



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

**EXPRESIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS Y RECICLAJE
DEL ÁCIDO L-ASCÓRBICO EN MANGO (*Mangifera indica*
L.) SOMETIDO A TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO
CUARENTENARIO**

Por:

Ana Paulina Sortillón Sortillón

TESIS APROBADA POR LA

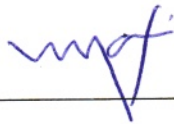
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ana Paulina Sortillón Sortillón, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna

Directora de Tesis




Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara

Asesora



M. en C. Armida Rodríguez Félix

Asesora



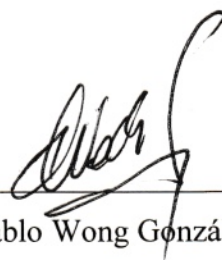
Dra. Karen Lilian Ochoa Lara

Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis 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 del autor, 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 del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada durante el posgrado y por el proyecto CB2012-01-178296 “Estudios moleculares de la maduración del mango Ataulfo (*M. indica* L.): uso de la transcriptómica para identificar genes responsables de la pérdida de la firmeza” (otorgado a la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna) que financió mi trabajo de investigación para obtener mi grado de Maestro en Ciencias.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por permitirme ser parte de su comunidad y llevar a cabo mis estudios de posgrado. A los miembros de la CTAOV por ser parte de mi formación.

Agradezco a mis padres, Martin René y Patricia Eugenia por estar siempre conmigo apoyándome durante este proceso formativo.

Agradezco a la Dra. María A. Islas Osuna por permitirme ser parte de su laboratorio y trabajar junto con ella como equipo. Por realizar el muestreo de los mangos y el tratamiento hidrotérmico cuarentenario.

Agradezco a la Dra. Carmen A. Contreras Vergara por su paciencia, enseñanza y su gran apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas.

Agradezco a la M.C. Armida Rodríguez Félix por su enorme contribución, interés, dedicación y apoyo en este trabajo, todo el apoyo puesto en este no será en vano.

Agradezco a la Dra. Karen L. Ochoa Lara por su disponibilidad y entusiasmo por educarme y sacar adelante ese trabajo con gran motivación.

Agradezco a la Dra. Mitzuko Dautt-Castro por el apoyo en el análisis de expresión de genes.

Agradezco al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, y a mis compañeros M.C. Nacxit Delgado Torres, B. Andrés López Virgen y B. Martin Andrade Coronado por su invaluable compañía en este camino.

Agradezco a la unidad Culiacán del CIAD, a los Dres. Tomás Osuna Enciso y Adriana Sañudo Barajas, al Maestro Manuel Báez Sañudo por facilitarnos el muestreo y análisis inicial de los mangos. También a la I.B. Rosalba Contreras Martínez y Q.F.B. Célida Isabel Martínez Rodríguez por su apoyo técnico durante el tratamiento hidrotérmico, muestreo y análisis físicos de los mangos, por las fotografías. A la M.C. Rosabel Velez de la Rocha, al M.C. Daniel Lira Morales y Dra. Mercedes Verdugo Perales por el apoyo técnico durante en el muestreo de los frutos de mango.

Agradezco al laboratorio de Análisis Instrumental, al Dr. Humberto Astiazarán y al M.C. Orlando Tortoledo por su apoyo técnico en la determinación del contenido de ácido L-ascórbico.

Agradezco al M.C. Emmanuel Aispuro Hernández por al apoyo técnico durante mis estudios; al Dr. Miguel Ángel Martínez y a los miembros del laboratorio de Fisiología Vegetal por su apoyo y disponibilidad.

