEI*, se identificaron 8 motivos conservados y solamente el motivo 1 y 2 codifican para el dominio PMEI. Se evaluó la expresión génica relativa de 12 *MiPME* y 4 *MiPMEI* seleccionados con base en el análisis filogenético y evidencia experimental. Cuatro *MiPMEs* (*MiPME3.2*, *MiPME63.1*, *MiPME48.1*, *MiPME53.1*) y tres *MiPMEIs* (*MiPMEI7.8*, *MiPMEI7.4*, *MiPMEI9*) se estimulan a las 24 horas postcosecha, lo cual sugiere que su función es importante para el inicio de la maduración del mango ‘Ataulfo’. Esta investigación amplía nuestro entendimiento de la familia de genes PME y PMEI, de tal manera que facilitará los análisis posteriores para estas familias de genes especialmente durante la maduración.

**Palabras clave:** Pectin metilesterasa, PME, Inhibidor de PME, PMEI, mango, maduración.

## ABSTRACT

Pectin methylesterase (PME, EC 3.1.1.11) are hydrolytic enzymes that catalyze the hydrolysis of pectin's in the cell wall and are essential in regulating modifications in the cell wall. PME activity is mainly regulated by the pectin methylesterase inhibitor protein (PMEI), which binds to the enzyme's active site, forming a 1:1 complex. The PME and PMEI genes are distributed ubiquitously in plants and have been extensively explored and characterized in model plants. However, a systematic description of these gene families in mango (*Mangifera indica* L.) has not occurred. Mango is a climacteric fruit of commercial importance, characterized by its significant loss of firmness during ripening. The objective of this research is to evaluate the expression of *PMEs* and *PMEIs* associated with cell wall degradation at the beginning of postharvest ripening in the 'Ataulfo' mango, based on the mango genome. A total of 46 putative *PME* genes of *M. indica* (*MiPME*) and 12 putative *PMEI* genes of *M. indica* (*MiPMEI*) were identified. The structure of *MiPME* varies from 1 to 9 exons, and *MiPMEI* have 1 to 3 exons. In the encoded proteins, conserved domains PME (PF01095) and PMEI (PF04043) were identified. Within *MiPME*, ten conserved motifs were found, where motifs 1 to 5 encode for the PME domain and motif 10 encode for the PMEI domain. As for *MiPMEI*, eight conserved motifs were identified, with only motifs 1 and 2 encoding for the PMEI domain. Relative gene expression of 12 selected *MiPMEs* and 4 *MiPMEIs* was evaluated based on phylogenetic analysis and experimental evidence. Four *MiPMEs* (*MiPME3.2*, *MiPME63.1*, *MiPME48.1*, *MiPME53.1*) and three *MiPMEIs* (*MiPMEI7.8*, *MiPMEI7.4*, *MiPMEI9*) were upregulated at 24 hours postharvest, suggesting their importance in the beginning of 'Ataulfo' mango ripening. This research expands our understanding of the PME and PMEI gene families, facilitating further analyses of these gene families, particularly during ripening.

**Keywords:** Pectin methylesterase, PME, PME inhibitor, PMEI, mango, ripening.

## 1. INTRODUCCIÓN

La pared celular es una estructura semirrígida y dinámica, cuyos componentes principales son polisacáridos complejos, hemicelulosa y pectinas, que contribuyen a la integridad y rigidez de tejidos. El ablandamiento del fruto ocurre durante la maduración, debido a cambios en la composición y estructura de la pared celular, como la degradación de pectinas, despolimerización de celulosa y hemicelulosa, entre otros. Estos cambios son causados por una serie de enzimas relacionadas a la degradación de la pared celular, incluyendo poligalacturonasas, pectin metilesterasas, pectato liasas, endoglucanasas y expansinas (Liu *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2017). Las pectin metilesteras (PME) se distribuyen ampliamente en plantas y en algunos hongos que poseen la función de degradar la pared celular vegetal. La actividad PME facilita la hidrólisis de las pectinas en la pared celular al remover los grupos metilos de los homogalacturonanos impactando su mecánica, el crecimiento de la planta y puede resultar en el ablandamiento de frutos (Wen *et al.*, 2020; Xue *et al.*, 2020). La descripción de la familia de genes PME y los productos de sus genes, así como sus interacciones provee información valiosa acerca de las funciones de esta amplia familia.

La cantidad de miembros de la familia de genes PME depende de la especie, se han identificado 43, 54 y 105 miembros en arroz, papa y linaza, respectivamente (Jeong *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021). Por otro lado, la actividad PME es regulada específicamente por su inhibidor proteináceo (PMEI), de los cuales se han identificado 30, 95 y 49 miembros en durazno, linaza y maíz, respectivamente (Pinzón-Latorre y Deyholos, 2013; Zhang *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2017). Adicionalmente, la familia de genes y los productos de los genes PME se puede clasificar según la presencia o ausencia del dominio PMEI, siendo: tipo I (presencia del dominio PME y PMEI) y tipo II (presencia del dominio PME) (Wen *et al.*, 2020). Por lo cual, la tarea de clasificar PMEs y PMEIs se vuelve compleja, ya que tanto la enzima como el inhibidor comparten un dominio.

Diversos estudios reportan la presencia de esta amplia familia de genes en plantas modelo de estudio, entre los cuales podemos destacar: 66 PMEs y 76 PMEIs en *Arabidopsis thaliana*, 43 PMEs y 49 PMEIs en maíz (*Zea mays*), y 79 PMEs y 48 PMEIs en tomate (*Solanum lycopersicum*).

De los cuales, observaron mayor expresión en desarrollo de silicua, desarrollo de anteras y polen, y desarrollo de órganos y crecimiento, respectivamente (Jeong *et al.*, 2018; Louvet *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2019). Estos distintos estudios muestran que las PME y PMEI se encuentran ampliamente distribuidas y están involucradas en procesos tanto vegetativos como reproductivos. Sin embargo, a estos estudios les falta dilucidar las interacciones entre PME y PMEI, ya que se ha reportado la presencia de pares específicos de PME-PMEI que modulan la modificación de pectinas (Jeong *et al.*, 2018). Adicionalmente, se requiere de un estudio donde además de la actividad PME, se identifiquen las proteínas inhibidoras de PME en frutos de importancia comercial como el mango (*M. indica* L.) y las posibles interacciones entre los dos tipos de proteínas.

Continuar con el estudio de PME y PMEI permitirá descubrir su posible uso práctico, principalmente en la industria alimenticia. Las PME son enzimas clave en el procesamiento de ciertos alimentos de origen vegetal, la presencia de actividad PME endógena puede afectar de manera positiva o negativa parámetros de calidad, como sería la viscosidad y turbidez en jugos (Bazaraa *et al.*, 2020). Aunque la familia de genes PME y sus proteínas inhibidoras, han sido ampliamente caracterizadas en plantas modelo, aún es necesario evaluar las propiedades evolutivas y funcionales de esta familia en frutos de mango (*M. indica* L.). Debido a que el mango es un fruto climatérico que pierde la firmeza rápidamente después de su cosecha, por lo cual, es necesario el estudio de las isoformas PME que contribuyen a la pérdida de firmeza en mango (Khaliq *et al.*, 2017). Por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo evaluar la expresión de *PMEs* y *PMEIs* asociados a la degradación de la pared celular al inicio de la maduración postcosecha del mango cv. Ataulfo (*M. indica* L.).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Enzimas Pectolíticas Causan el Ablandamiento o Endurecimiento de Tejidos Celulares

#### 2.1.1. Pared Celular y Degradación Mediante Enzimas Pectolíticas

La pared celular es una estructura organizada que limita el volumen de las células vegetales y se va depositando como una serie de capas que al completarse constituye la pared celular primaria, la cual se produce en células en crecimiento y en división celular. En algunos tipos de células especializadas cuando dejan de crecer se depositan nuevas capas de material en la cara interna de la pared denominada pared celular secundaria. La pared celular primaria en plantas puede definirse como un compuesto de materiales, entre los cuales se encuentran microfibrillas unidas por hemicelulosa e incrustadas dentro de pectinas y proteínas estructurales, en una proporción de 10% proteínas y 90% polisacáridos (Lagaert *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2021). Uno de los cambios asociados a la maduración de frutos carnosos ocurre en las pectinas, las cuales se encuentran en constante remodelado para ajustarse a los cambios morfológicos de las células (Qiu *et al.*, 2021). Estos polisacáridos forman el 35% de la pared celular primaria de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, del 2 al 10% de gramíneas y hasta el 5% de tejidos leñosos, lo cual afecta la cantidad y variedad de enzimas hidrolíticas que participan en su degradación (Wolf *et al.*, 2009).

Las pectinas son una mezcla de distintos polímeros que le confieren estructura a la pared celular y son conocidos como heteropolisacáridos. Los cuales contienen predominantemente componentes de homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano-I (RG-I) y ramnogalacturonano-II (RG-II), contribuyen a la porosidad, hidratación y adhesión intercelular de la pared celular. La pectina dominante es el HG, la cual es un polímero lineal de (1,4)- $\alpha$ -D-ácido galacturónico (GalA) que es afectado por acetilaciones y esterificación del metilo en carbonos específicos (C2-C3 y C6, respectivamente) (Jeong *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2020). La

columna de RG-I está compuesta por disacáridos (1-2)- $\alpha$ -D-ramnosa-(1-4)-  $\alpha$ -D-GalA con cadenas laterales de galactosa o arabinosa. Por otro lado, la molécula de RG-II tiene un esqueleto de HG con cadenas laterales diversas, el cual se puede dimerizar a través de un enlace diestérico de borato (Pérez-Almeida y Carpita, 2006). Las pectinas sintetizadas se transportan del aparato del Golgi a la pared celular y se ensamblan junto con otros polisacáridos asociados a la pared celular mediante enlaces covalentes (Jeong *et al.*, 2018). Finalmente, las pectinas son degradadas durante la maduración por la acción de múltiples enzimas pectolíticas, primero se hidrolizan los grupos metilo de la posición C6 de las cadenas de HG por las PME, resultando en cadenas de HG con bajo nivel de metilación. Posteriormente, las pectato liasas (PL) realizan cortes al azar entre los residuos de GalA mediante  $\beta$ -eliminación, lo cual resulta en oligogalacturonatos de dobles enlaces entre C4 y C5 insaturados (Uluisik y Seymour, 2020). Las poligalacturonasas (PG) actúan sobre el ácido poligalacturónico (PGA) e hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 del PGA (Yahia *et al.*, 2019).

### **2.1.2. Pectin Metilesterasas**

Las pectin metilesterasas (PME, EC 3.1.1.11) son un tipo de pectina esterasas, que catalizan reacciones en la columna de HG de pectinas, liberando metanol y protones en el proceso. Dichas reacciones son catalizadas de acuerdo con el mecanismo de doble desplazamiento, donde ocurre la transferencia de los grupos carboxilo C6 del complejo pectina-PME a moléculas de agua, alterando su nivel y patrón de metilesterificación. Lo anterior es seguido por una transacilación, mediante la transferencia de los grupos carboxilo C6 a los grupos hidroxilo de otras moléculas de pectina, dando como resultado la formación de moléculas de alto peso molecular (Manmohit *et al.*, 2015). En plantas, se conoce una amplia variedad de isoformas de PME que participan en procesos y ambientes específicos, lo que explica que esta familia de genes esté involucrada en varios de sus procesos fisiológicos.

2.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas e isoformas. En las plantas se han encontrado diferentes

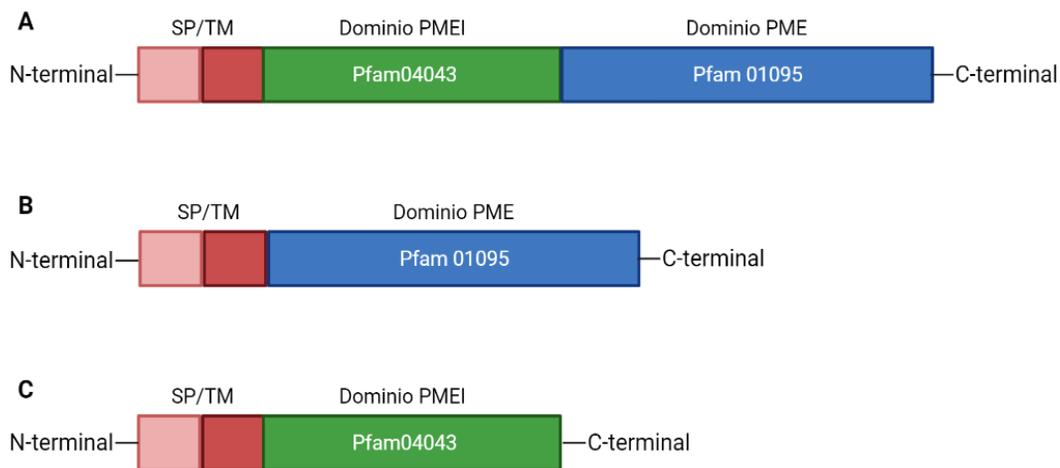
isoformas PME, las cuales difieren en localización, punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (kDa). Los parámetros fisicoquímicos para algunas PME de distintas plantas se desglosan en el cuadro 1. El pI es uno de los factores que más afectan la acción de las PME, ya que influyen en el proceso de hidrólisis de los componentes de la pared celular, por lo cual, definir si el pI de la proteína es alcalino o ácido contribuye a conocer su rol en la célula vegetal (Pinzón-Latorre y Deyholos, 2013). El pI de las PME de distintas plantas puede variar desde 4.9 hasta 11, según parámetros observados en isoformas de durazno y tomate, respectivamente (Jeong et al., 2018; Zhu et al., 2017). De la misma manera, el peso molecular de las isoformas varía bastante, como es el caso de una isoforma PME de papa de 11.6 kDa y 64.1 kDa en otra isoforma de PME de tomate (Li et al., 2021; Wen et al., 2020). Por otro lado, las isoformas PME maduras secretadas por el aparato de Golgi pueden dirigirse a la pared celular, membrana plasmática e incluso pueden ser localizadas en el núcleo (Pinzón-Latorre y Deyholos, 2013). Dichas diferencias permiten que los productos de esa familia de genes parálogos se expresen constitutivamente o en tejidos específicos.

**Cuadro 1.** Propiedades fisicoquímicas de PME y PMEI en distintos frutos.

<b>Fruto</b>	<b>PME</b>	<b>PMEI</b>	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>	<b>Tamaño (aa)</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>pI</b>	<b>Referencia</b>
Maíz	43	49	20	23	149-1360	*	4.3 - 10.2	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
<i>Sorghum bicolor</i>	*	55	*	*	158 - 528	17.1 - 59.9	4.2 - 10.7	(Ren <i>et al.</i> , 2019)
Papa	54	*	28	26	*	11.2 - 41.2	5.1 - 9.4	(Li <i>et al.</i> , 2021)
<i>Brassica oleracea</i>	*	91	*	*	80 - 393	9.1 - 43.1	3.93 - 11.24	(Liu <i>et al.</i> , 2018)
Soja	127	*	*	*	107 - 1186	11.8 - 129.9	4.61 - 10.1	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
Durazno	71	30	36	55	*	*	4.9 - 9.6	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)
Tomate	57	*	36	21	267 - 653	12.1 - 69.7	5.1 - 9.6	(Jeong <i>et al.</i> , 2018)
Linaza	105	95	60	45	*	15.5 - 64.1	4.8 - 11.2	(Pinzón-Latorre y Deyholos, 2013)
Plátano	70	23	41	29	48 - 1,014	5.4 - 113	4.6 - 9.3	(Husna <i>et al.</i> , 2021)

\*No reportado

Las proteínas PME en plantas superiores se organizan en pre-proteínas y pro-proteínas, las cuales contienen la región activa de la proteína (dominio PME, Pfam01095), una pre-región y/o pro-región. La pre-región se conforma por un péptido señal (SP) y/o un dominio transmembranal (TM), encargados de exportar la proteína madura a la pared celular (Li *et al.*, 2021). Por otro lado, la pro-región es una extensión del extremo N terminal, la cual es similar al inhibidor pectin metilesterasa (dominio PMEI, Pfam04043) (Li *et al.*, 2021). Adicionalmente, la presencia o ausencia de dichos dominios permiten clasificar a las PME en tipo I (dominio PME y pro-región, similar al dominio PMEI) compuestas de entre 500 a 900 aminoácidos (aa) y tipo II (solamente dominio PME) generalmente de 250 a 400 aa (Figura 1A y 1B) (Manmohit *et al.*, 2015). Aunado a esto, se ha demostrado que las PME no maduras se retienen en el aparato de Golgi debido a la pro-región, por lo cual, la remoción de dicha región constituye un mecanismo de regulación postraduccional (Zhu *et al.*, 2017). Se conoce que la estructura de los genes tipo II es parecida a la de hongos, sin dominio PMEI, lo cual lleva a pensar que la integración del dominio PMEI ocurrió después de una diferenciación evolutiva.

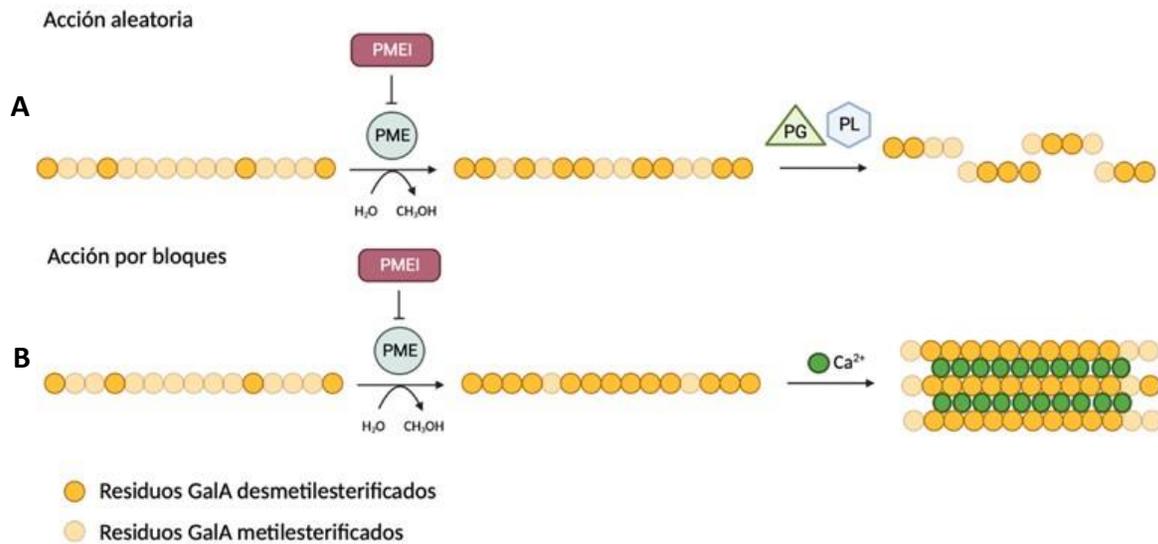


**Figura 1.** Representación de los dominios que integran los distintos tipos de pectin metilesterasa (PME) y proteína inhibidora de pectin metilesterasa (PMEI). Ejemplo de la estructura básica de las (A) PME tipo I, (B) PME tipo II e (C) inhibidor de pectin metilesterasa (PMEI).