Agradezco de igual manera al M.C. Angel Javier Ojeda Contreras y los miembros del laboratorio del Dr. Martin Tiznado (Biología Molecular de Plantas) por su amistad y apoyo durante el posgrado.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Martín René Sortillón Valenzuela y Patricia Eugenia Sortillón González. De igual manera, le dedico este trabajo a mi manina Balvaneda por haberme acompañado, educado y apoyado durante toda la vida. Sin su apoyo y dedicación, llegar a este punto nunca hubiera sido posible.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	11
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1 El Fruto del Mango como Fuente de ácido L-ascórbico y su Función	17
2.1.1 Características Nutricionales del Mango cv. Ataulfo	17
2.1.2. Funciones del ácido L-Ascórbico	18
2.2 Biosíntesis y Reciclaje del Ácido L-Ascórbico	19
2.2.1 Las Distintas Rutas Biosintéticas del Ácido L-Ascórbico	19
2.2.2 Regulación de la Ruta Biosintética de la D-Manosa/L-Galactosa	21
2.2.3 El Sistema Antioxidante y de Reciclaje de Ácido L-Ascórbico:	
Tolerancia ante el Estrés por Calor	22
2.3 La Acción del Tratamiento Hidrotérmico en el Contenido de Ácido	
L-Ascórbico en Frutos	24
2.3.1 El Tratamiento Hidrotérmico como Medida Cuarentenaria en Mango	24
2.3.2 Respuestas Fisiológicas de los Frutos ante el Estrés debido el	
Tratamiento Hidrotérmico	25
2.3.3 Efectos en la Expresión Génica debido a la Aplicación de Calor	
a los Frutos	26
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo General	29
4.2 Objetivos Específicos	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Muestreo de los Frutos de Mango cv. Ataulfo	30
5.2 Análisis de los Parámetros Físicos	30
5.3 Identificación y Análisis de Secuencias Nucleotídicas y	
Aminoácidas de <i>MiGME</i> , <i>MiGGP1</i> , <i>MiGGP2</i> y <i>MiMDHAR</i>	31
5.4 Extracción de RNA total	33

CONTENIDO (Continuación)

5.5 Purificación del ARN y síntesis de cDNA	33
5.6 Evaluación de la Expresión de los Genes	34
5.7 Determinación del Contenido de Ácido L-Ascórbico	35
5.8 Análisis Estadístico	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1 Parámetros Físicos de Madurez en mango cv. Ataulfo	36
6.1.1 Firmeza del mango cv. Ataulfo	36
6.1.2 Color externo del mango cv. Ataulfo	37
6.1.3 Color interno del mango cv. Ataulfo	41
6.1.4 Contenido de Ácido L-Ascórbico del mango cv. Ataulfo	45
6.2 Análisis de Genes de Biosíntesis y Reciclaje de Ácido L-Ascórbico	48
6.2.1 Análisis de las Secuencias Aminoacídicas de los Genes <i>MiGME</i> , <i>MiGGP1</i> , <i>MiGGP2</i> y <i>MiMDHAR</i> citosólica	48
6.3 Análisis de expresión de genes de <i>MiGME</i> , <i>MiGGP1</i> , <i>MiGGP2</i> y <i>MiMDHAR</i>	56
6.3.1 Análisis del ARN Total de la Pulpa de Mango cv. Ataulfo	56
6.3.2 Expresión Relativa de Genes de Biosíntesis de Ácido L-Ascórbico: <i>MiGME</i> , <i>MiGGP1</i> y <i>MiGGP2</i> de Mango cv. Ataulfo Durante el Almacenamiento a 20°C	57
6.3.3 Expresión Relativa de Genes de Reciclaje de Ácido L-Ascórbico: <i>MiMDHAR</i> de Mango cv. Ataulfo Durante el Almacenamiento a 20°C	60
6.3.4 Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario Sobre la Expresión Relativa de los Genes de Biosíntesis de Ácido L-Ascórbico: <i>MiGME</i> , <i>MiGGP1</i> y <i>MiGGP2</i> en Mango cv. Ataulfo ...	63
6.3.5 Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario sobre la Expresión Relativa del Gen de Reciclaje de Ácido L-Ascórbico: <i>MiMDHAR</i> en Mango cv. Ataulfo	66
7. CONCLUSIONES	68
8. BIBLIOGRAFÍA	69

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rutas alternas y principal de biosíntesis del ácido L-ascórbico en las plantas.....	21
2	Cambios en la firmeza (N) de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	37
3	Color externo de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	41
4	Color interno de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	42
5	Apariencia visual de los frutos de mango cv. Ataulfo	44
6	Contenido de ácido L-ascórbico (mg/100 g de peso fresco) de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	46
7	Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de GME con MiGME obtenida a partir del transcriptoma de mango cv. Ataulfo	52
8	Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de GGP1 con MiGGP1 obtenida a partir del transcriptoma de mango cv. Ataulfo	53
9	Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de GGP2 con MiGGP2 obtenida a partir del transcriptoma de mango cv. Ataulfo	54
10	Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de MDHAR con MiMDHAR obtenida a partir del transcriptoma de mango cv. Ataulfo	55
11	Análisis electroforético de muestras de ARN total extraídas de los frutos de mango cv. Ataulfo en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.....	54
12	Expresión relativa de <i>MiGME</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	58
13	Expresión relativa de <i>MiGGP1</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	59
14	Expresión relativa de <i>MiGGP2</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	60