2.1.2.2. Estructura y Mecanismos de Acción. La primera estructura tridimensional de PME de planta fue determinada por Johansson y colaboradores, (2002). La estructura cristalina de la PME de zanahoria que resolvieron mostró un plegamiento de hojas- $\beta$  en forma de barril, PB1, PB2 y

PB3, con una hendidura larga a través de la molécula que funciona como sitio de unión de pectina. Respecto al sitio activo, se reconocen residuos conservados entre PME de plantas, entre los cuales se encuentran dos ácidos aspárticos (D136, D15), una arginina (R225), dos glutaminas (Q113, Q135) y la mayor parte de los residuos aromáticos que cubren la ranura del sitio de unión (Johansson *et al.*, 2002). Adicionalmente, se encuentra un ion cacodilato ligado al sitio activo, el cual está en contacto con ambos residuos de ácido aspártico, con las cadenas laterales de ambas glutaminas y con dos residuos aromáticos (F160, W227).

Las PME pueden actuar mediante acción en bloques o aleatoria, durante la acción por bloques las PME pueden actuar linealmente sobre las pectinas metiladas, dando lugar a bloques de grupos carboxilo libres que podrían interactuar con el  $\text{Ca}^{2+}$ , creando zonas de unión. Por lo cual, esta estructura tipo gel limita la actividad de las poligalacturonasas, contribuye al endurecimiento de la pared celular y afecta sus propiedades mecánicas y bioquímicas (Figura 2B) (Manmohit *et al.*, 2015). Por otro lado, cuando PME actúa aleatoriamente sobre los polímeros pépticos, la desmetilesterificación libera protones que promueven la acción de enzimas hidrolíticas, como PGs y PLs modificando la pared celular, lo que genera cambios en la textura y por consecuencia, en el ablandamiento de los frutos (Figura 2A) (Zhu *et al.*, 2017). Los diferentes tipos de acción permiten las modificaciones de la pared celular, por lo cual se infiere una mayor actividad PME durante las etapas iniciales de la maduración, cuando es de alta importancia la degradación de la pared celular. Consecuentemente, la actividad PME está altamente regulada a un nivel transcripcional, por el pH de la pared celular y por las PMEI.



**Figura 2.** Mecanismos de acción de PME, efectos de la desmetilesterificación en las cadenas de HG y en la estructura. (A) Acción aleatoria y (B) acción por bloques (Adaptada de Wormit y Usadel (2018)).

### 2.1.3. Proteínas Inhibidoras de la Pectin Metilesterasa

La actividad PME en plantas es regulada principalmente por su proteína inhibidora PMEI, la cual se une al sitio activo de PME generando un complejo reversible 1:1, y se distribuye ubicuamente en plantas superiores. La actividad de PMEI es necesaria para la regulación del grado de metilesterificación de HG, lo cual afecta la mecánica de la pared celular y los procesos biológicos asociados a esta (Wormit y Usadel, 2018). Desde que se reportó por primera vez la presencia de estas proteínas inhibidoras en Kiwi, la familia de genes PMEI ha sido identificada en distintos frutos comerciales, tales como tomate, durazno, plátano, entre otros (Husna *et al.*, 2021; Jeong *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2017). Es gracias a lo anterior que se ha elucidado el rol de PMEI en distintos procesos biológicos, como formación de órganos, desarrollo de tubos polínicos e inmunidad en plantas (Lionetti *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2019).

2.1.3.1. Propiedades Fisicoquímicas. La secuencia aminoacídica de PMEI suele ser una cadena polipeptídica simple que puede contener desde 166 hasta 299 residuos, como es el caso de

isoformas PMEI de plátano y otras más variables de masa molecular de 7.3 hasta 55.4 kDa, como las isoformas PMEI de linaza (Husna *et al.*, 2021; Pinzón-Latorre y Deyholos, 2013). Para estas proteínas inhibidoras se reportan valores de pI tanto ácidos como básicos, como se ha reportado en el plátano, con isoformas cuyos valores pI varían desde 4.66 hasta 11.27 (Husna *et al.*, 2021). Sus diferentes características fisicoquímicas permiten a las isoformas de PMEI crear las uniones iónicas con las enzimas PME, creando un complejo estable y reversible.

2.1.3.2. Estructura y Mecanismo de Acción. El estudio de la estructura PMEI mediante cristalografía reveló que se conforma de cuatro hélices- $\alpha$  largas acomodadas en una topología arriba-abajo-arriba-abajo, son las hélices  $\alpha$ II y  $\alpha$ III las que crean la ranura que forma el sitio de unión de PME y  $\alpha$ I con  $\alpha$ IV las que proveen estabilidad estructural a las hélices en la ranura de unión (Sénéchal *et al.*, 2017). Las cuatro hélices- $\alpha$  contienen un péptido señal (SP) en el N-terminal responsable del transporte extracelular y cuatro residuos de cisteína conservados, involucrados en la formación de dos puentes disulfuro esenciales para la estructura secundaria de la proteína (Wormit y Usadel, 2018). Adicionalmente, lleva un segmento N-terminal compuesto de tres hélices- $\alpha$  cortas ( $\alpha$ a,  $\alpha$ b y  $\alpha$ c) que promueven la dimerización del inhibidor. Por lo cual, la inhibición de PME sucede debido a la obstrucción del surco de unión de la proteína mediante las hélices  $\alpha$ II y  $\alpha$ III del inhibidor, lo cual dificulta la unión del sustrato a la enzima (Sénéchal *et al.*, 2017). Otras enzimas pectolíticas de plantas como PG, PL o enzimas PME microbianas, no presentan esta forma de inhibición por PMEI; no obstante, se ha observado que la PMEI purificada a partir de kiwi puede unirse e inhibir PME provenientes de otros vegetales como zanahoria y brócoli (Wormit y Usadel, 2018).

Hasta el momento se desconoce el papel exacto de todos los pares PME/PMEI que se expresan en plantas; sin embargo, se conoce que las condiciones del microambiente en el que se encuentra la pared celular pueden afectar la estabilidad del complejo, como pH o fuerza iónica. Sénéchal y colaboradores (2017) confirmaron que la interacción entre AtPME3 y AtPMEI7 ocurre de forma dependiente al pH, donde observaron que un ambiente con pH neutral reduce la habilidad del inhibidor para unirse a su objetivo. Aunado a esto, una vez formado el complejo a pH 5, favorable para una proporción 1:1, el complejo puede ser reversible cuando el pH no es favorable para su

estabilidad (pH 6.3 y 7.5). Lo anterior sugiere que la formación del complejo PME-PMEI dependiente de pH está acoplada al establecimiento de interacciones entre ciertos grupos químicos protonables. Entender el mecanismo y las condiciones en que PMEI regula la actividad PME permite comprender la función de PME, así como entender cómo controlar los procesos en los que participa.

## 2.2. Evolución y Función de Pectin Metilesterasas e Inhibidores de Pectina Metilesterasa en Distintas Plantas.

### 2.2.1. Evolución de las Familias de Genes Pectin Metilesterasa e Inhibidores de Pectin Metilesterasa

Existen factores como diversidad de estructura y duplicación de genes que promueven la evolución de familias de genes, proveyendo material para la generación de genes nuevos con funciones distintas (Wang *et al.*, 2021; Wen *et al.*, 2020). La duplicación de genes es un evento tanto ancestral como presente en la actualidad, y ocurre en animales y plantas. Existen distintos tipos de duplicación, como la duplicación segmental, que es la copia de un fragmento de genes de un cromosoma a otro; y la duplicación en tándem, que son dos o más secuencias paralogas sin o pocos genes ubicados entre ellas en un mismo cromosoma (Leister, 2004; Panchy *et al.*, 2016). Por otro lado, la duplicación del genoma completo (WGD) es un mecanismo de duplicación de genes masivo y refleja una evolución adaptativa en respuesta a estrés ecológico y estos eventos han ocurrido múltiples veces en los últimos 200 millones de años en la evolución de las plantas. Los eventos de WGD más reconocidos en las plantas ocurrieron aproximadamente 340 millones de años atrás (MYA), el cual tomó lugar en el ancestro en común de las plantas con semilla, 170 MYA en angiospermas y dos rondas de eventos de WGD en el linaje de *Arabidopsis* (Crow y Wagner, 2006; Panchy *et al.*, 2016). Al analizar las secuencias codificantes del genoma del mango ‘Tommy Atkins’ se reconoció un WGD, que comparte con *Anarcadium occidentale*, el cual sucedió 65 MYA (Bally *et al.*, 2021). Estos eventos de duplicación específicos de especies son el motivo por

el cual las familias de genes, como los de PME y PMEI, varían tanto de tamaño entre especies. Los genes de PME (PME y pro-PME) evolucionaron durante la divergencia de musgos de las algas carofitas; las algas carofitas contaban solamente con PMEs tipo-II y en musgos se observaron PMEs tipo-I. Más adelante surgieron los genes de PMEI en embriofitas, también conocidas como plantas terrestres (Coculo y Lionetti, 2022; Wormit y Usadel, 2018). El análisis de WGD para entender la expansión de pro-PME y PMEIs en especies específicas mencionan que estas familias se expandieron rápido debido a su especialización en la pared celular formada en las plantas terrestres (Wang *et al.*, 2013). Además, es importante mencionar que los genes de PMEI se derivaron de la neofuncionalización de las pro-PMEs (Coculo y Lionetti, 2022). La evolución de esta amplia familia de genes nos permite entender la variabilidad de isoformas, funciones y patrones de regulación.

### **2.2.2. Pectin Metilesterasas y Proteínas Inhibidoras de Pectin Metilesterasas en Monocotiledóneas**

Las familias de PME/PMEI generalmente contienen un menor número de isoformas en monocotiledóneas. Por ejemplo, en arroz (*Oryza sativa*) se encuentran 49 PMEI putativos, 37 genes PME en *Sorghum bicolor* y 38 PMEIs putativos en *Brachypodium distachyon*. Dicotiledóneas como soya y tomate tienen 127/170 y 79/48 genes PME y PMEI putativos, respectivamente. La pared celular de monocotiledóneas, particularmente gramíneas, tienen menor concentración de pectinas comparadas con dicotiledóneas, lo que podría explicar la diferencia entre la cantidad de genes PME y PMEI en monocotiledóneas y dicotiledóneas (Jeong *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; Wormit y Usadel, 2018). Sin embargo, aún forman parte de procesos fisiológicos importantes como desarrollo de anteras, desarrollo de semillas, elongación del tubo polínico y correcta producción de mucílago (Ren *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Se ha reportado extensivamente el impacto de la actividad PME en el desarrollo del polen y tubos polínicos. Zhang y colaboradores (2019) reportaron 35 genes *ZmPME/PMEI* en maíz (*Z. mays*) que presentaron mayor expresión en anteras que en otros tejidos, indicando que estos genes están relacionados con el desarrollo de anteras y polen. De los cuales, solo tres *ZmPME* (*ZmC5*, *ZmPme3*, *ZmGalp*) y un

ZmPMEI (*ZmPMEII*) están involucrados directamente con la elongación del tubo polínico.

De manera similar, un estudio realizado por Kim y colaboradores (2020) en arroz señalan 11 PME y 13 PMEI que se expresan específicamente durante las etapas tardías del desarrollo del polen; sin embargo, no definieron sus roles funcionales. Por otro lado, en *S. bicolor* realizaron una observación interesante acerca de la actividad PME en presencia de PMEI, la cual surgió al examinar la expresión de *SbPMEI* en la panícula durante la etapa de antesis. Posteriormente, aún después de una semana se siguió detectando actividad relativamente alta de PME en panícula, lo que indica que la actividad PME podría ser regulada de manera transitoria y que hay otros factores que participan en la regulación de PME (Ren *et al.*, 2019). La actividad PME/PMEI en plantas varía entre especies; sin embargo, los procesos son similares, la actividad PME causa el aflojamiento de la pared celular, por lo cual disminuye la resistencia de la pared celular y permite modificación en distintos órganos.

### **2.2.3. Pectin Metilesterasas y Proteínas Inhibidoras de Pectin Metilesterasas en Eudicotiledóneas**

Los distintos eventos de evolución han permitido que las familias de genes PME y PMEI en plantas eudicotiledóneas se expandan y explica la diversidad de sus funciones. Distintos experimentos han demostrado que las PME y PMEI están involucradas en distintos procesos biológicos, como la extensión y rigidez de la pared celular, en la maduración, la germinación de semillas y desarrollo de órganos (Wang *et al.*, 2021). El rol de la PME en la maduración se ha estudiado en plantas de tomate. Wen y colaboradores (2020) destacaron un gen (*solyc12g098340*) que mostró la mayor acumulación de transcritos durante el desarrollo de frutos y la maduración. Adicionalmente, observaron que la expresión de cinco genes PME fueron inducidos por etileno (*Solyc03g123630*, *Solyc03g083360*, *Solyc07g017600*, *Solyc07g064190*, *Solyc12g098340*), por lo cual se puede suponer que tienen función en la maduración de frutos. Por otro lado, en el estudio realizado por Zhu y colaboradores (2017) en frutos de duraznos firmes y blandos, reportaron tres genes PME (*Prupe.7G190300*, *Prupe.7G190400* y *Prupe.7G192800*) con diferencias significativas respecto a

su expresión durante la maduración de los dos tipos de durazno. Sin embargo, en estos artículos no mencionan la relación de PMEI en el control de la esterificación del metilo de pectinas durante el proceso de maduración.

Es común que se utilice a la planta modelo *A. thaliana* para deducir genes ortólogos y homólogos, debido a que están ampliamente documentados los genes que participan en los procesos biológicos de las plantas *Arabidopsis*. Como es el caso del siguiente estudio que se realizó en papa, donde reportan que el gen *At2g47550* de *A. thaliana* es importante en el desarrollo de tubos polínicos y granos de polen. De los 54 genes PME que analizaron, solamente el gen *ST09G81388* presentó homología con *At2g47550*, esto permite suponer que el gen *ST09G81388* también podría estar involucrado en el desarrollo de tubos polínicos y granos de polen (Li *et al.*, 2021). Sin embargo, a dicho estudio le faltó un análisis de expresión, generación de la mutante correspondiente o la sobreexpresión de *ST09G81388* para tener evidencia de la función del producto del gen. También se podría determinar la actividad enzimática PMEI en polen y tubos polínicos de papa. De manera similar, en *B. oleracea* se reportaron niveles de expresión alta de genes PMEI en tubos polínicos y estambres de botones florales. De los cuales, destaca a *BoPMEI71*, ortólogo de PME de *Arabidopsis* (*At1g40770*), resulta ser necesario para el crecimiento del tubo polínico (Liu *et al.*, 2018). El artículo anterior no relaciona directamente la actividad PMEI sobre la PME que se está inhibiendo, sería interesante que se hicieran mutantes que no expresen PME y/o PMEI para evaluar los efectos sobre los procesos biológicos en los que participan PME y PMEI.

Identificar los miembros de la familia PME y PMEI en distintas especies es necesario para comprender el impacto que tiene la modificación de la pared celular en la maduración. Previamente, Dautt-Castro y colaboradores (2015) reportaron que las enzimas PME son importantes para el proceso de maduración en mango ya que gracias a la hidrólisis de los grupos metilos en las pectinas, acción dirigida por la PME, se promueve la acción de otras enzimas pectolíticas que participan en la maduración, como PL y PG. Adicionalmente, realizaron un estudio con mango Kent y observaron que la mayoría de los genes *MiPME* evaluados (*MiPME1*, *MiPME2*, *MiPME3*, *MiPME4*, *MiPME5* y *MiPME6*) se expresaron desde el día 1, disminuyendo su expresión en el almacenamiento postcosecha en el día 4 y finalmente, mostraron un subsecuente aumento de expresión en los días 8 y 10 de almacenamiento postcosecha. El estudio anterior se realizó a partir

del día 1 y hasta el día 10 postcosecha; sin embargo, evaluar la expresión de los genes PME en las primeras 24 horas postcosecha de los frutos es primordial, puesto que son de las enzimas que inician la degradación de la pared celular durante la maduración.

### 2.3. El Estudio de PME y PMEI Provee Información Valiosa Para su Futura Aplicación en la Industria Alimentaria

Como se ha mencionado anteriormente, las pectinas son el principal componente de la pared celular de plantas, ya que confiere rigidez e integridad a los tejidos. Las enzimas PME y sus proteínas inhibitoras son componentes de interés para la industria alimentaria en distintos procesos de fabricación como, clarificación de jugos, fabricación de mermeladas y mejora de la firmeza de frutas y verduras (Mercadante, 2019). Se ha determinado que el principal responsable de la turbidez en jugos es la pectina, que es generada por los procesos de extracción mecánica, promueve la aparición de nubes y turbidez. El productor determina si esta es una característica deseada, y dependiendo del producto aumenta o disminuye la aceptabilidad del producto (Aghajanzadeh y Ziaifar, 2018).

Por ejemplo, Mercadante (2019) sugiere añadir PME para eliminar pectinas, debido a que la turbidez aumenta la viscosidad de los jugos, y no es una característica que se busque en este producto. Posterior al tratamiento con PME es necesario añadir  $\text{CaCl}_2$ , el cual formará complejos con las pectinas que están negativamente cargadas a causa de la actividad PME y es gracias a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  que se facilita la precipitación de las pectinas. Por otro lado, hay estudios que señalan que la turbidez y viscosidad de los jugos influyen en el color, la sensación en la boca y el sabor, por lo que se buscan técnicas para mantener a las pectinas que confieren estabilidad a la turbidez (Aghajanzadeh y Ziaifar, 2018; Bazaraa *et al.*, 2020). El proceso de clarificación mediado por PME ocurre de la siguiente manera: algunos de los grupos carboxilo de la columna HG de pectina se esterifican con metanol para formar grupos metoxilo. PME desesterifica la pectina metoxilada y al mismo tiempo los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  se pueden unir fácilmente a la pectina desmetilada para producir pectato insoluble, lo que resulta en la pérdida de apariencia turbia del jugo

(Aghajanzadeh y Ziaifar, 2018; Bazaraa *et al.*, 2020).

Aunado a lo anterior, la pérdida de turbidez en jugos se puede corregir mediante la inactivación de PME, comúnmente se utiliza inhibición térmica; sin embargo, el tratamiento térmico suele afectar de manera negativa la calidad sensorial y nutricional de los jugos. Es por lo anterior, que se ha propuesto utilizar la proteína PMEI como alternativa a los tratamientos térmicos (Bazaraa *et al.*, 2020). Se ha demostrado la efectividad de la adición de polvo de PMEI de kiwi en jugo de naranja, donde Bazaraa y colaboradores (2020) observaron un efecto negativo sobre la actividad de PME, con una inhibición máxima del 89.3% a concentración de 0.3% (p/p). Los usos de estas enzimas e inhibidores en jugos los vuelven compuestos de importancia en la industria alimenticia; sin embargo, mediante la caracterización de estas enzimas de distintas plantas que se podrá revelar su verdadero potencial.