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

15	Expresión relativa de <i>MiMDHAR</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	61
16	Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en la expresión relativa de <i>MiGME</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	63
17	Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en la expresión relativa de <i>MiGGPI</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	64
18	Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en la expresión relativa de <i>MiGGP2</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	65
19	Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en la expresión relativa de <i>MiMDHAR</i> de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C	66

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Iniciadores para amplificar fragmentos de los genes <i>MiGME</i> , <i>MiGGP1</i> , <i>MiGGP2</i> y <i>MiDHAR</i> en las raciones de qPCR	32
2	Comparación de los transcritos de genes de síntesis y reciclaje del ácido L-ascórbico de mango cv. Ataulfo con los de otras plantas.....	50

RESUMEN

El contenido del ácido L-ascórbico en los frutos depende de una variedad de factores que ocurren durante su desarrollo, maduración y manejo postcosecha. Los frutos de mango (*Mangifera indica* L.) para exportación, son sometidos al tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC). El THC consiste en sumergir los frutos en agua a temperaturas de 46.1°C por aproximadamente 60 a 120 minutos, lo que puede afectar el contenido del ácido L-ascórbico. Por ello, el objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto del THC en el contenido de ácido L-ascórbico y en los patrones de expresión de genes para su biosíntesis y reciclaje. Los mangos cv. Ataulfo se cosecharon en madurez fisiológica, se sometieron al THC, y se almacenaron a 20°C durante 9 días. Al evaluar la firmeza, el color externo y el color interno de los frutos, no hubo efecto del THC ($p \leq 0.05$); excepto en el ángulo de tono y luminosidad del color externo. El contenido de ácido L-ascórbico se mantuvo constante durante el almacenamiento, con excepción del día 1. El THC disminuyó en un 12% el contenido de ácido L-ascórbico de los frutos en comparación al grupo testigo ($p \leq 0.05$). Los transcritos que codifican para la enzima GDP-manosa 3,5 epimerasa (GME), GDP-galactosa fosforilasa 1 y 2 (GGP1 y GGP2) y la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) fueron analizados, mostrando alta similitud con genes correspondientes de otras plantas como el cacao, la naranja, el durián y el álamo. El análisis de expresión de genes reveló que *MiGME*, *MiGGP1* y *MiMDHAR* son inducidos durante el almacenamiento; mientras que *MiGGP2* se reprime a partir del día 2. El THC estimuló la expresión de los genes de biosíntesis *MiGME* y *MiGGP2* a partir del día 2; en contraste, *MiGGP1* se reprimió en los frutos de la mayoría de los días. Por otro lado, el gen de reciclaje *MiMDHAR* se vio inducido en todos los días evaluados, hasta 14 veces en el día 5. En conclusión, los genes de la biosíntesis (*MiGME* y *MiGGP2*) y reciclaje (*MiMDHAR*) fueron diferencialmente inducidos en mangos sometidos al THC. Estos resultados sugieren que ambas rutas se estimulan a nivel transcripcional en respuesta al estrés causado por el THC.

Palabras clave: tratamiento hidrotérmico, expresión génica, maduración, ácido L-ascórbico, mango, GME, GGP, MDHAR.

ABSTRACT

The content of L-ascorbic acid in fruits depends on a variety of factors that occur during their development, ripening and postharvest handling. Mango fruit (*Mangifera indica* L.) are subjected to quarantine hydrothermal treatment (HWT) after harvest for exportation. The HWT consists of immersing the fruits in water at temperatures of 118°F for approximately 60 to 120 minutes, which may affect the content of L-ascorbic acid. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effect of HWT on the content of L-ascorbic acid and the expression of genes of its biosynthesis and recycling. Mangoes cv. Ataulfo were harvested at physiological maturity stage, subjected to HWT and then stored at 20°C for 9 days. When assessing the firmness, the external and the internal color of the fruits, there was no significant difference between mangoes with HWT and controls ($p \leq 0.05$); except for Hue and luminosity in external color. The content of L-ascorbic acid was maintained during storage of mangoes. The HWT caused a 12% reduction of L-ascorbic acid in the treated fruits compared to the controls ($p \leq 0.05$). The transcripts that code for GDP-mannose 3,5 epimerase (GME), GDP-galactose phosphorylase 1 and 2 (GGP1 and GGP2) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) were analyzed, showing high identity with corresponding genes from other plants like cacao, orange, durian, and black cottonwood. The analysis of gene expression revealed that *MiGME*, *MiGGP1* and *MiMDHAR* are induced during ripening; whereas *MiGGP2* is repressed from day 2. On the other hand, the expression of *MiGME* and *MiGGP2* was stimulated by HWT from day 2; while *MiGGP1* was repressed on fruit from all days except day 2. Meanwhile, *MiMDHAR* was up-regulated by the HWT in all the days evaluated up to 14-fold in fruits of day 5. Genes of the biosynthesis (*MiGME* y *MiGGP2*) and recycling (*MiMDHAR*) pathways were differentially induced by the HWT. These results suggest that both pathways are induced at the transcriptional level in response to the stress caused by the HWT.