La identificación y caracterización de las enzimas PME y sus inhibidores ha ampliado el conocimiento acerca del proceso de maduración de frutos de importancia comercial, por ejemplo, los trabajos realizados en tomate y fresa (Wen *et al.*, 2020; Xue *et al.*, 2020). En la presente investigación, la caracterización parcial de las familias de genes que codifican para PMEs y PMEIs en mango, aunado a la evaluación de la expresión de algunos de los genes PME y PMEI en los frutos de mango, permitirá identificar genes específicos que tienen un mayor impacto en el ablandamiento de los frutos. La información generada puede ser útil en un futuro para diseñar estrategias de manipulación genética con el fin de alargar la vida de anaquel de estos frutos. También es la base para investigar cómo se regula la expresión de esos genes y buscar maneras de controlar su expresión mediante tecnologías que no requieran manipulación génica.

### 3. HIPÓTESIS

Los productos de los genes *MiPME22*, *MiPME67*, *MiPME2*, *MiPME53.1*, *MiPME32*, *MiPME63.2*, *MiPME18*, *MiPME48.1*, *MiPME3.2*, *MiPME61.2* *MiPME31* y los productos de los genes inhibidores *MiPMEI7.5*, *MiPMEI7.4*, *MiPMEI7.8* y *MiPMEI9* están asociados a la degradación de la pared celular durante el inicio de la maduración postcosecha del mango cv. Ataulfo (*M. indica* L.).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la expresión de los genes de pectin metilesterasa e inhibidores de pectin metilesterasa asociados a la degradación de la pared celular al inicio de la maduración postcosecha del mango cv. Ataulfo (*M. indica* L.).

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Identificar y caracterizar las secuencias de los genes pectin metilesterasa (PME) e inhibidores de pectin metilesterasa (PMEI) en el genoma del mango (*M. indica* L.) cv. Tommy Atkins.
2. Analizar la relación filogenética de las PME y PMEI.
3. Determinar los elementos en *cis* en las regiones promotoras de *MiPME* y *MiPMEI*.
4. Evaluar la expresión génica de *MiPME* y *MiPMEI* en frutos de mango a las 0, 6 y 24 h postcosecha.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Identificación y Análisis de Estructura de MiPME y MiPMEI

Los genes putativos *PME* y *PMEI* de mango (*MiPME* y *MiPMEI*) y las secuencias de aminoácidos deducidas se identificaron en el genoma del mango Tommy Atkins disponible en la base de datos ([https://mangobase.org/easy\\_gdb/index.php](https://mangobase.org/easy_gdb/index.php)) utilizando como referencia las secuencias de las *PME* del transcriptoma del mango Ataulfo (Dautt-Castro *et al.*, 2018) mediante análisis de BLAST. Las secuencias aminoacídicas encontradas se ingresaron a la plataforma SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y se seleccionaron las proteínas con el dominio *PME* o *PMEI* (PF01095 y PF04043, respectivamente). Se clasificó a las proteínas *PME* en tipo-I (dominios *PME* y *PMEI*) y tipo II, (únicamente con dominio *PME*). Se utilizó SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>) para predecir la presencia de péptido señal, ExPASy (<https://www.expasy.org/tools>) para definir el punto isoeléctrico y Plan-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) para predecir la localización subcelular. Adicionalmente, las secuencias nucleótídicas de los genes y sus respectivas secuencias codificantes se analizaron mediante Gene Structure Display Server 2.0 para determinar los intrones y exones de *PME* y *PMEI* (Hu *et al.*, 2015).

### 5.2. Análisis de Localización Cromosómica y Duplicación de Genes

La posición cromosómica de los genes *MiPME* y *MiPMEI* determinada en la secuenciación del genoma se ilustró mediante la herramienta de TBtools (Chen *et al.*, 2020). El análisis de duplicación de la familia de genes *MiPME* y *MiPMEI* se realizó mediante el cálculo de las sustituciones sinónimas ( $K_s$ ) y sustituciones no sinónimas ( $K_a$ ) mediante la página web <http://services.cbu.uib.no/tools/kaks> (Norwegian Bioinformatics Platform). La relación de  $K_a/K_s$  se utilizó para examinar la presión de selección sobre cada par de genes duplicados. Usualmente,

una relación Ka/Ks mayor a 1 indica selección positiva o diversificadora, igual a 1 indica evolución neutra y menor a 1 indica selección negativa o purificadora (Wen *et al.*, 2020).

### 5.3. Alineamiento Múltiple y Análisis Filogenético de PME y PMEI

Se alinearon las secuencias aminoacídicas PME y PMEI de *A. thaliana*, tomate y mango mediante Clustal Omega (McWilliam *et al.*, 2013). Para los análisis de filogenia y construcción de árboles filogenéticos se utilizó IQtree con el método de máxima verosimilitud (Minh *et al.*, 2020). Los miembros de MiPME y MiPMEI se dividieron en grupos tomando como base la clasificación de los miembros de PME y PMEI de *A. thaliana* (AtPME y AtPMEI). El análisis filogenético de PMEs de mango con PMEs de *Solanum lycopersicum* se realizó para seleccionar genes ortólogos de mango a los que participan en la maduración del fruto de tomate, estos genes seleccionados de mango se escogieron para evaluar su expresión génica (Wen *et al.*, 2020).

### 5.4. Identificación de Motivos Conservados de PME y PMEI

Para identificar los motivos conservados, las secuencias de las proteínas MiPME y MiPMEI se analizaron en el servidor MEME de motivos conservados (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) utilizando los siguientes parámetros: cualquier número de repeticiones y largo de motivo óptimo de 6 a 50 aminoácidos. Los diagramas de los motivos identificados se construyeron utilizando el software Tbtools (Chen *et al.*, 2020).

### 5.5. Análisis de Elementos en *cis* de las Regiones Promotoras de *MiPME* y *MiPMEI*

Se utilizó el software CLC Main Workbench para obtener 1.5 Kb de secuencia nucleotídica

corriente arriba del codón de inicio (ATG) de los *MiPME* y *MiPMEI* a evaluar. Posteriormente, a partir de la base de datos de PlantCARE de elementos regulatorios de plantas (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) se identificaron los elementos en *cis* de las regiones promotoras para cada familia de genes.

## 5.6. Material Vegetal

Se cosecharon frutos de mango cv. Ataulfo en El Rosario, Sinaloa (22°59'31"N 105°51'41"O) en estado de madurez fisiológico (frutos de 120 días después de la floración) y se transportaron al laboratorio de postcosecha de CIAD, Culiacán. Los mangos se lavaron con 200 ppm de hipoclorito de sodio y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se seleccionaron aquellos frutos de tamaño y peso uniformes. Los frutos se mantuvieron en una cámara a 20°C y 80% humedad relativa y se muestrearon a las 0, 6 y 24 horas después de ser secados. Finalmente, los mangos se pelaron y se cortaron los cachetes de los cuales se obtuvieron rodajas del mesocarpio para congelar de inmediato en nitrógeno líquido y mantenerse a -80°C para la posterior extracción de RNA total.

## 5.7. Extracción de RNA Total y Síntesis de cDNA

Las muestras de mesocarpio se pulverizaron utilizando nitrógeno líquido y se extrajo el RNA total utilizando el método reportado por López-Gómez y Gómez-Lim (1992) modificado por Dautt-Castro y colaboradores (2015). La integridad del RNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes. Posteriormente, se eliminó el DNA genómico residual con ezDNase™ (Thermo Fisher Scientific) y se realizó la síntesis de cDNA usando la transcriptasa reversa del kit *SuperScript IV VILO* Master Mix (Invitrogen). La concentración de los cDNAs obtenidos se calculó mediante la lectura de  $A_{260}$  en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). La pureza se determinó mediante la relación de  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ .

## 5.8. PCR Cuantitativa y Análisis de Expresión Génica Relativa

Se realizó un análisis de expresión génica relativa de los genes *MiPME* y *MiPMEI* seleccionados mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando los cDNAs de mesocarpio de mango de los distintos tiempos muestreados (0, 6 y 24 horas). Se diseñaron iniciadores específicos (sentido y antisentido) para los genes a evaluar mediante NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y con la base de datos OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) se confirmó que dichos iniciadores no forman estructuras secundarias (Cuadro 2). Cada ensayo de qPCR se realizó por triplicado con el juego de reactivos comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoScientific). Las mezclas de las reacciones contenían lo siguiente en un volumen total de 10  $\mu\text{L}$ : 5  $\mu\text{L}$  SYBR Green, 0.5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador sentido y antisentido (5 $\mu\text{M}$ ) y 4  $\mu\text{L}$  cDNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ). Las condiciones para la amplificación por qPCR fueron las siguientes: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Posteriormente, se analizó la expresión génica mediante el método Delta-Delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) (Schmittgen y Livak, 2008) y se utilizó el gen de Actina 7 (Manin06g006480.1) como gen normalizador. Los resultados obtenidos se graficaron con el programa GraphPad Prism v. 9.0 para MacOS (GraphPad Software, Boston Massachusetts USA) (<https://www.graphpad.com>).

## 5.9. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, donde la variable respuesta fue la expresión génica y la variable de agrupamiento el tiempo posterior al inicio de la maduración postcosecha del fruto (0, 6 y 24 horas). Las diferencias significativas se determinaron con la prueba de Tukey-Kramer. Las pruebas se realizaron a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ), mediante el paquete estadístico NCSS (versión 2022)

**Cuadro 2.** Iniciadores sentido (FW) y antisentido (RV) de *MiPME* y *MiPMEI* utilizados en qPCR

<b>Iniciador</b>		<b>Secuencia (5' - 3')</b>
MiActina	FW	CGTTCTGTCCCTCTATGCCA
	RV	TTCTCCTTCATGTCTCGGAC
MiPME22	FW	CCAATTGAGTGACCAGGAGT
	RV	CGCACACATCAATGAAGGGG
MiPME67	FW	CATTGTTAGCTAGGGTTCCGGC
	RV	CACAGGTAGCTTGACAACCAGA
MiPME2	FW	TGAATTGTGCCATTTCTTCCACG
	RV	AGTTTGCTAGAATCTGGAAATTCGG
MiPME53.1	FW	GACTCCAGCAATCCAGGCAT
	RV	AACACGATCTGCCACTAGGC
MiPME32	FW	TGCCCCCTCAAATATGCAAC
	RV	CCAACATAAGAAGGCGCAGTG
MiPME63.2	FW	GTTATTGCATGCGCCAAAAC
	RV	TCAACATCAGCTGTTTGCATC
MiPME18	FW	TGGCTTGCCTTAGTTTGTGTC
	RV	TCAAACAAGAGAACTCAGGAACAAC
MiPME3.2	FW	CAGTGGAGTCAAATTGAGGCAG
	RV	AGAAGGAGAGTGTAGCAATGGAC
MiPME61.2	FW	TGTTATTTGTAGCCATGTAGGGG
	RV	TCCCAGATTAGGACAAACACCC
MiPME48.1	FW	GCATTAGAGCTTGTGCAAATTGTT
	RV	ACTGGAAATATGTATAGGCTTTGGC
MiPME31	FW	CTGCCTGGCTATTTCAACTCTG
	RV	CAGCCTCAAACATCAAGAAGC
MiPME63.1	FW	CCTATGGTGCCCTAAACCAA
	RV	GCTATGCAAGTTTCTTGTCACTC
MiPMEI7.5	FW	CCGTTTTTGGGGTTATCCAAGG
	RV	TTGAGTTGAGATTAAGGGCGG
MiPMEI7.4	FW	CCTTTCCTTCTCCCTCTTCTCT
	RV	AAATCGACGGATGGAAAAGCG
MiPMEI7.8	FW	CCTCCGTTTAATCTCAGCCC
	RV	TTAGCGGTTGAGAACCGGG
MiPMEI9	FW	CTCAACCGCTAACCAATGGC
	RV	AGACGTAGCAGAGGTTCGGAG

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Identificación y Análisis de Estructura de MiPME y MiPMEI

#### 6.1.1. Características de las Secuencias Nucleotídicas y Aminoacídicas de MiPME y MiPMEI

Las pectin metilesterasas se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y participan en múltiples procesos biológicos de las plantas. Para identificar los genes putativos *MiPME* y *MiPMEI* se utilizó BlastP contra el proteoma del mango ([https://mangobase.org/easy\\_gdb/index.php](https://mangobase.org/easy_gdb/index.php)). Se identificaron 45 *MiPME* y 11 *MiPMEI* putativas y se confirmaron que las secuencias de aminoácidos son proteínas PME y PMEI debido a la presencia de los dominios conservados (Pfam01095 y Pfam4043, respectivamente). Basándose en la estructura de los dominios, de las 45 *MiPME*, 23 se clasificaron como tipo-I y 22 como tipo-II.

La información detallada de las *MiPME*s tipo-I, *MiPME*s tipo-II y las *MiPMEI*s se muestra más adelante (Cuadro 3 y 4). Se incluyen las pares de bases (pb) del marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés), tamaño de proteína (aa, aminoácidos), peso molecular (kDa), punto isoeléctrico (pI), localización subcelular y dominios conservados. Como se ilustra en el cuadro 3, los tamaños de las proteínas *MiPME* tipo-I oscilaron entre 417 aa (*MiPME33*) y 2379 aa (*MiPME44*). En consecuencia, el peso molecular de los miembros *MiPME* tipo-I va desde 45.5 kDa hasta 263.1 kDa y la longitud de los ORFs varía de 1251 pb hasta 7137 pb. Además, el pI de las *MiPME* tipo-I osciló entre 5.63 (*MiPME17*) y 9.57 (*MiPME33*). Con relación a la ubicación celular, se predijo que las 23 *MiPME* tipo-I se localizan en la pared celular. Respecto a los dominios conservados, 19 *MiPME* tipo-I tienen un dominio PMEI y un dominio PME. Mientras que *MiPME2* tiene 2 y 2, *MiPME44* tiene 4 y 5, *MiPME20* tiene 1 y 2 y *MiPME3.2* tiene 2 y 1 dominios conservados PMEI y PME, respectivamente. Wang y colaboradores (2021) reportan que los genes PME que contienen ambos dominios conservados (PME y PMEI) alteraciones estructurales y funcionales en las proteínas PME, esto debido a que la presencia del dominio PMEI mantiene

inactiva a la proteína (Del Corpo *et al.*, 2020). Aun así, el dominio PMEI permite mantener la función básica de esta familia de genes y mejora la diversidad de los genes, por lo tanto, disminuye la presión de selección durante la evolución (Li *et al.*, 2016).

**Cuadro 3.** Características principales de las pectin metilesterasas (MiPME) tipo-I de mango.

MiPME	Clave del Gen cv. Tommy Atkins	Clave del Transcrito cv. Ataulfo	ORF (pb)	Proteína madura			Localización subcelular	Dominios PMEI	Dominios PME
				aa	kDa	pI	Plant-mPLoc		
35	Manin00g002840.1	c30685_g1_i1	1485	494	54.6	9.49	pc	1	1
51.1	Manin00g004600.1	c12344_g1_i1	1611	536	59.4	8.55	pc	1	1
25	Manin00g013520.1	c14325_g1_i1	1704	567	63.6	7.56	pc	1	1
33	Manin01g010620.1	c8494_g1_i1	1254	417	45.5	9.57	pc	1	1
22	Manin02g004650.1	c18464_g1_i1	1617	538	60.1	9.18	pc	1	1
28	Manin02g010270.1	c30665_g1_i1	1665	554	61.2	5.90	pc	1	1
2	Manin04g011360.1	c12355_g1_i1	3417	1138	124.8	6.74	pc	2	2
44	Manin05g004210.1	c17258_g1_i1	7140	2379	263.1	7.49	pc	4	5
54	Manin05g004220.1	c14325_g1_i1	1608	535	58.9	9.13	pc	1	1
3.1	Manin07g004910.1	c13807_g3_i1	1779	592	65.6	6.14	pc	1	1
32	Manin07g004920.1	c18464_g1_i1	1518	505	56	5.65	pc	1	1
47	Manin08g002410.1	c14325_g1_i1	1692	563	63.3	7.06	pc	1	1
18	Manin08g008630.1	c12355_g1_i1	1641	546	60.4	9.13	pc	1	1
6	Manin09g002900.1	c18464_g1_i1	1541	513	56.4	8.91	pc	1	1
61.1	Manin10g003090.1	c18464_g1_i1	1781	593	65.3	9.13	pc	1	1
17	Manin11g000860.1	c14325_g1_i1	1554	517	56.5	5.63	pc	1	1
40	Manin11g004670.1	c12355_g1_i1	1683	560	62.6	9.36	pc	1	1
7	Manin11g004680.1	c13807_g3_i1	1602	533	58.3	8.37	pc	1	1

**Continuación cuadro 3.** Características principales de las pectin metilesterasas (MiPME) tipo-I de mango.

MiPME	Clave del Gen cv. Tommy Atkins	Clave del Transcrito cv. Ataulfo	ORF (pb)	Proteína madura			Localización subcelular Plant-mPLoc	Dominios PMEI	Dominios PME
				aa	kDa	pI			
20	Manin16g012150.1	c14325_g1_i1	2787	928	102.4	6.82	pc	1	2
39	Manin16g012160.1	c12355_g1_i1	1692	563	62.5	9.18	pc	1	1
59	Manin16g015810.1	c12355_g1_i1	1551	516	56.5	8.79	pc	1	1
3.2	Manin18g009520.1	c12355_g1_i1	3567	1188	130.1	8.59	pc	2	1
61.2	Manin19g012060.1	c18464_g1_i1	1806	601	65.5	9.13	pc	1	1

ORF: Marco de lectura abierto en pares de bases (pb). Localización subcelular: pc, pared celular; cl, cloroplasto; n, núcleo; v, vacuola. Dominios conservados: PME (PF01095) y PMEI (PF04043). Genoma cv. Tommy Atkins (Bally et al., 2021) y transcriptoma cv. Ataulfo (Dautt-Castro et al., 2018).

Con respecto a las MiPME tipo-II (cuadro 4), sus productos proteicos oscilaron entre 60 aa (MiPME11.2) y 1353 aa (MiPME63.3). En consecuencia, el peso molecular de MiPME tipo-II va desde 6.5 kDa hasta 150.7 kDa y la longitud del ORF varia de 180 pb hasta 4059 pb. Además, el pI varía de 5.33 (MiPMEQRT1.2) a 9.65 (MiPME51.2). Con relación a la localización subcelular, se predijo que 20 MiPME tipo-II se localizan en la pared celular, dos en el núcleo y uno en la vacuola. Respecto al dominio conservado PME, 18 MiPME tipo-II tienen un dominio conservado PME. Mientras que MiPME48.2, MiPMEQRT1.1, MiPME41 y MiPME63.1 tienen dos dominios y MiPME65 tiene cuatro dominios conservados PME. Similarmente, en tabaco se han reportado múltiples proteínas NtPME que contienen dos dominios PME (Sun *et al.*, 2022). Las proteínas PME provienen de RNA mensajeros policistrónicos, por ejemplo, las proteínas PME1 pueden ser transcritas independientemente o a partir de la región PRO de las proteínas tipo-I y dicha región PRO es cortada por subtilasas (Coculo y Lionetti, 2022). De igual manera, es posible que haya distintos puntos de reconocidos por las subtilasas en la proteína PME inmadura y se pueden obtener dos proteínas PME (según el número de dominios) a partir de un RNA mensajero.

Las propiedades de las MiPMEIs se detallan en el cuadro 5, los tamaños de proteínas MiPMEI oscilaron entre 147 aa (MiPMEI1) a 518 aa (MiPMEI26). En consecuencia, el peso molecular de MiPMEI va desde 16.8 kDa hasta 57.6 kDa y la longitud del ORF varía de 441 pb hasta 1154 pb. Además, el pI varía de 4.60 (MiPMEI7.2) hasta 6.83 (MiPMEI9). En relación con la localización subcelular, se predijo que 11 MiPMEIs se localizan en la membrana celular y 1 en la pared celular. Respecto al dominio conservado PME1, 11 MiPMEIs tienen 1 dominio PME1 y MiPME7.8 tiene 2 dominios conservados PME1.

**Cuadro 4.** Características principales de las pectin metilesterasas (MiPME) tipo-II de mango.

MiPME	Clave del Gen cv. Tommy Atkins	Clave del Transcripto cv. Ataulfo	ORF (pb)	Proteína madura			Localización subcelular	Dominios PME
				aa	kDa	pI	Plant-mPLoc	
8	Manin00g000910.1	c13176_g1_i2	1137	378	41.7	6.16	pc	1
34	Manin00g002310.1	c33184_g1_i1	522	173	18.9	9.51	pc	1
94	Manin00g014880.1	c12355_g1_i1	1131	376	41.6	6.66	pc	1
67	Manin02g010770.1	c14325_g1_i1	1026	341	38.01	6.85	pc	1
68	Manin04g006150.1	c18975_g1_i2	1074	357	39.6	8.06	pc	1
53.1	Manin05g006020.1	c13176_g1_i2	1179	392	43.6	9.48	pc	1
5	Manin06g000520.1	c18057_g1_i1	1266	421	46.8	9.40	pc	1
51.2	Manin06g006100.1	c12355_g1_i1	315	104	11.3	9.65	pc	1
48.2	Manin08g002350.1	c13176_g1_i2	2226	741	80.9	6.30	pc	2
1	Manin08g002360.1	c13176_g1_i2	1122	373	40.8	6.39	pc	1
63.2	Manin08g002480.1	c13176_g1_i2	1287	428	47.3	6.28	pc	1
QRT1.1	Manin10g008200.1	c16358_g1_i1	1104	367	40.9	6.01	pc	2
11	Manin13g003470.1	c18057_g1_i1	1008	335	36.6	6.43	pc	1
65	Manin16g001550.1	c30685_g1_i1	2085	694	77.7	9.19	pc	4
41	Manin16g001580.1	c18464_g1_i1	1131	376	41.7	8.88	pc	2
48.1	Manin16g010260.1	c16358_g1_i1	1104	367	40.4	8.42	pc	1
53.2	Manin16g012800.1	c18975_g1_i4	1992	663	74.9	7.87	n	1

**Continuación cuadro 4.** Características principales de las pectin metilesterasas (MiPME) tipo-II de mango.

MiPME	Clave del Gen cv. Tommy Atkins	Clave del Transcripto cv. Ataulfo	ORF (pb)	Proteína madura			Localización subcelular	Dominios PME
				aa	kDa	pI	Plant-mPLoc	
15	Manin19g004860.1	c25643_g1_i9	3699	1232	135.3	5.93	n	1
QRT1.2	Manin19g015860.1	c33184_g1_i1	1113	370	41.2	5.33	pc	1
31	Manin20g001920.1	c18057_g1_i1	951	316	35.4	6.17	pc	1
63.3	Manin20g004000.1	c13176_g1_i1	4062	1353	150.7	5.50	v	1
63.1	Manin20g004020.1	c13176_g1_i2	1167	388	43.01	7.07	pc	2

ORF: Marco de lectura abierto en pares de bases (pb). Localización subcelular: pc, pared celular; cl, cloroplasto; n, núcleo; v, vacuola. Dominios conservados: PME (PF01095). Genoma cv. Tommy Atkins (Bally *et al.*, 2021) y transcriptoma cv. Ataulfo (Dautt-Castro *et al.*, 2018).

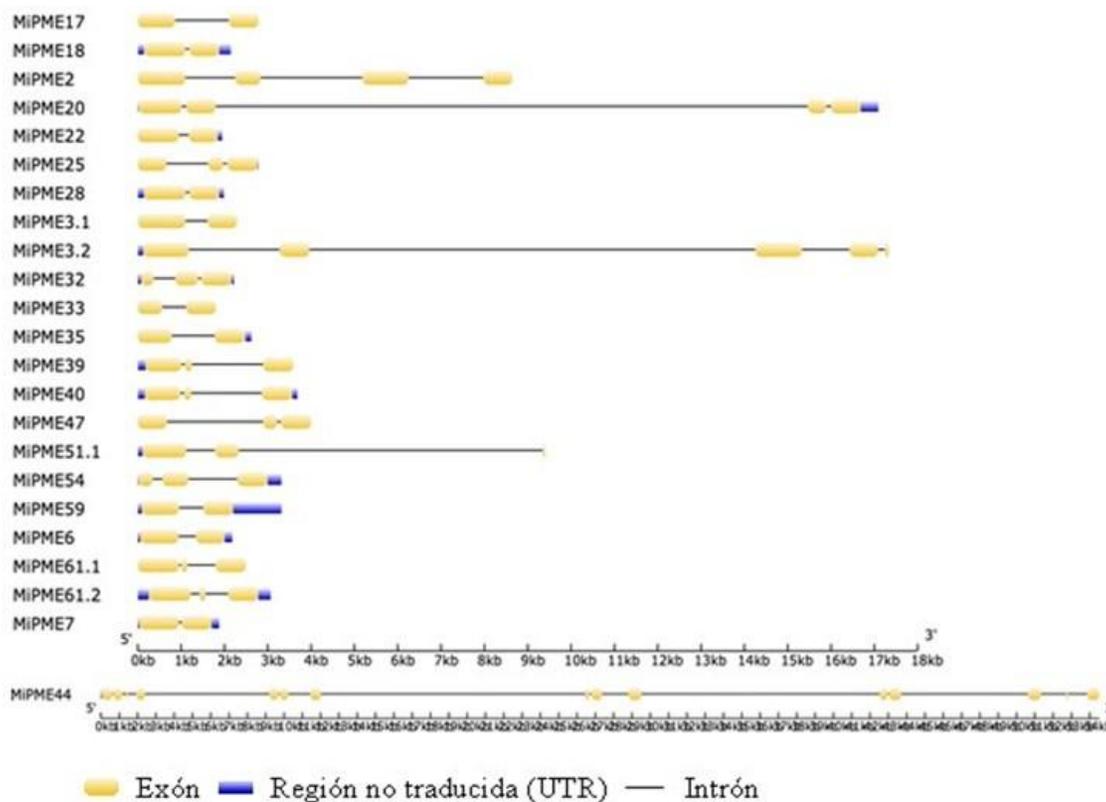
**Cuadro 5.** Características principales de proteínas inhibidoras de las pectin metilesterasas (MiPMEI) de mango.

MiPMEI	Clave del Gen cv. Tommy Atkins	Clave del Transcripto cv. Ataulfo	ORF (pb)	Proteína madura			Localización subcelular	Dominios PMEI
				aa	kDa	pI	Plant-mPLoc	
26	Manin04g002540.1	c19539_g1_i1	1557	518	57.6	7.05	pc	1
7.2	Manin09g002880.1		570	189	20.2	4.60	mc	1
1	Manin11g000140.1	c14820_g1_i1	444	147	16.8	6.81	mc	1
7.5	Manin16g001470.1	c14820_g1_i1	657	218	23.1	5.10	mc	1
7.7	Manin16g001490.1		567	188	20.5	5.70	mc	1
7.9	Manin16g001510.1	c6631_g1_i1	771	256	28.4	7.50	mc	1
7.6	Manin16g001530.1		570	189	20.7	5.44	mc	1
7.3	Manin16g001540.1	c6631_g1_i1	681	226	24.6	5.91	mc	1
7.1	Manin16g001560.1	c6631_g1_i1	675	224	24.6	6.14	mc	1
7.4	Manin16g001600.1		672	223	24.4	6.72	mc	1
7.8	Manin16g001620.1	c14820_g1_i1	1071	356	38.9	5.14	mc	2
9	Manin16g001630.1		588	195	21.9	6.83	mc	1

ORF: Marco de lectura abierto en pares de bases (pb). Localización subcelular: pc, pared celular; mc, membrana celular. Dominio conservado: PMEI (PF04043). Genoma cv. Tommy Atkins (Bally *et al.*, 2021) y transcriptoma cv. Ataulfo (Dautt-Castro *et al.*, 2018).

### 6.1.2. Análisis de Estructura de los genes *MiPME* y *MiPMEI*

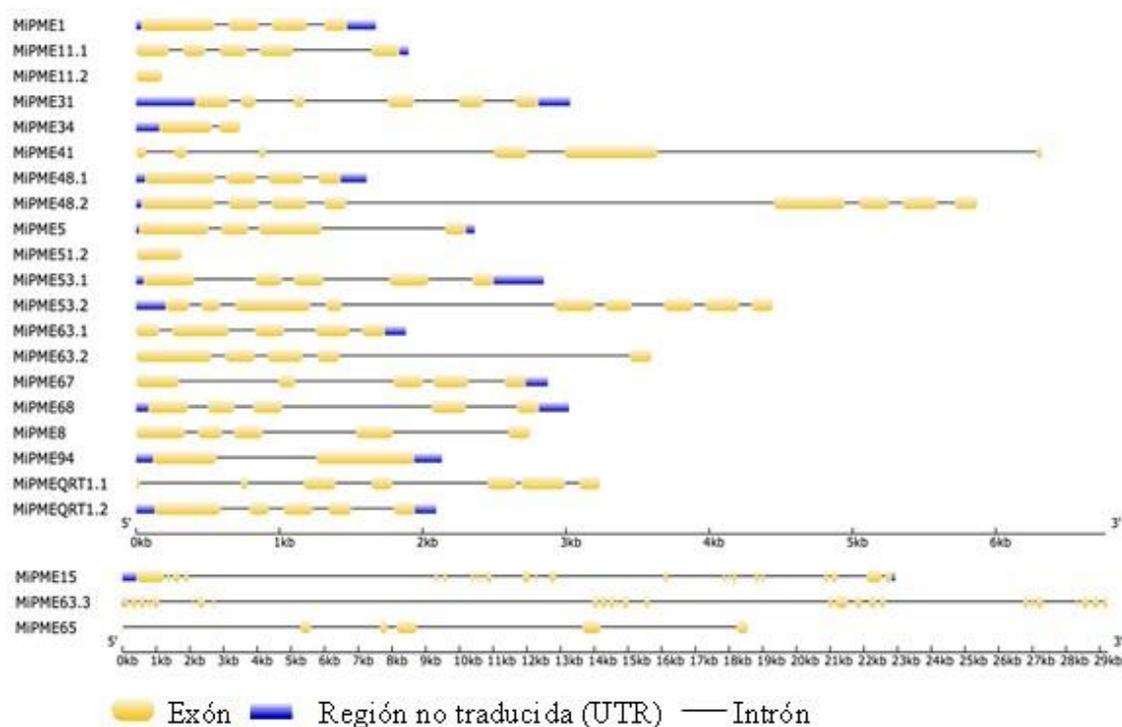
Se analizó la organización estructural (intrones-exones y regiones UTR) de los 46 *MiPME*. Este análisis reveló que los genes PME contienen distinta cantidad de exones e intrones y los miembros de los subgrupos tienen una estructura similar, con ciertas excepciones. La estructura de los *MiPME* tipo-I fue consistente respecto al número de intrones, 2 a 4 (Figura 3).



**Figura 2.** Estructura de los genes *MiPME* tipo-I. En amarillo se indican los exones, en negro los intrones y en azul regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR).

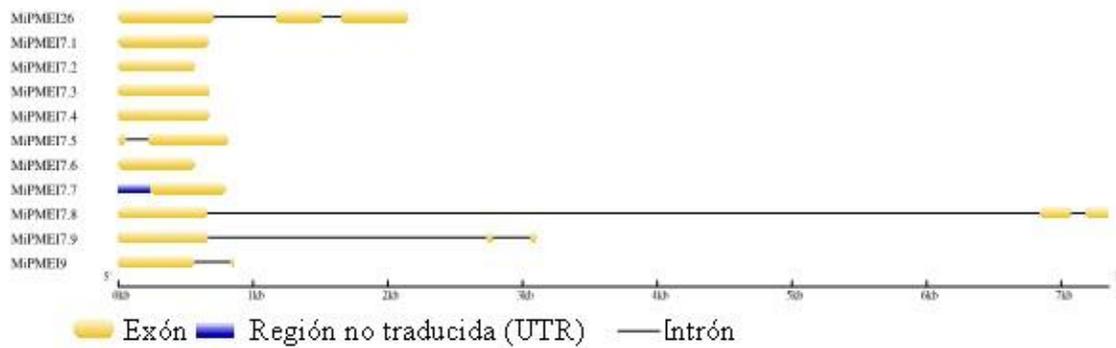
A excepción de *MiPME44*, el cual cuenta con 14 intrones, esto se puede deber a que el ORF de *MiPME44* es de 7140 pb, es más largo que los otros miembros del subgrupo (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los reportados en *PMEs* tipo-I de tomate y durazno, los cuales presentaron un rango de entre 0 a 4 intrones (Wen *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2017). En el caso de los

*MiPMEs* tipo-II, la mayoría de los genes contienen de 0 a 8 exones. Sin embargo, *MiPME15* y *MiPME63.3* contienen 22 y 25 intrones, respectivamente (Figura 4). Mientras que en tomate se reportan de 3 a 5 intrones para los genes PME tipo-II (Wen *et al.*, 2020). Se reporta que los intrones están asociados a la expansión de las familias de genes durante la evolución de las plantas (Wang *et al.*, 2021).



**Figura 3.** Estructura de los genes *MiPME* tipo-II. En amarillo se indican los exones, en negro los intrones y en azul regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR).

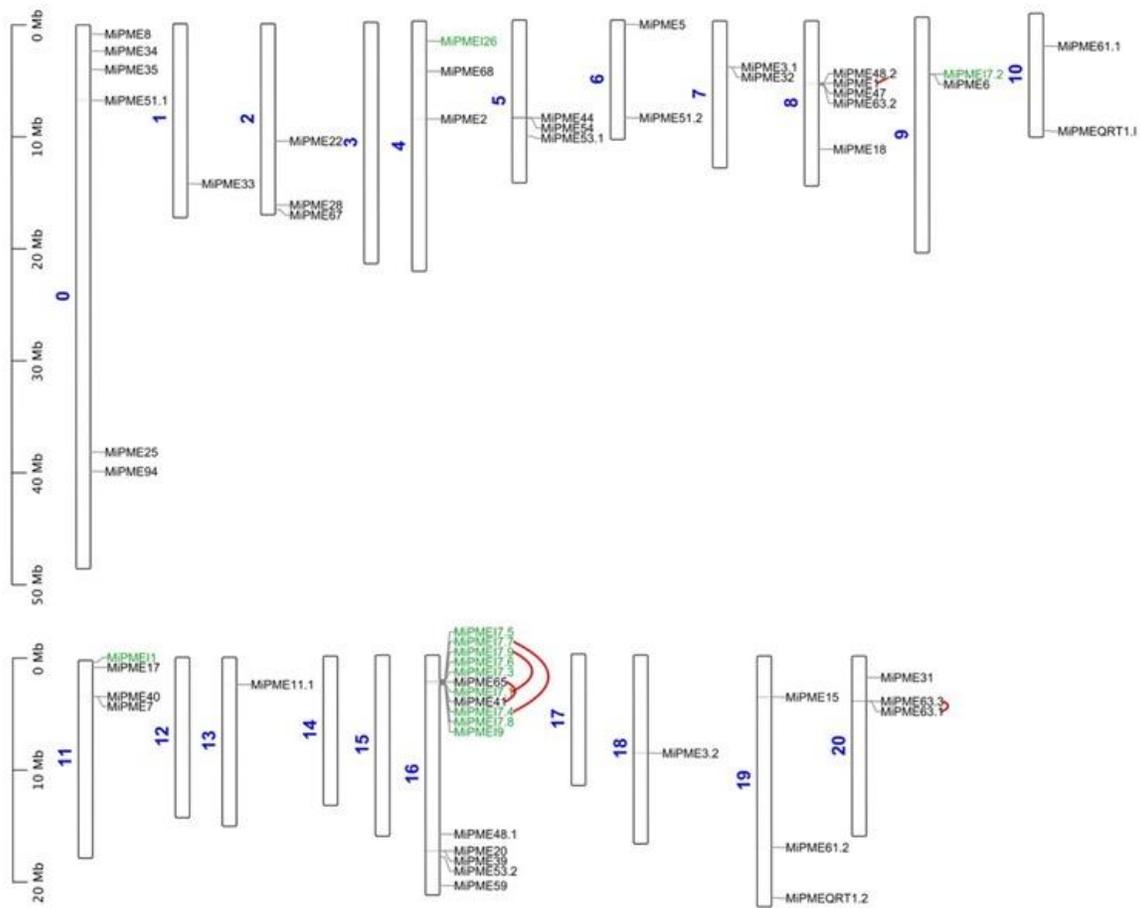
En un estudio realizado en soya por Wang y colaboradores (2021), mencionan que los genes que contienen intrones largos e interrumpidos son más resistentes que aquellos con menos intrones, como es el caso de *GmPME105*, *GmPME106* y *GmPME115*. En el caso de *MiPME* podemos señalar que *MiPME20*, *MiPME3.2* y *MiPME44* contienen intrones largos, lo cual se podría asociar a una expansión reciente de esta familia de genes. Con respecto a la estructura de los genes PME1, se observaron en ellos de 0 a 2 intrones (Figura 5). Estos resultados son consistentes a los reportados en durazno, donde la mayoría de los genes PME1 no tiene intrones y se conforman mayormente por un exón (Zhu *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Estructura de los genes MiPMEI. En amarillo se indican los exones, en negro los intrones y en azul regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR).