Keywords: hot water treatment, gene expression, ripening, L-ascorbic acid, mango, GME, GGP, MDHAR.

INTRODUCCIÓN

Los tratamientos post cosecha son aplicados a los frutos como el mango (*Mangifera indica* L.) para garantizar su calidad de exportación. El tratamiento hidrotérmico (THC) se aplica como medida cuarentenaria contra larvas de la mosca del género *Anastrepha*, las cuales infestan los frutos de mango. Sin embargo, se ha demostrado que los tratamientos post cosecha pueden afectar la maduración y características físicas del mango (Ornelas-Paz y Yahia, 2014). En conjunto con lo anteriormente mencionado, los distintos factores y la manipulación de los frutos en post cosecha, como el THC anteriormente mencionado, pueden afectar el contenido de ácido L-ascórbico (Lee y Kader, 2000), el cual, es un componente importante en el valor nutricional de este tipo de productos alimenticios.

El ácido L-ascórbico es también conocido como vitamina C, es potente antioxidante, el cual solamente se obtiene de la dieta diaria de productos ricos en esta vitamina, como los frutos y otros productos de origen vegetal. El ácido L-ascórbico, junto con enzimas antioxidantes, reduce el efecto de la acumulación de las especies reactivas del oxígeno (EROs), las cuales son generadas por distintos factores abióticos y bióticos (Venkatesh y Park, 2014). El ácido L-ascórbico cumple diferentes funciones durante el proceso de maduración de los frutos, en adición a la reducción de EROs. Este antioxidante es utilizado como donador de electrones para la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACC oxidasa), encargada de la síntesis de etileno (Davey et al., 2000). Por lo que el ácido L-ascórbico no solamente se limita a procesos antioxidantes, sino que también participa en ciertas funciones en el proceso de maduración de los frutos.

Recientemente, el trabajo de transcriptómica en mango de Dautt-Castro y colaboradores (2018) ha revelado que genes relacionados de distintas rutas metabólicas, particularmente aquellos relacionados con la maduración de los frutos, se ven afectados por el THC. A pesar de que los efectos fisiológicos y físicos de los frutos debido a los distintos tratamientos postcosecha se han estudiado a detalle, el impacto a nivel

molecular de genes relacionados a rutas metabólicas de importancia nutricional requiere de más información. Por lo que el objetivo de este trabajo es dilucidar los cambios a nivel genético de la ruta metabólica de biosíntesis y reciclaje del ácido L-ascórbico debido al THC en mango cv. Ataulfo en postcosecha.

2. ANTECEDENTES

2.1 El Fruto de Mango como Fuente de Ácido L-ascórbico y su Función

2.1.1 Características Nutricionales del Mango cv. Ataulfo

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto climatérico, perteneciente a la familia *Anacardiaceae*. El cual es originario de la región Indo-Birmánica y se desarrolla en áreas tropicales (Tharanathan et al., 2006). Los cultivares más producidos en México son el Ataulfo, Manila, Tommy Atkins, Haden y Kent (Wall-Medrano et al., 2015). Originario de Chiapas, México, el cultivar Ataulfo ha surgido por su gran aceptación en el mercado. El cultivar resalta por poseer una alta cantidad de compuestos antioxidantes, poca fibra y particularmente una larga vida de anaquel en comparación con otras variedades de mango (Yahia-Kazuz et al., 2006).

Los frutos de mango contienen una gran cantidad de compuestos bioactivos tales como los carotenoides y compuestos fenólicos, por lo que son una buena fuente de antioxidantes (Schieber et al., 2000). Entre ellos, resalta el ácido L-ascórbico, el cual, junto con el ácido dehidroascórbico, se le conoce en conjunto como vitamina C. El ácido L-ascórbico es un compuesto soluble, con una estructura molecular que le permite reducir moléculas oxidadas. El cual es reconocido por sus características antioxidantes, que previenen contra la acumulación excesiva las especies reactivas del oxígeno. El contenido promedio de vitamina C en mango (ID: 09176) es de 36.4 mg/100 g (USDA, 2016). Sin embargo, se ha reportado un contenido de ácido L-ascórbico de 125.4±6.4 y 158.5 mg/100 g de peso fresco en puré y en fruto entero de mango cv. Ataulfo, respectivamente (Manthey y Perkins-Veazie, 2009; Robles-Sánchez et al., 2009). Este contenido de ácido L-ascórbico es mayor que el reportado para mango de los cultivares

Haden, Keitt, Kent y Tommy Atkins. Por lo que actualmente en el mercado, el cultivar Ataulfo es uno de los cultivares de mango con mayor contenido de ácido L-ascórbico.