## 6.2. Análisis de Localización Cromosómica y Duplicación de Genes

La localización de los genes MiPME se muestra de forma gráfica en los 20 cromosomas del mango se muestra de forma gráfica en la figura 6. Los 45 genes MiPME y 12 genes MiPMEI se distribuyen en 16 y 4 cromosomas, respectivamente. En general, estas familias de genes se encuentran desigualmente distribuidas en 15 de los 20 cromosomas y en el cromosoma 16 se encuentra la mayor cantidad de genes de ambas familias (7 *MiPMEs* y 9 *MiPMEIs*). Entre los genes duplicados MiPME se encontraron 21 tipo-I y 17 tipo-II (Cuadro 6); lo cual indica que no se favoreció la expansión de un tipo de PME en particular y explica porque el tamaño de ambos grupos es similar (23 tipo-I y 22 tipo-II). En tomate observaron una mayor cantidad de PMEs tipo-I en los eventos de duplicación, el cual está relacionado a la expansión de PMEs tipo-I en el genoma del tomate (36 tipo-I y 21 tipo-II) (Wen *et al.*, 2020).



**Figura 5.** Distribución cromosómica de los genes *MiPME* y *MiPMEI*. La posición de los genes en los cromosomas es de acuerdo con el genoma del mango. Pares de genes *MiPME* y *MiPMEI* duplicados en tándem se señalan con una línea roja.

La relación  $K_a/K_s$  se puede utilizar como un indicador de la presión de selección evolutiva de una familia de genes (Cuadro 6). Además, el método utilizado proporcionó los pares de genes duplicados, con la localización cromosómica de dichos genes se identificó el tipo de evento de duplicación. Los valores  $K_a/K_s$  de los 19 pares de genes fueron menores a 1, lo cual indica que la familia de genes *MiPME* pudo haber pasado por presión negativa o purificadora durante la evolución. La selección negativa es el tipo de selección natural más frecuente y se debe a que, a nivel molecular, elimina los cambios en las secuencias de aminoácidos que resultan en la reducción de la aptitud (Fetterman *et al.*, 2008).

**Cuadro 6.** Sustituciones sinónimas y no sinónimas de pares de genes duplicados *MiPME*

<i>MiPME</i>	Tipo	<i>MiPME</i>	Tipo	Evento duplicación	Ka	Ks	Ka/Ks	Presión de selección
41	II	65	II	Tándem	0.09	0.22	0.41	Negativa
39	I	40	I	Segmental	0.03	0.10	0.30	Negativa
32	I	44	I	Segmental	0.06	0.19	0.33	Negativa
6	I	8	II	Segmental	0.32	0.51	0.63	Negativa
22	I	54	I	Segmental	0.21	0.47	0.45	Negativa
53.1	II	3.1	I	Segmental	0.30	0.48	0.63	Negativa
3.2	I	2	I	Segmental	0.04	0.13	0.33	Negativa
5	II	33	I	Segmental	0.29	0.53	0.55	Negativa
63.3	II	63.1	II	Tándem	0.01	0.02	0.50	Negativa
18	I	35	I	Segmental	0.18	0.45	0.40	Negativa
61.1	I	61.2	I	Segmental	0.03	0.15	0.22	Negativa
63.2	II	48.1	II	Segmental	0.17	0.45	0.38	Negativa
1	II	48.2	II	Tándem	0.00	0.01	0.09	Negativa
7	I	20	I	Segmental	0.04	0.16	0.27	Negativa
47	I	25	I	Segmental	0.05	0.18	0.29	Negativa
11	II	67	II	Segmental	0.21	0.49	0.43	Negativa
QRT1.1	II	QRT1.2	II	Segmental	0.04	0.15	0.28	Negativa
15	II	53.2	II	Segmental	0.34	0.46	0.73	Negativa
17	I	59	I	Segmental	0.03	0.11	0.27	Negativa

Ks: Sustituciones sinónimas, Ka: sustituciones no sinónimas.

En la familia *MiPME* se detectaron 3 pares de genes que se duplicaron en tándem en los cromosomas 8, 16 y 20 (Figura 6). En contraste, se detectaron 17 pares de genes que sufrieron eventos de duplicación segmental, los cuales son 5 veces más que los genes duplicados en tándem (Figura 7). Con esta información podemos inferir que la duplicación segmental fue el principal evento que llevó a la derivación de nuevos genes *MiPME*. En distintas plantas como soya, fresa y manzana, se ha reconocido a la duplicación segmental como la principal fuerza que impulsa la expansión de la familia PME (Wang *et al.*, 2021; Xue *et al.*, 2020). Por otro lado, tanto la duplicación segmental como en tándem tienen un gran impacto en la duplicación de PMEs en tomate (Wen *et al.*, 2020).



**Cuadro 7.** Sustituciones sinónimas y no sinónimas de pares de genes duplicados *MiPMEI*

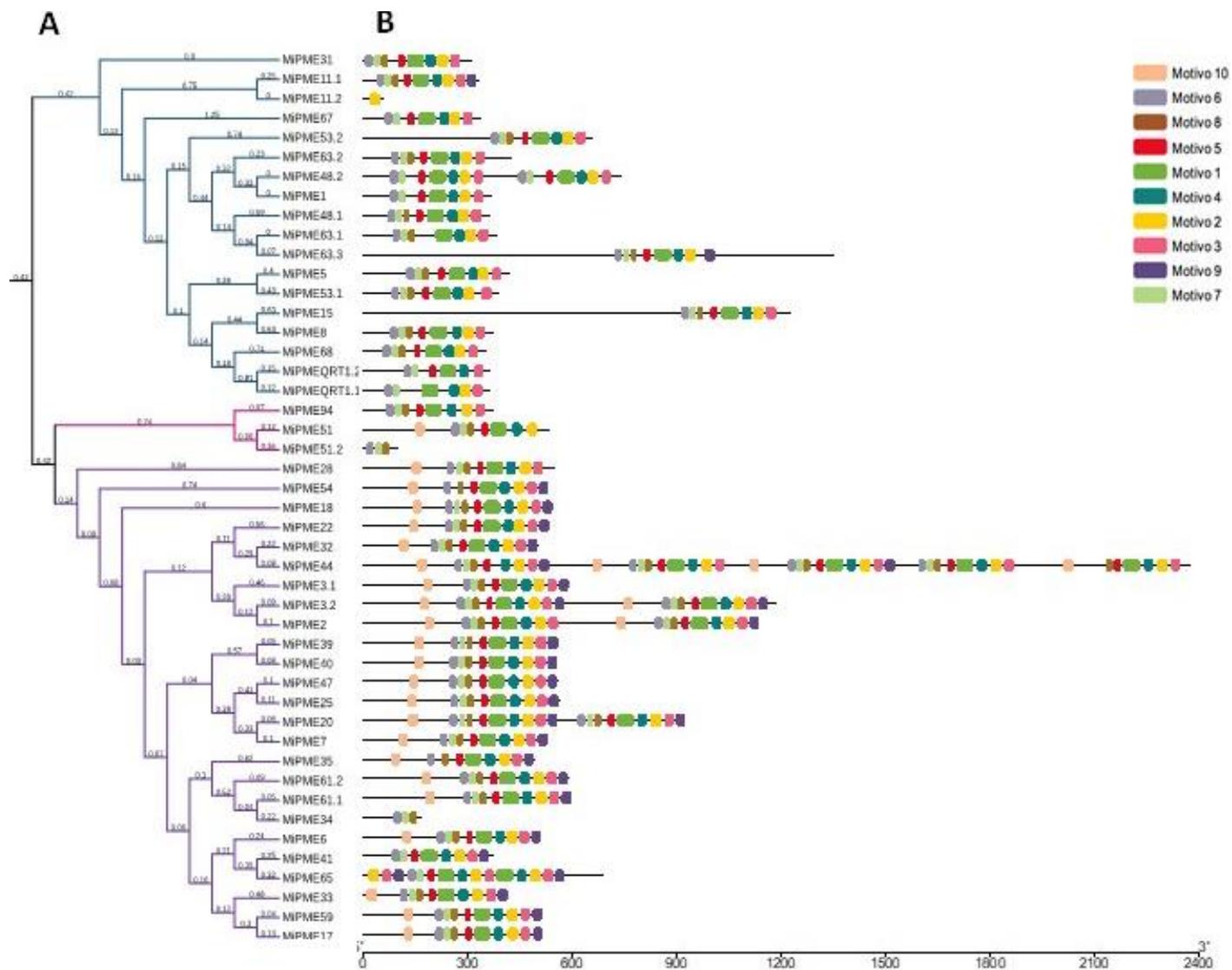
Pares de genes <i>MiPMEI</i>		Evento duplicación	Ka	Ks	Ka/Ks	Presión de selección
7.1	7.9	Tándem	0.026	0.020	1.269	Positiva
7.4	7.7	Tándem	0.033	0.053	0.625	Negativa
1	26	Segmental	0.380	0.544	0.697	Negativa
7.5	7.2	Segmental	0.044	0.163	0.269	Negativa

Ks: Sustituciones sinónimas, Ka: sustituciones no sinónimas.

En un trabajo realizado por Bally y colaboradores (2021), en mango cv. ‘Tommy Atkins’ en donde se evaluó la expansión y compresión de distintas familias de genes en mango, determinaron que las familias de PMEI e inhibidores de invertasa se comprimieron significativamente. Se identificaron 12 genes de PMEI en el genoma del mango, mientras que en soya se identificaron 170 y en otros frutos climatéricos como tomate se identificaron 48 genes PMEI y 30 en durazno (Wang *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2017). Que esta familia haya pasado por eventos de compresión en mango habla de la necesidad de reducir la inhibición de PME en este fruto; el mango es un fruto que pierde la firmeza con rapidez, por lo cual es imprescindible la remodelación de las pectinas durante etapas tempranas de la maduración.

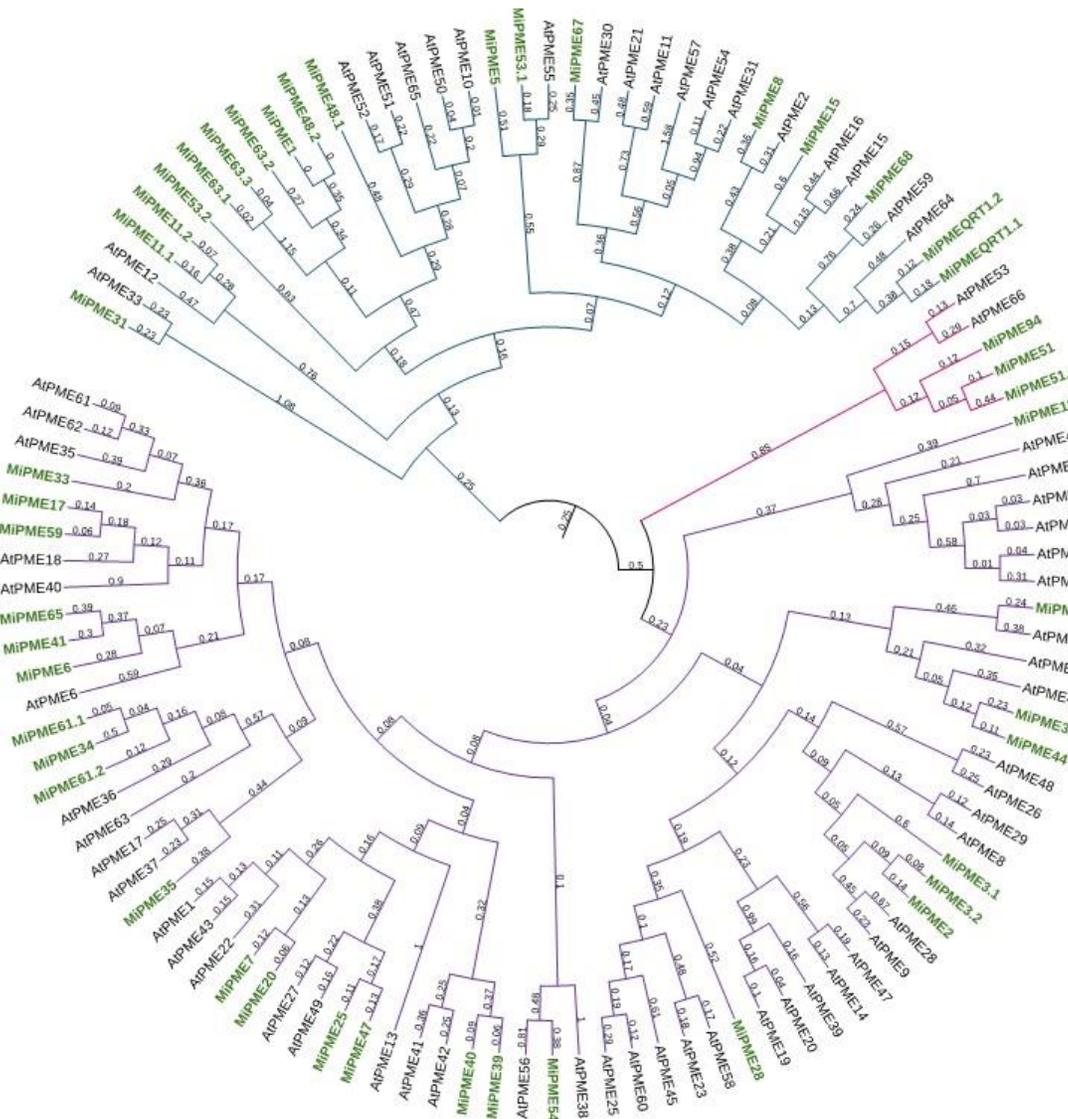
### 6.3. Alineamiento Múltiple y Análisis Filogenético

Para entender la relación evolutiva entre las PME de *M. indica* L., se realizó un árbol filogenético de máxima verosimilitud basándose en el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las 46 *MiPME*. Las proteínas PME se clasificaron en tres clados; el clado III es el más amplio con 22 *MiPME* tipo-I y tres *MiPME* tipo-II, el clado I contiene 18 *MiPME* tipo-II y el clado II se conforma por una *MiPME* tipo-I y dos *MiPME* tipo-II (Figura 8A).



**Figura 7.** Análisis filogenético y motivos conservados de los miembros MiPME. **(A)** Relación filogenética de 46 MiPME. Las proteínas PME se agruparon en tres clados, I (azul), II (rosa) y III (morado). El árbol se generó utilizando IQtree mediante el método de máxima verosimilitud. **(B)** Patrón de motivos conservados de MiPME. Se representan diez motivos-MEME en diferentes colores. Además, el largo de los motivos se puede estimar utilizando la barra de escala en la parte inferior.

Para analizar la relación entre las PME de *M. indica* L. y *A. thaliana*, se construyó un árbol filogenético con las 46 y 66 PMEs, respectivamente (Figura 9).

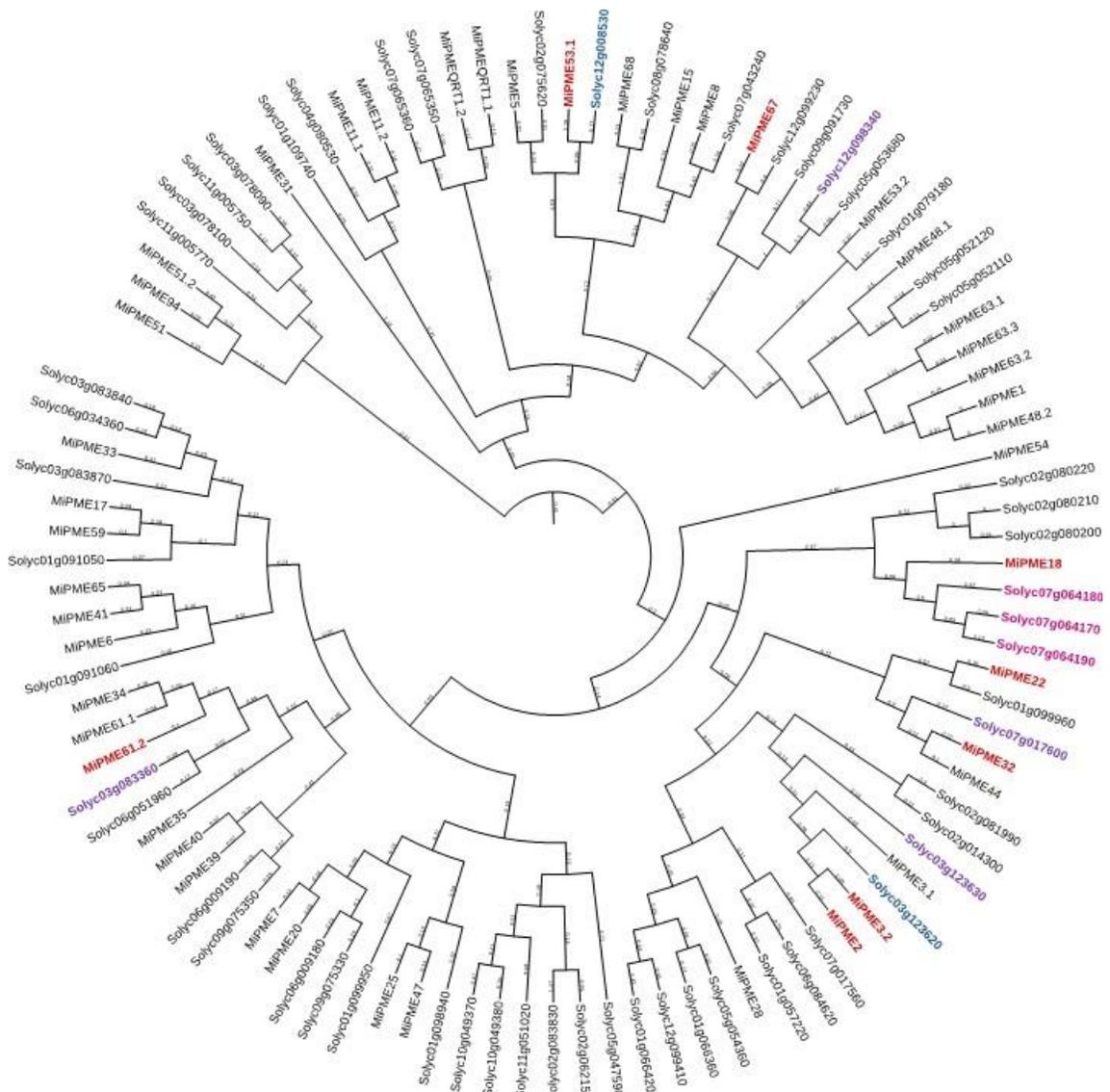


**Figura 8.** Relación filogenética de 46 MiPME y 66 AiPME. Las proteínas PME se agruparon en 3 clados, I (azul), II (rosa) y III (morado). El árbol se generó utilizando IQtree mediante el método de máxima verosimilitud

Las 112 PMEs se agruparon en tres clados, lo cual es consistente con la clasificación de MiPME. El clado III es el más extenso con 70 PMEs de las cuales sesenta y tres son tipo-I y siete son tipo-II, el clado I contiene 37 PMEs tipo-II y el clado II contiene 5 PMEs, tres tipo-I y dos tipo-II. Cada

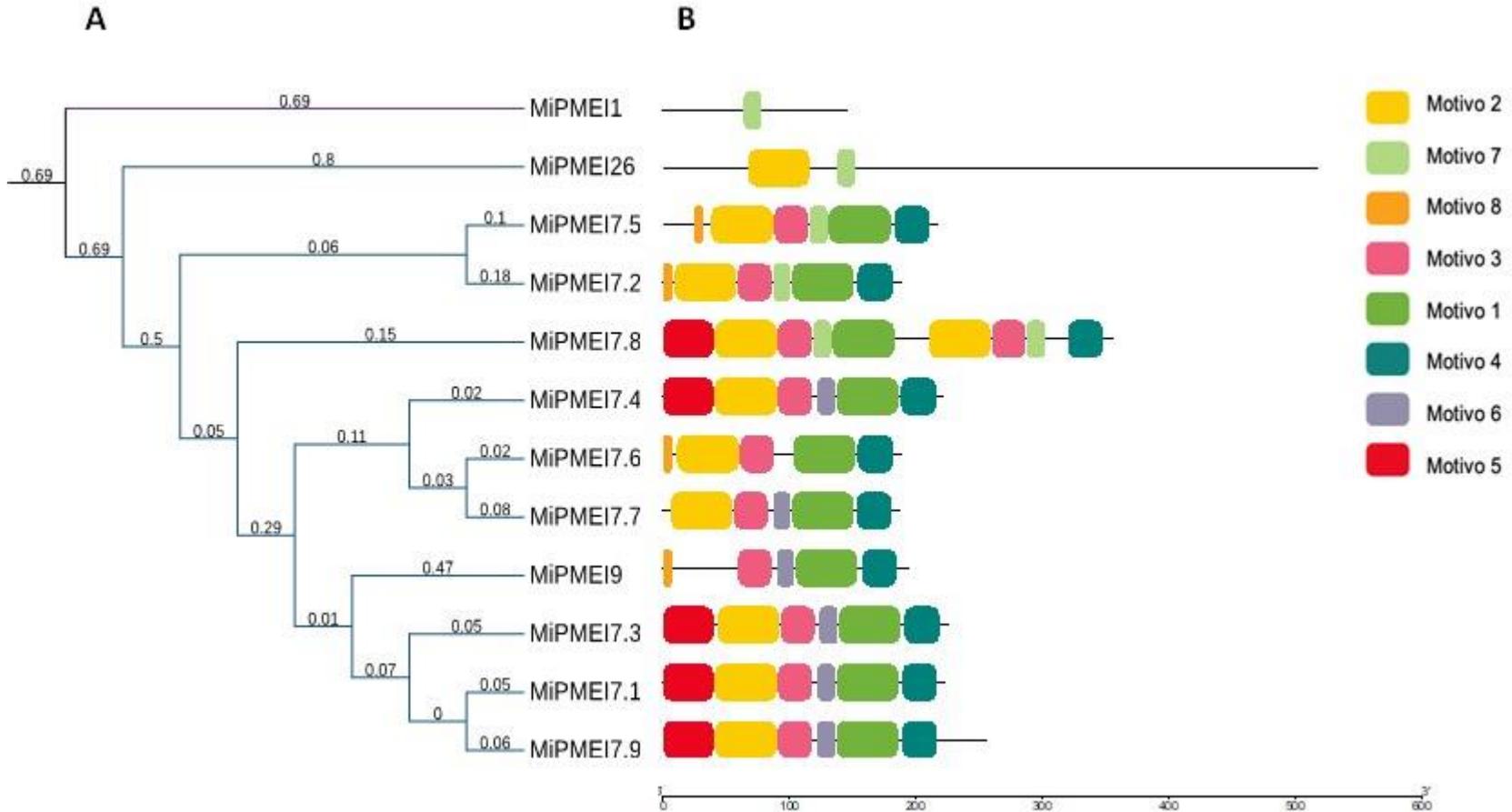
clado contiene tanto miembros de la familia MiPME como de AtPME, lo cual sugiere que los genes MiPME y AtPME evolucionaron de un ancestro en común. Esta clasificación es consistente a la reportada para *A. thaliana*, el análisis filogenético de los miembros AtPME los agrupa en cuatro grupos, del clado I al III son tipo-I, a excepción de dos PMEs tipo-II y el clado IV se conforma solamente por PMEs tipo-II (Louvet *et al.*, 2006).

Se construyó un árbol filogenético con 46 PMEs de *M. indica* L. y 57 PMEs de tomate, con la finalidad de seleccionar genes ortólogos para realizar análisis de expresión génica. Wen y colaboradores (2020) evaluaron la expresión génica de PMEs para inferir actividad PME en distintas partes de la planta de tomate, incluyendo el fruto. La comparación de las PME de tomate con las de mango permitió seleccionar genes ortólogos que, por su misma definición, tendrán productos proteicos que realizan una misma función debido a que tienen el mismo origen evolutivo. En la figura 10 se resaltan genes de tomate inducidos por etileno, Solyc03g083360, Solyc07g071600 y Solyc12g098340, cuyos genes ortólogos de mango son *MiPME61.2*, *MiPME32*, *MiPME22* y *MiPME67*, respectivamente. Se resaltan genes que mostraron acumulación de transcritos en la maduración de tomate Solyc07g064180, Solyc07g064170 y Solyc07g06419, de los cuales el ortólogo de mango fue *MiPME18*. Finalmente, los genes Solyc03g123620 y Solyc12g008530 mostraron acumulación de transcritos durante el desarrollo de tomate y sus ortólogos son *MiPME3.2*, *MiPME2* y *MiPME53.1*, respectivamente. Adicionalmente, se seleccionó *MiPME31*, *MiPME48.1* y *MiPME63.1* debido a que fueron evaluados por Dautt-Castro y colaboradores (2015), donde reportan expresión a partir de las 24 horas postcosecha de mango Kent. Por último, se seleccionó *MiPME63.2* ortólogo de Prupe.7G192800 un gen PME de durazno que está relacionada a la maduración del fruto (Zhu *et al.*, 2017).



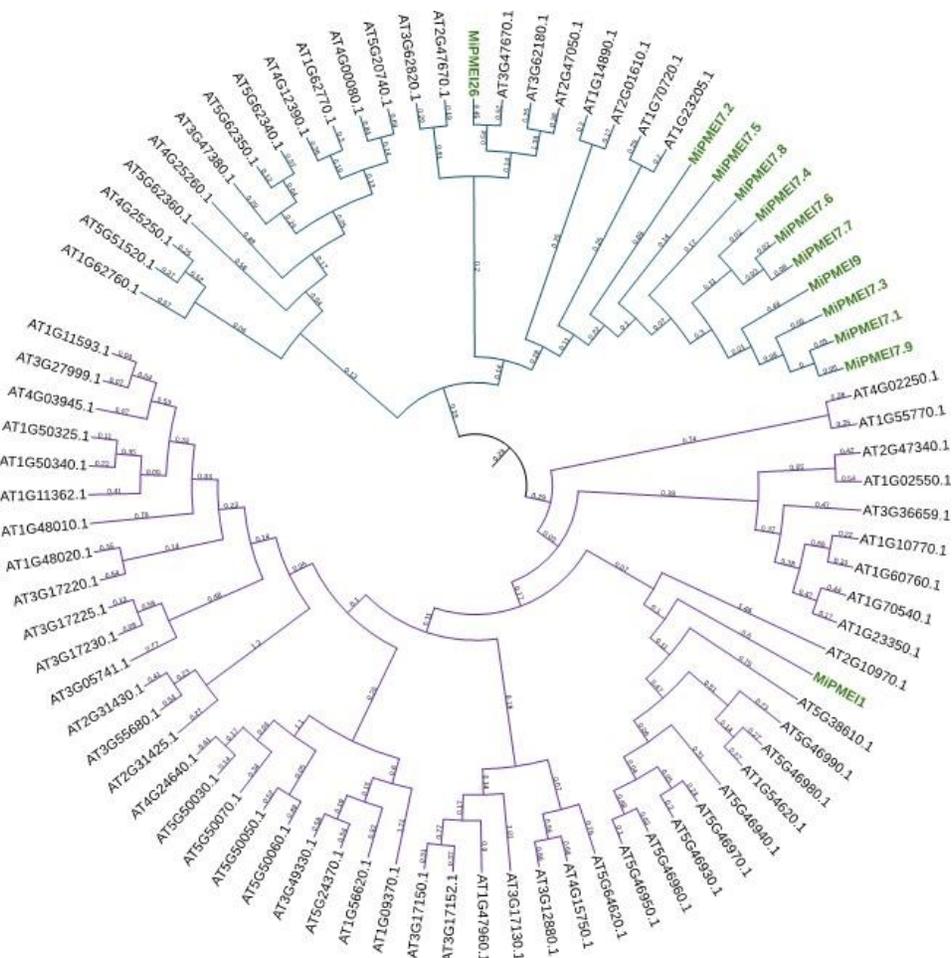
**Figura 9.** Relación filogenética de 46 MiPME y 56 PME de *S. lycopersicum*. Ortólogos de mango seleccionados para análisis de expresión génica (rojo), genes de tomate inducidos por etileno (morado), acumulación de transcritos en maduración de tomate (rosa) y acumulación de transcritos durante desarrollo de tomate (azul). El árbol se generó utilizando IQtree mediante el método de máxima verosimilitud.

Por otra parte, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con las secuencias de aminoácidos de 12 MiPMEI con base en el alineamiento múltiple de estas secuencias. Las proteínas PMEI se clasificaron en dos clados, el grupo más amplio es el clado II con 11 PMEI y el clado I contiene una PMEI (Figura 11A).



**Figura 10.** Análisis filogenético y motivos conservados MiPMEI. **(A)** Relación filogenética de 12 MiPMEI. Las proteínas PMEI se agruparon en dos clados, I (morado) y II (azul). El árbol se generó utilizando IQtree mediante el método de máxima verosimilitud. **(B)** Patrón de motivos conservados de MiPMEI. Se representan ocho motivos-MEME en diferentes colores. Además, el largo de los motivos se puede estimar utilizando la barra de escala en la parte inferior.

Al analizar la relación evolutiva entre las 12 MiPMEIs y 71 AtPMEI se observaron dos grupos entre las 83 PMEIs, en este caso el clado I es más extenso con 51 PMEIs, de las cuales una es de *M. indica* L. y el clado II cuenta con 32 PMEIs (Figura 12). Otras plantas como la soya tienen familias PMEI más amplias (170 GmPMEIs), al explorar su relación filogenética con 59 PMEIs de *Arabidopsis* observaron un mayor número de clados, en este caso reportan cuatro clados (Wang *et al.*, 2020). Por otro lado, en las secuencias de los inhibidores de PME de *M. indica* L. no se encontró ninguna característica en común que distinga subgrupos. En un estudio de durazno realizado por Zhu y colaboradores (2017) reportaron resultados similares, donde construyeron un árbol filogenético con 30 PMEIs de durazno y 77 PMEIs de *Arabidopsis* con el cual determinaron que la subclasificación de los inhibidores de pectin metilesterasas es ambigua.



**Figura 11.** Relación filogenética de 12 MiPMEI y 71 AtPMEI. Las proteínas PMEI se agruparon en dos clados, I (morado) y II (azul). El árbol se generó utilizando IQtree mediante el método de máxima verosimilitud.

#### 6.4. Identificación de Motivos Conservados

El análisis de motivos conservados se llevó a cabo con la finalidad de ilustrar los dominios conservados de las MiPME y además provee evidencia para apoyar las agrupaciones del análisis filogenético de las MiPME. Se identificaron 10 motivos conservados MEME con longitudes de 21 a 50 residuos de aminoácidos en las 46 MiPMEs. Notablemente, del motivo 1 al 5 corresponden al dominio conservado PME y el motivo 10 mapea para el dominio conservado PMEI, es por lo anterior que el motivo 10 solamente se presentó en los miembros MiPME tipo-I (Cuadro 8). Los motivos 1 y 2 se presentan en casi todas las secuencias de las proteínas MiPME, a excepción de MiPME11.2, MiPMEQRT1.2, MiPME51.2 y MiPME34 (Figura 8B). Los motivos 9 y 10 no se observan en los clados II y I, respectivamente. Cabe mencionar que la agrupación de los clados mostró patrones y órdenes regulares, respecto a los motivos conservados MEME de la familia MiPME. El análisis de motivos conservados en frutos como tomate, fresa y naranja mostraron resultados similares, con respecto a que cuentan con un motivo que mapea al dominio PMEI y ya sea 9 en tomate, 9 en fresa y 7 motivos MEME en naranja que mapean para el dominio PME (Li *et al.*, 2022; Wen *et al.*, 2020; Xue *et al.*, 2020).

**Cuadro 8.** Secuencias consenso de los diez motivos-MEME de las proteínas MiPME

Motivo	Secuencia consenso	Largo	Dominio conservado
1	ADLSAFYRCSFIGYQDTLYVHSGRQFYRDCYIYGTVDIFFGNAAVVFQNC	50	PME
2	SGKTYLGRPWKEYSRTVFMQTYIGDLINPAGWL	33	PME
3	ALKTLYYGEYKNTGPGANTSGRVKWPQYH	29	PME
4	NQKNTITAQGRTDPNZNTGFSIQNCKITA	29	PME
5	GFIARBIFENTAGPPKHQAV	21	PME
6	VAKDGSGBFKTISDAVNAAPENST	24	*
7	KRFIIYIKAGVYKENVEIPKK	21	*
8	KKNIMFIGDGIGKTIVITGSRN	21	*
9	TEASKFTVGNFJAGNSWLPSTGVPFTAGL	29	*
10	SQKADDLKTWLSAALTNQZTCLDGFEEFN	29	PMEI

\*No mapea para un dominio conservado

En el caso de los inhibidores se identificaron 8 motivos conservados MEME con longitudes de 8 a

50 residuos de aminoácidos en las 12 MiPMEIs. Las secuencias consenso de residuos de aminoácidos de los motivos 1 y 2 mapean para el dominio conservado PMEI (Cuadro 9). Al menos uno de los motivos 1 y 2 se presentan en todas las proteínas MiPMEI, a excepción de MiPMEI1. Las proteínas dentro del clado II muestran una distribución de motivos similar, mientras que el clado I es una proteína (MiPMEI1) en la cual se reconoció el motivo 7 (Figura 11B). Similarmente, en naranja se identificaron 10 motivos conservados de los cuales 3 mapean para el dominio conservado PMEI (Li *et al.*, 2022). La estructura y patrón de los motivos conservados de los miembros MiPMEI apoya la agrupación filogenética y conservación de la familia PMEI de *M. indica* L.

**Cuadro 9.** Secuencias consenso de los ocho motivos-MEME de las proteínas MiPMEI

Motivo	Secuencia consenso	Largo	Dominio conservado
1	DEIQKSLKQMRDLGAAGSSKERLRSLLFVQVTWITGASIDHSTCTDNFDD	50	PMEI
2	PGSQPLTNGSDFIRSSCKCTTYPDLCYASLEPYRSVNE DLAKLSIVAIG	50	PMEI
3	VSLEKVKTMASYLANLSRDADHKSDPRM	28	*
4	DGPLKEDVIARAAYVRKFTSIALGLVNCY	29	*
5	MNKNTSRPLFLLPLLFLFNLRLVSALNINAMPSVDFIPSPS	41	*
6	LQLCLDLIGGDDGAV	15	*
7	SSALHDCLSNFGDAV	15	*
8	MPSVDFIP	8	*

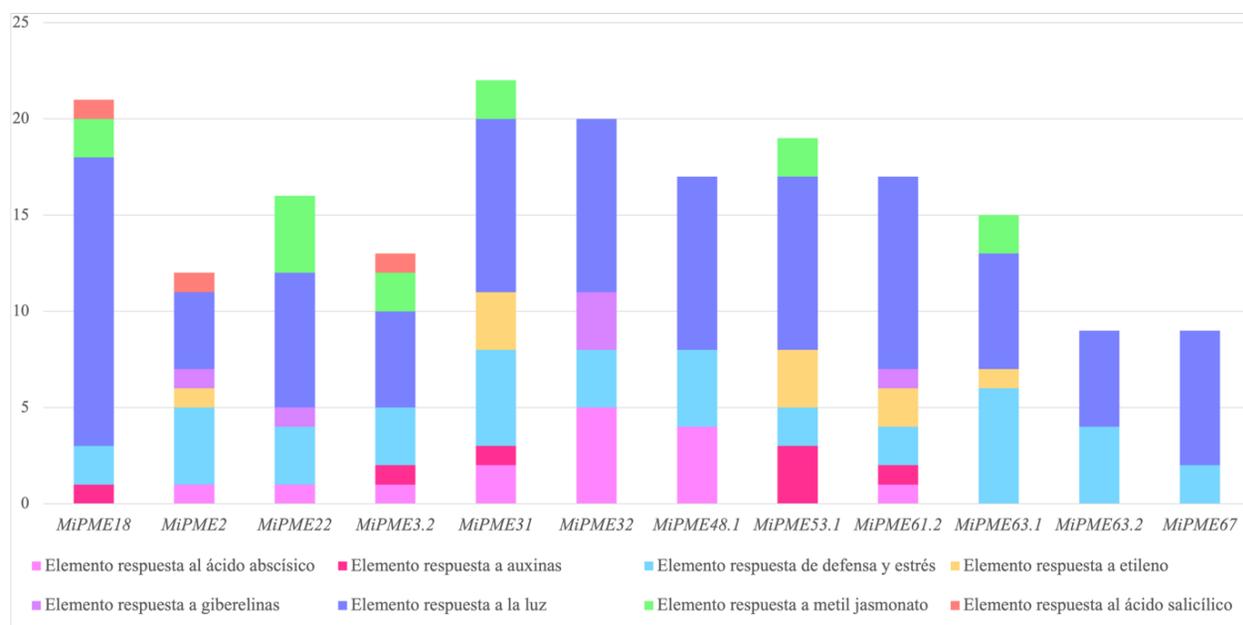
\*No mapea para un dominio conservado

## 6.5. Análisis de Elementos en *cis* de las Regiones Promotoras

### 6.5.1. Análisis de Elementos en *cis* de las Regiones Promotoras de *MiPME*

Adicionalmente, para esclarecer aspectos de la regulación de *MiPME* se analizaron las regiones promotoras (1.5 Kb corriente arriba del ATG) de los 12 *MiPME* seleccionados para análisis de expresión génica relativa. En la figura 13 se ilustra un total de 8 diferentes tipos de elementos en

*cis*, entre los cuales se encuentran elementos que sugieren que los genes MiPME responden a hormonas y estrés, como los elementos de respuesta a ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), auxinas (IAA), etileno, giberelinas (GA) y metil jasmonato (MeJA), elementos de defensa y estrés como sequía y temperaturas bajas.



**Figura 12.** Elementos en *cis* de las regiones promotoras de *MiPME*. Análisis de 1.5 Kb corriente arriba del ATG de 12 genes *MiPME* seleccionados para análisis de expresión génica.

De los 12 genes *MiPME* que se analizaron, la región promotora de 5 *MiPMEs* tiene al menos un elemento en *cis* de respuesta a ABA. Qi y colaboradores (2021) reportan que el tratamiento con ABA exógeno en manzanas, comparadas con el control, promueve la biosíntesis de ABA endógeno, disminuye la firmeza y aumenta la actividad PME. Es común encontrar en distintas fuentes que la madurez de los frutos climatéricos es principalmente inducida por altos niveles de etileno y la madurez de los frutos no climatéricos es debido al aumento de ABA durante el desarrollo del fruto y aunque lo anterior es correcto, no se debe disminuir la importancia de ABA durante la maduración de mango. En un trabajo realizado por Wu y colaboradores (2022) en mango cultivar Keitt observaron que durante el desarrollo del fruto hay la producción de etileno, mientras que la acumulación de ABA ocurrió principalmente en las etapas de maduración. Sin embargo, no se conoce el efecto específico de ABA en la maduración de mango Ataulfo, por lo que se puede

sugerir que la presencia de dichos elementos en *cis* en respuesta a ABA promueve la actividad PME.

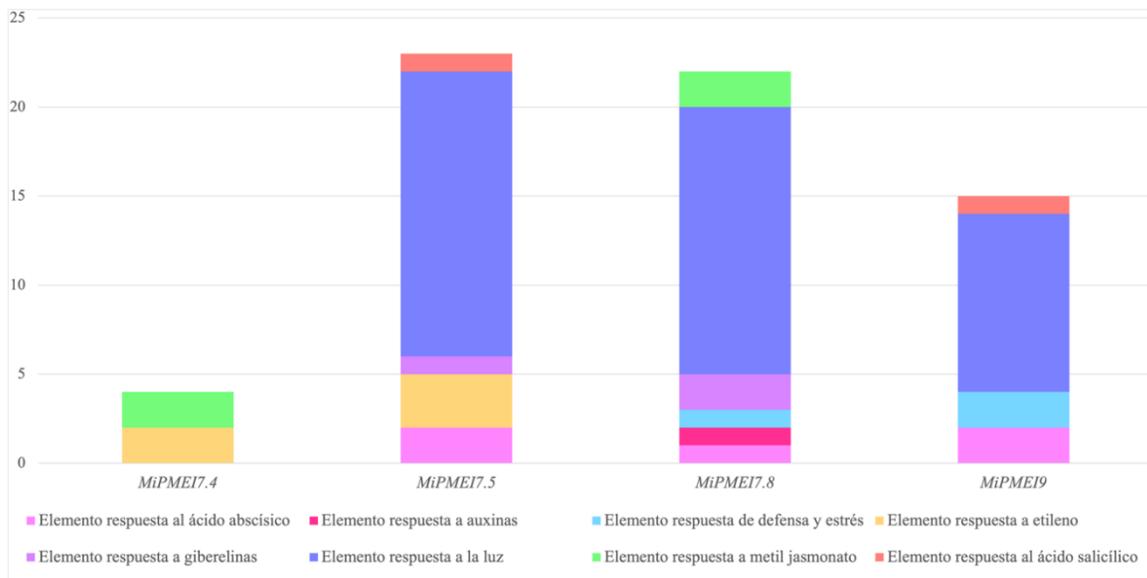
Por otro lado, de los 12 genes MiPME, la región promotora de 4 *MiPMEs* tiene al menos un elemento en *cis* de respuesta a etileno. El etileno regula varios efectos de la maduración en frutos climatéricos mediante la regulación de genes involucrados en distintos procesos, como la degradación de clorofila, la conversión de almidones a azúcar y la regulación de enzimas hidrolíticas que modifican la pared celular. Cantidades traza de etileno de 0.01 ppm en mangos postcosecha, puede activar enzimas relacionadas a la degradación de pectinas para promover la maduración (Liu *et al.*, 2023).

De las regiones promotoras analizadas, 3 *MiPMEs* tienen al menos un elemento en *cis* de respuesta a AS. En mango se utiliza el tratamiento con AS cuando se tienen problemas en la postcosecha, como la antracnosis. Al AS se le atribuye actividad antimicrobiana y además para mantener o evitar la pérdida de la firmeza del mango (He *et al.*, 2017). Por otro lado, en albaricoque se observó que el tratamiento con AS suprime el aumento de la actividad PaPME, observada en los frutos control. La reducción de la expresión de *PaPMEI* resultó en la disminución de la actividad de enzimas que degradan la pared celular, lo cual retrasa la solubilización de pectinas y mantiene la firmeza del fruto (Li *et al.*, 2022). Con la evidencia actual podemos inferir que al menos una de las funciones de los elementos en *cis* en respuesta a AS en PMEs es para suprimir la actividad enzimática y disminuir la degradación de la pared celular.

### **6.5.2. Análisis de Elementos en *cis* de las Regiones Promotoras de *MiPMEI***

El análisis de elementos en *cis* de las regiones promotoras de *MiPMEI* sugiere que, al igual que *MiPME*, responden a hormonas y estrés, como los elementos de respuesta a ABA, AS, IAA, etileno, GA y MeJA, elementos respuesta a luz y elementos respuesta a defensa y estrés como sequía y temperaturas bajas. El elemento en respuesta a la luz es el más abundante en la región promotora de *MiPMEI7.5*, *MiPMEI7.8* y *MiPMEI9* (Figura 14). Este resultado concuerda con el

reportado por Ren y colaboradores (2019) en *S. bicolor*, donde encontraron que 41 de las 55 regiones promotoras de los *SBPMEIs* contienen al menos un elemento en respuesta a la luz. Sin embargo, mencionan que la relación entre la expresión de *PMEI* y la luz no es clara y hasta el momento la información al respecto es escasa.



**Figura 13.** Elementos en *cis* de las regiones promotoras *MiPMEI*. Análisis de 1.5 Kb corriente arriba del ATG de 4 genes *MiPMEI* seleccionados para análisis de expresión génica.

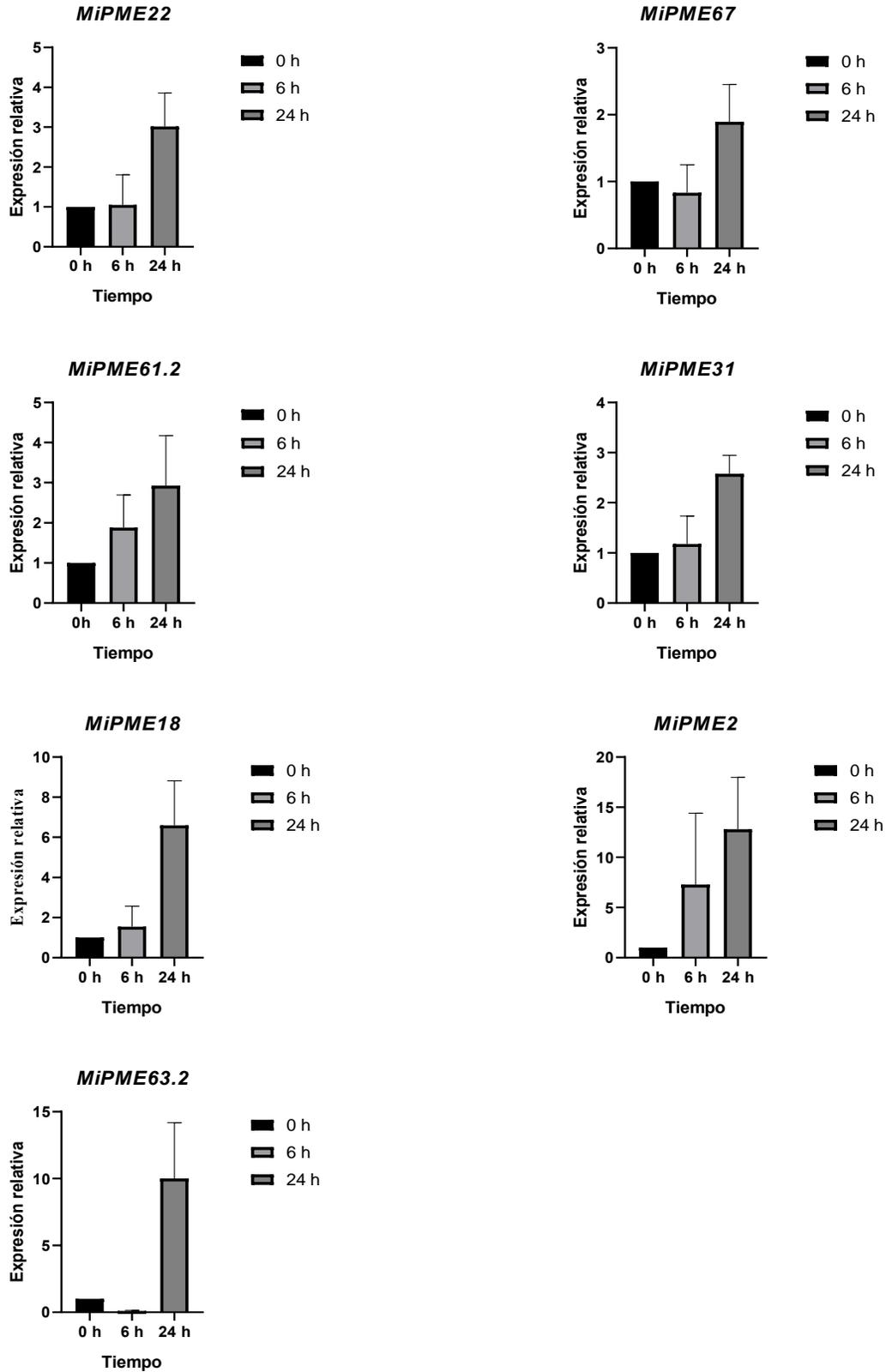
Los cuatro genes *MiPMEI* cuentan con al menos un elemento en respuesta a AS, MeJA o ABA. Los elementos en respuesta a ABA en *PMEI* se suelen relacionar con los mecanismos de respuesta a sequía y estrés salino (Dramadri *et al.*, 2021; J. Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, en durazno se ha resaltado el rol fisiológico de ABA y el impacto que tiene en genes relacionados a pectinas como PG y *PMEI* en la degradación de la pared celular durante la maduración postcosecha de este fruto. Además, observaron que la aplicación de ABA aumentó drásticamente la expresión relativa de PG y *PMEI*, lo cual apoya la idea de que estos genes inhibidores son estimulados por ABA (Soto *et al.*, 2013). Debido a la presencia de estos elementos en *cis* en las regiones promotoras de *MiPMEI* sugiere que estos genes son inducidos por ABA para el proceso de maduración y, además, la respuesta a estrés abiótico y biótico.

#### 6.6. Expresión Génica Relativa de *MiPME* y *MiPMEI* en Frutos de Mango Ataulfo Postcosecha

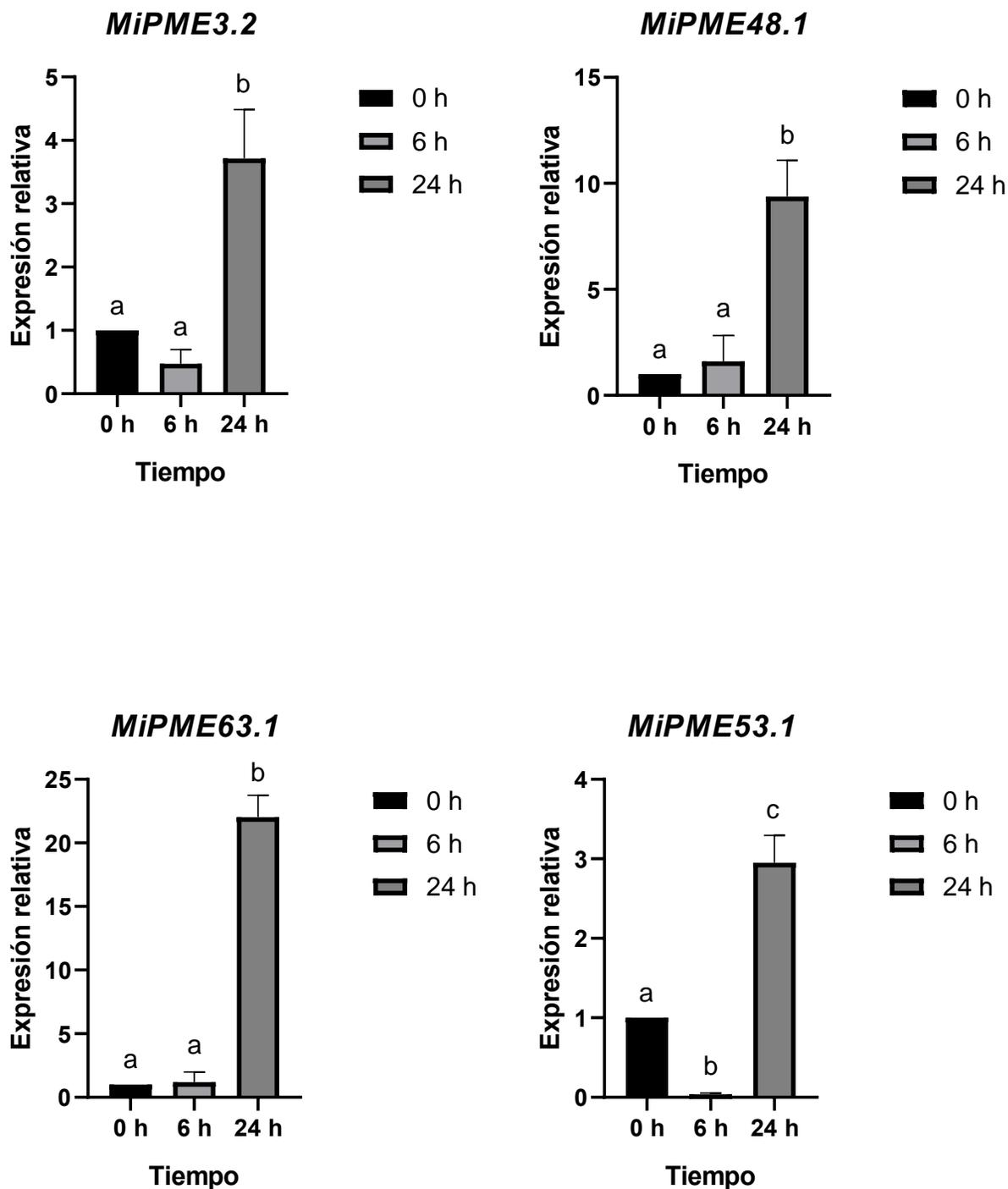
La expresión génica relativa se evaluó en mesocarpio de mango a las 0, 6 y 24 horas postcosecha. De los 45 genes MiPME se evaluaron 12 *MiPME*, de los cuales *MiPME32* no se expresó en mesocarpio en los tres tiempos evaluados. Es interesante obtener este resultado debido a que, en base al análisis filogenético, *MiPME32* se encuentra cercano a *MiPME22* (Figura 10) del cual se observó expresión relativa en los tres tiempos evaluados (Figura 15). Se esperaba expresión de ambos debido a que son ortólogos de *Solyc07g071600*, un gen importante para la maduración de tomate que es regulado por etileno. En mango ‘Kent’ la síntesis de etileno incrementa a partir de las 24 horas postcosecha, además, estudios anteriores señalan que la actividad de las enzimas que modifican la pared celular es regulada e inducida por etileno, especialmente PGs y PMEs (Dautt-Castro *et al.*, 2019; Li, He, *et al.*, 2022; Wen *et al.*, 2020). Que *MiPME32* no se exprese durante las 24 horas postcosecha se puede deber a que se estimula después de las 24 horas o participa en otro proceso fisiológico de la planta o en otro tejido, como hojas o raíces.

Por otro lado, la expresión de *MiPME3.2*, *MiPME63.1* y *MiPME48.1* se estimula a las 24 horas y en el caso de *MiPME53.1* se observó que su expresión relativa disminuye a las 6 horas y a las 24 horas se estimula (Figura 16). *MiPME53.1* y *MiPME63.1* son 2 de los genes que cuentan con elementos en *cis* en respuesta a etileno (Figura 13). Tomando en cuenta dichos elementos en *cis* y que la síntesis de etileno en mango ‘Kent’ se estimula a las 24 horas postcosecha, podemos inferir que la expresión de los genes *MiPME53.1* y *MiPME63.1* se estimula en respuesta a etileno endógeno. En tomate se observaron resultados similares, donde reportan cinco genes *PME* cuya expresión fue regulada por etileno (*Solyc03g123630*, *Solyc03g083360*, *Solyc07g071600*, *Solyc07g064190* y *Solyc12g098340*) por lo cual sugieren que las PMEs codificadas en esos genes participan en el proceso de maduración del tomate (Wen *et al.*, 2020). En frutos no climatéricos, como naranja Navel se observó que la expresión de los genes *CsPME3*, *CsPME4*, *CsPME20*, *CsPME21* y *CsPME53* aumentaba durante la etapa de expansión tardía de la fruta y disminuía después de la etapa de maduración, señalando que estos genes podrían impactar en la expansión de la fruta y el proceso de maduración (Wu *et al.*, 2022). Estos trabajos destacan la participación de genes específicos para la maduración, debido a que es una amplia familia cuyas isoformas pueden estar involucradas en distintos procesos fisiológicos.

Los genes PME específicos de la maduración pueden ser blanco de estudios funcionales, como lo hicieron Xue y colaboradores (2020) en fresa. En dicho trabajo identificaron 54 *FvPMEs* y mediante análisis de expresión seleccionaron a *FvPME38* y *FvPME39* para sobre expresarlas y entender su impacto en la maduración de la fresa. Concluyeron que estos genes influyen significativamente la firmeza del fruto, el contenido de pectinas y la estructura de la pared celular; además, resaltan la necesidad de PME para el ablandamiento de la fresa. En base a los resultados obtenidos y los estudios anteriormente expuestos, podemos inferir que los genes *MiPME3.2*, *MiPME63.1*, *MiPME53.1* y *MiPME48.1* y sus productos proteicos son necesarios para la maduración del mango debido a que se expresan desde las 0 horas y se estimulan a las 24 horas postcosecha.



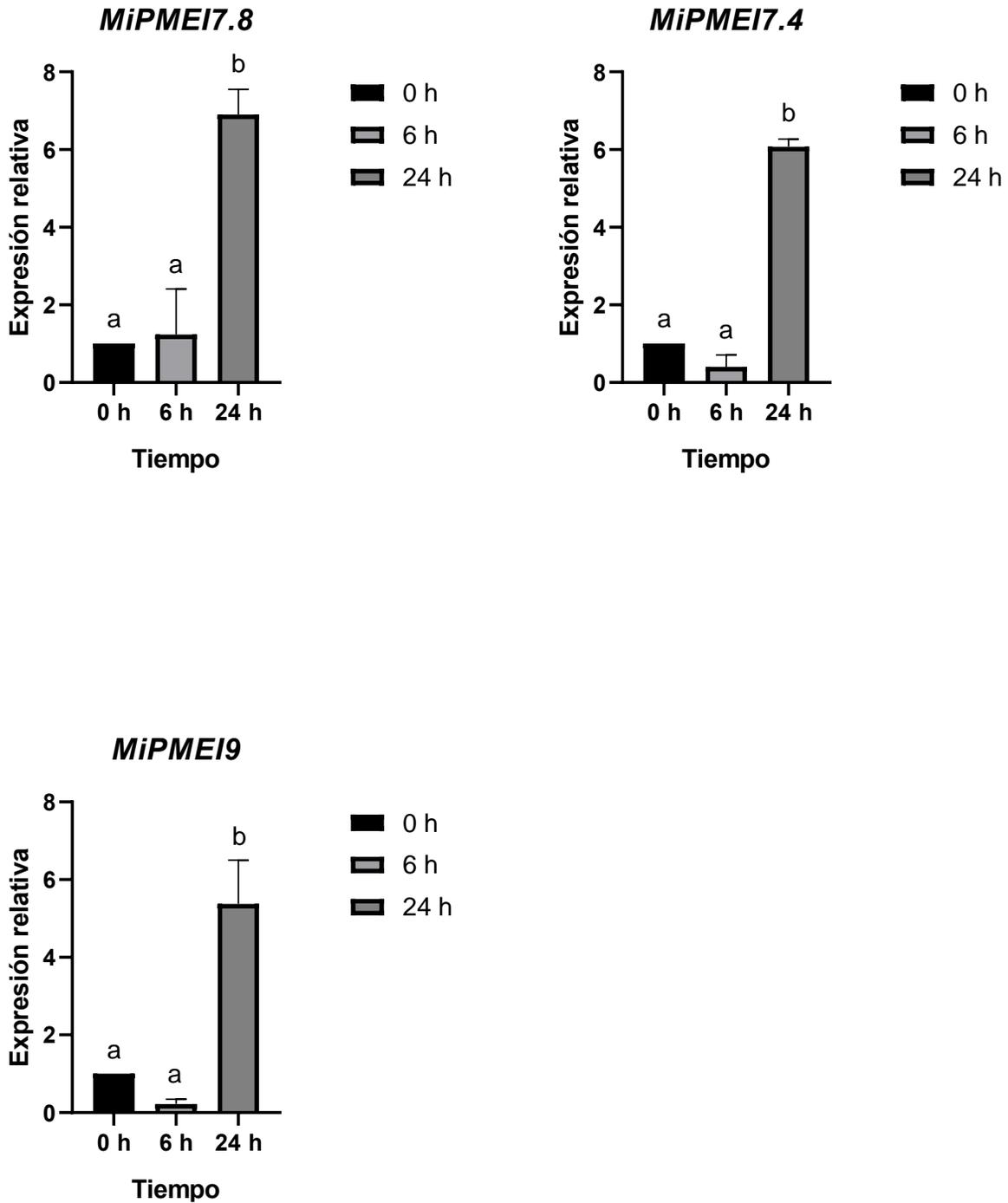
**Figura 14.** Expresión génica relativa de 7 *MiPMEs* a 0, 6 y 24 horas postcosecha. Los datos son las medias  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos evaluados.



**Figura 15.** Expresión génica relativa de 4 *MiPMEs* a 0, 6 y 24 horas postcosecha. Los datos son las medias  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ). Literales diferentes indican diferencias significativas entre las 0, 6 y 24 horas.

En el análisis de la expresión génica de *MiPMEI* se observó que 3 de los 4 genes *MiPMEI* se expresaron en los tres tiempos evaluados y es interesante que su expresión se induce a las 24 horas

(Figura 17). En un estudio por Li y colaboradores (2022) en naranja Navel identificaron 18 *CsPMEI* que se expresaron en distintas etapas de maduración del fruto. *CsPMEI15*, *CsPMEI19* y *CsPMEI32* se expresaron en las 5 etapas del desarrollo y maduración evaluadas, por lo cual señalan la importancia de estos inhibidores para mantener niveles altos de metilesterificación en las pectinas y así prevenir la degradación por PME específicas. El inhibidor está involucrado en el proceso de maduración al formar un complejo inactivo usualmente con la isoforma PME más prevalente e inhibe la degradación de las pectinas. Por ejemplo, en tomate, *SolyPMEI* crea un complejo específicamente con la isoforma PME-1 (Li *et al.*, 2022; Reza *et al.*, 2012). Por el momento no se encuentra información acerca de la creación de complejos enzima-inhibidor específicos en mango cv. Ataulfo; sin embargo, con la información presente podemos suponer que las isoformas MiPMEI están presentes en el inicio de la maduración postcosecha para crear complejos inactivos con isoformas como MiPME63.1, MiPME48.1, MiPME53.1 y MiPME3.2 cuya expresión se induce a las 24 horas, y así mantener cierto nivel de metilesterificación y de esa manera evitar la degradación temprana de las pectinas.



**Figura 16** Expresión génica relativa de 3 *MiPMEIs* a 0, 6 y 24 horas postcosecha. Los datos son las medias  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ). Literales diferentes indican diferencias significativas entre las 0, 6 y 24 horas.

## 7. CONCLUSIONES

El genoma del mango contiene 45 genes *MiPME* y 11 *MiPMEI*. Mediante análisis filogenéticos y de motivos conservados se dividió a la familia de *MiPME* en tres clados; mientras que la subclasificación de *MiPMEI* es ambigua debido a que no tienen una característica con la cual diferenciarse. Mediante el análisis de expresión génica pudimos identificar cuatro *MiPME* y tres *MiPMEI* que se expresan diferencialmente a las 24 horas postcosecha, lo que sugiere están asociados a la degradación de la pared celular durante el inicio de la maduración postcosecha del mango cv. Ataulfo (*M. indica* L.). La información generada en esta tesis aporta al conocimiento acerca de las familias de genes de PME y PMEI y da pie a futuros análisis funcionales de estas familias de genes en mango ‘Ataulfo’.

## 8. REFERENCIAS

- Aghajanzadeh, S., & Ziaifar, A. (2018). A review of pectin methylesterase inactivation in citrus juice during pasteurization. *Trends in Food Science & Technology*, *71*, 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.013>
- Bally, I., Bombarely, A., Chambers, A., Cohen, Y., Dillon, N., Innes, D., Islas-Osuna, M., Kuhn, D., Mueller, L., Ophir, R., Rambani, A., Sherman, A., & Yan, H. (2021). The ‘Tommy Atkins’ mango genome reveals candidate genes for fruit quality. *BMC Plant Biology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02858-1>
- Bazaraa, W., Ammar, A., & Aqlan, A. (2020). Effects of kiwi’s pectin methylesterase inhibitor, nanomilling and pasteurization on orange juice quality. *Food Science and Nutrition*, *8*(12), 6367–6379. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1886>
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H., Frank, M., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Molecular Plant*, *13*(8), 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>
- Cocolo, D., & Lionetti, V. (2022). The Plant Invertase/Pectin Methylesterase Inhibitor Superfamily. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.863892>
- Crow, K., & Wagner, G. (2006). What Is the Role of Genome Duplication in the Evolution of Complexity and Diversity? *Molecular Biology and Evolution*, *23*(5), 887–892. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj083>
- Dautt-Castro, M., López-Virgen, A., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C., Sortillón-Sortillón, A., Martínez-Téllez, M., González-Aguilar, G., Casas-Flores, S., Sañudo-Barajas, A., Kuhn, D., & Islas-Osuna, M. (2019). Genome-Wide Identification of Mango (*Mangifera indica* L.) Polygalacturonases: Expression Analysis of Family Members and Total Enzyme Activity During Fruit Ripening. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00969>
- Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Pacheco-Sanchez, M. A., Casas-Flores, S., Sanchez-Flores, A., Kuhn, D. N., & Islas-Osuna, M. A. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp de novo transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science*, *6*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00062>
- Del Corpo, D., Fullone, M., Miele, R., Lafond, M., Pontiggia, D., Grisel, S., Kieffer-Jaquinod, S., Giardina, T., Bellincampi, D., & Lionetti, V. (2020). AtPME17 is a functional Arabidopsis thaliana pectin methylesterase regulated by its PRO region that triggers PME activity in the resistance to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, *21*(12), 1620–1633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.13002>
- Dramadri, I., Nkalubo, S., Kramer, D., & Kelly, J. (2021). Genome-wide association analysis of drought adaptive traits in common bean. *Crop Science*, *61*(5), 3232–3253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/csc2.20484>

- Fetterman, C., Rannala, B., & Walter, M. (2008). Identification and analysis of evolutionary selection pressures acting at the molecular level in five forkhead subfamilies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 261. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-261>
- He, J., Ren, Y., Chen, C., Liu, J., Liu, H., & Pei, Y. (2017). Defense Responses of Salicylic Acid in Mango Fruit Against Postharvest Anthracnose, Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and its Possible Mechanism. *Journal of Food Safety*, 37(1), e12294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfs.12294>
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296–1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>
- Husna, N., Putri, A., & Martha, D. (2021). Genome-wide Identification and Characterization of the Pectin Methylesterase (PME) and Pectin Methylesterase Inhibitor (PMEI) Gene Family in the Banana A-genome (*Musa acuminata*) and B-genome (*Musa balbisiana*). En *Research Journal of Biotechnology* (Vol. 16, Número 2). <https://www.researchgate.net/publication/349117663>
- Jeong, H. Y., Nguyen, H. P., Eom, S. H., & Lee, C. (2018). Integrative analysis of pectin methylesterase (PME) and PME inhibitors in tomato (*Solanum lycopersicum*): Identification, tissue-specific expression, and biochemical characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.006>
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jörnvall, H., Markovič, O., & Eklund, H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters*, 514(2–3), 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02372-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02372-4)
- Khaliq, G., Nisa, M., Ramzan, M., & Koondhar, N. (2017). Textural Properties and Enzyme Activity of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit Coated with Chitosan during Storage. *Journal of Agricultural Studies*, 5(2), 32. <https://doi.org/10.5296/jas.v5i2.10946>
- Kim, Y. J., Jeong, H. Y., Kang, S. Y., Silva, J., Kim, E. J., Park, S. K., Jung, K. H., & Lee, C. (2020). Physiological importance of pectin modifying genes during rice pollen development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21144840>
- Lagaert, S., Beliën, T., & Volckaert, G. (2009). Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(9), 1064–1073. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.05.008>
- Leister, D. (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends in genetics*, 20(3), 116–122.
- Li, W., Shang, H., Ge, Q., Zou, C., Cai, J., Wang, D., Fan, S., Zhang, Z., Deng, X., Tan, Y., Song, W., Li, P., Koffi, P., Jamshed, M., Lu, Q., Gong, W., Li, J., Shi, Y., Chen, T., ... Yuan, Y. (2016). Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of pectin methylesterases reveal their major role in cotton fiber development. *BMC Genomics*, 17(1), 1000. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3365-z>
- Li, Y., He, H., & He, L. F. (2021). Genome-Wide Analysis of the Pectin Methylesterase Gene Family in Potato. *Potato Research*, 64(1). <https://doi.org/10.1007/s11540-020-09453-1>

- Li, Y., He, H., Hou, Y., Kelimu, A., Wu, F., Zhao, Y., Shi, L., & Zhu, X. (2022). Salicylic acid treatment delays apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit softening by inhibiting ethylene biosynthesis and cell wall degradation. *Scientia Horticulturae*, *300*, 111061. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111061>
- Li, Z., Wang, C., Long, D., Jiang, Y., He, L., Wang, Z., Ma, X., Bai, F., Liu, J., Wu, L., & Song, F. (2022). Genome-wide identification, bioinformatics characterization and functional analysis of pectin methylesterase inhibitors related to low temperature-induced juice sac granulation in navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Scientia Horticulturae*, *298*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110983>
- Li, Z., Wu, L., Wang, C., Wang, Y., He, L., Wang, Z., Ma, X., Bai, F., Feng, G., Liu, J., Jiang, Y., & Song, F. (2022). Characterization of pectin methylesterase gene family and its possible role in juice sac granulation in navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *BMC Genomics*, *23*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08411-0>
- Lionetti, V., Fabri, E., De Caroli, M., Hansen, A., Willats, W., Piro, G., & Bellincampi, D. (2017). Three pectin methylesterase inhibitors protect cell wall integrity for arabidopsis immunity to Botrytis. *Plant Physiology*, *173*(3), 1844–1863. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01185>
- Liu, B., Xin, Q., Zhang, M., Chen, J., Lu, Q., Zhou, X., Li, X., Zhang, W., Feng, W., Pei, H., & Sun, J. (2023). Research Progress on Mango Post-Harvest Ripening Physiology and the Regulatory Technologies. *Foods*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/foods12010173>
- Liu, G. S., Li, H. L., Grierson, D., & Fu, D. Q. (2022). NAC Transcription Factor Family Regulation of Fruit Ripening and Quality: A Review. En *Cells* (Vol. 11, Número 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11030525>
- Liu, T., Yu, H., Xiong, X., Yu, Y., Yue, X., Liu, J., & Cao, J. (2018). Genome-wide identification and characterization of pectin methylesterase inhibitor genes in brassica oleracea. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113338>
- López-Gómez, R., & Gómez-Lim, M. A. (2019). A Method for Extracting Intact RNA from Fruits Rich in Polysaccharides using Ripe Mango Mesocarp. *HortScience*, *27*(5), 440–442. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.5.440>
- Louvet, R., Cavel, E., Gutierrez, L., Guénin, S., Roger, D., Gillet, F., Guerineau, F., & Pelloux, J. (2006). Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, *224*(4), 782–791. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0261-9>
- Manmohit, K., & Pooja, K. (2015). Pectin Methylesterases: A Review. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, *05*(05). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000227>
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A., & Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, *41*(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>
- Mercadante, D. (2019). Advancements in the Understanding of Pectin Methylesterase Enzymes and Their Inhibitors for Use in Food Science Applications. . *Encyclopedia of Food Chemistry*, *3*, 202–208.
- Minh, B., Schmidt, H., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M., Von Haeseler, A., Lanfear,

- R., & Teeling, E. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., & Shiu, S.-H. (2016). Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant Physiology*, *171*(4), 2294–2316. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00523>
- Pérez-Almeida Iris, & Carpita Nicholas. (2006). *LAS  $\beta$ -GALACTOSIDASAS Y LA DINÁMICA DE LA PARED CELULAR*.
- Pinzón-Latorre, D., & Deyholos, M. (2013). Characterization and transcript profiling of the pectin methylesterase (PME) and pectin methylesterase inhibitor (PMEI) gene families in flax (*Linum usitatissimum*). *BMC Genomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-742>
- Qi Y., Liu X., Ding Y., Jiang Y., Zhang Y., Liu J., Jiang Z., & Ren X. (2021). Effect of Abscisic Acid Treatment on Apple Fruit Ripening and Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis and Ethylene Signal Transduction. *FOOD SCIENCE*, *42*, 225–232.
- Qiu, D., Xu, S., Wang, Y., Zhou, M., & Hong, L. (2021). Primary Cell Wall Modifying Proteins Regulate Wall Mechanics to Steer Plant Morphogenesis. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.751372>
- Reca, I., Lionetti, V., Camardella, L., D'Avino, R., Giardina, T., Cervone, F., & Bellincampi, D. (2012). A functional pectin methylesterase inhibitor protein (SolyPMEI) is expressed during tomato fruit ripening and interacts with PME-1. *Plant Molecular Biology*, *79*(4), 429–442. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9921-2>
- Ren, A., Imtiaz Ahmed, R., Chen, H., Han, L., Sun, J., Ding, A., Guo, Y., & Kong, Y. (2019). Genome-wide identification, characterization and expression patterns of the pectin methylesterase inhibitor genes in sorghum bicolor. *Genes*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/genes10100755>
- Schmittgen, T., & Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sénéchal, F., Habrylo, O., Hocq, L., Domon, J., Marcelo, P., Lefebvre, V., Pelloux, J., & Mercadante, D. (2017). Structural and dynamical characterization of the pH-dependence of the pectin methylesterase-pectin methylesterase inhibitor complex. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(52), 21538–21547. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000197>
- Soto, A., Ruiz, K., Ravaglia, D., Costa, G., & Torrigiani, P. (2013). ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, *64*, 11–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.12.011>
- Sun, J., Tian, Z., Li, X., Li, S., Li, Z., Wang, J., Hu, Z., Chen, H., Guo, C., Xie, M., & Xu, R. (2022). Systematic analysis of the pectin methylesterase gene family in *Nicotiana tabacum* and reveal their multiple roles in plant development and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.998841>
- Uluşık, S., & Seymour, G. (2020). Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. *Food Chemistry*, *309*, 125559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125559>

- Wang, J., Ling, L., Cai, H., & Guo, C. (2020). Gene-wide identification and expression analysis of the PMEI family genes in soybean (*Glycine max*). *3 Biotech*, *10*(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02328-9>
- Wang, L., Gao, Y., Wang, S., Zhang, Q., & Yang, S. (2021). Genome-wide identification of PME genes, evolution and expression analyses in soybean (*Glycine max* L.). *BMC Plant Biology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03355-1>
- Wen, B., Zhang, F., Wu, X., & Li, H. (2020). Characterization of the Tomato (*Solanum lycopersicum*) Pectin Methylesterases: Evolution, Activity of Isoforms and Expression During Fruit Ripening. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00238>
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant*, *2*(5), 851–860. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>
- Wormit, A., & Usadel, B. (2018). The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Número 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19102878>
- Wu, S., Wu, D., Song, J., Zhang, Y., Tan, Q., Yang, T., Yang, J., Wang, S., Xu, J., Xu, W., & Liu, A. (2022). Metabolomic and transcriptomic analyses reveal new insights into the role of abscisic acid in modulating mango fruit ripening. *Horticulture Research*, *9*, uhac102. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac102>
- Xue, C., Guan, S. C., Chen, J. Q., Wen, C. J., Cai, J. F., & Chen, X. (2020). Genome wide identification and functional characterization of strawberry pectin methylesterases related to fruit softening. *BMC Plant Biology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2225-9>
- Yahia, E., Carrillo-López, A., & Bello-Perez, L. (2019). Chapter 9 - Carbohydrates. En E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 175–205). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00009-9>
- Zhang, P., Wang, H., Qin, X., Chen, K., Zhao, J., Zhao, Y., & Yue, B. (2019). Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the PME and PMEI gene families in maize. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56254-9>.
- Zhu, Y., Zeng, W., Wang, X., Pan, L., Niu, L., Lu, Z., Cui, G., & Wang, Z. (2017). Characterization and transcript profiling of PME and PMEI gene families during peach fruit maturation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *142*(4), 246–259. <https://doi.org/10.21273/JASHS04039-17>