2.1.2 Funciones del Ácido L-Ascórbico

El ácido L-ascórbico tiene múltiples funciones en la fisiología de los seres vivos. Además de ser un potente agente para reducir el efecto del estrés oxidativo, tiene un rol en la señalización celular y participa como cosustrato de otras enzimas no relacionadas a los mecanismos antioxidantes (Venkatesh y Park, 2014). Algunas mono- y dioxigenasas requieren el ácido L-ascórbico para modificar proteínas a nivel postraducciona (Szarka y Lőrincz, 2014). Particularmente, las prolil-4-hidroxilasas utilizan el ácido L-ascórbico para el entrecruzamiento de las fibras de colágeno durante su biosíntesis (Myllyharju, 2008). La enfermedad del escorbuto, prevalente en especies incapaces de sintetizar el ácido L-ascórbico, se asocia a la biosíntesis deficiente de colágeno debido a la deficiencia de este antioxidante. Por otra parte, en plantas, el ácido L-ascórbico es utilizado por la ACC oxidasa y giberelina-3-dioxigenasa como cosustrato para sus respectivas hormonas, el etileno y el ácido giberélico (Davey et al., 2000). Por lo tanto, la función de este nutriente no solamente se limita a procesos antioxidantes, sino también participa en procesos en donde se requiere su actividad reductora para permitir las funciones de ciertas enzimas.

Sin embargo, la función más reconocida del ácido L-ascórbico es la capacidad de contrarrestar el efecto del estrés oxidativo en las células. Las plantas requieren de la presencia del ácido L-ascórbico para prevenir la acción excesiva de las EROs. En este grupo se encuentran las formas del oxígeno altamente reactivas, de las cuales el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales libres como el superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) son uno de los principales representantes (Mittler, 2016). Estas EROs se pueden generar durante el metabolismo normal de la planta y bajo el estrés abiótico. El exceso de EROs causa daños en varios niveles celulares: desde modificaciones a la

información genética hasta daños estructurales a las proteínas y lípidos, al cual se le conoce como estrés oxidativo (Demidchik, 2015). No obstante, las células vegetales han desarrollado distintos mecanismos antioxidantes, entre los cuales se encuentran los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los sistemas enzimáticos, se encuentra la ascorbato peroxidasa (APX), la cual tiene la función de reducir el peróxido de hidrógeno a moléculas de agua (Gill y Tuteja, 2010). Otras enzimas incluyen la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), las tiorredoxinas y las enzimas del ciclo glutatión-ascorbato.

2.2 Biosíntesis y Reciclaje del Ácido L-ascórbico

2.2.1 Las Distintas Rutas Biosintéticas del Ácido L-Ascórbico

Se ha establecido que en las plantas el ácido L-ascórbico se puede sintetizar de *novo* por cuatro rutas metabólicas, en la Figura 1 se presentan las rutas propuestas para la síntesis de este compuesto. La vía de la D-manosa/L-galactosa o también conocida como la vía de Smirnoff-Wheeler se propuso hace 19 años como la vía principal a partir de la cual se sintetiza este antioxidante en las plantas superiores como *A. thaliana* (Wheeler et al., 1998). Las tres vías biosintéticas alternas no se han estudiado a profundidad, sin embargo, se ha demostrado que aportan de manera importante en la síntesis de ácido L-ascórbico en ciertas especies vegetales como en fresa (*Fragaria x anassa*) y *A. thaliana*. Wolucka y Van Montagu (2003) propusieron una nueva ruta de biosíntesis en *A. thaliana*, conocida como la ruta de la L-gulosa. Se demostró que la enzima GDP-manosa 3,5 epimerasa, genera un intermediario distinto a partir de la epimerización de la GDP- α -D-manosa. Esta enzima es capaz de producir la GDP- β -L-galactosa y GDP- β -L-gulosa, generando dos rutas. La bifurcación hacia cualesquiera de ellas depende de una segunda epimerización y reducción del intermediario GDP- β -4-ceto-gulosa, respectivamente (Major et al., 2005).

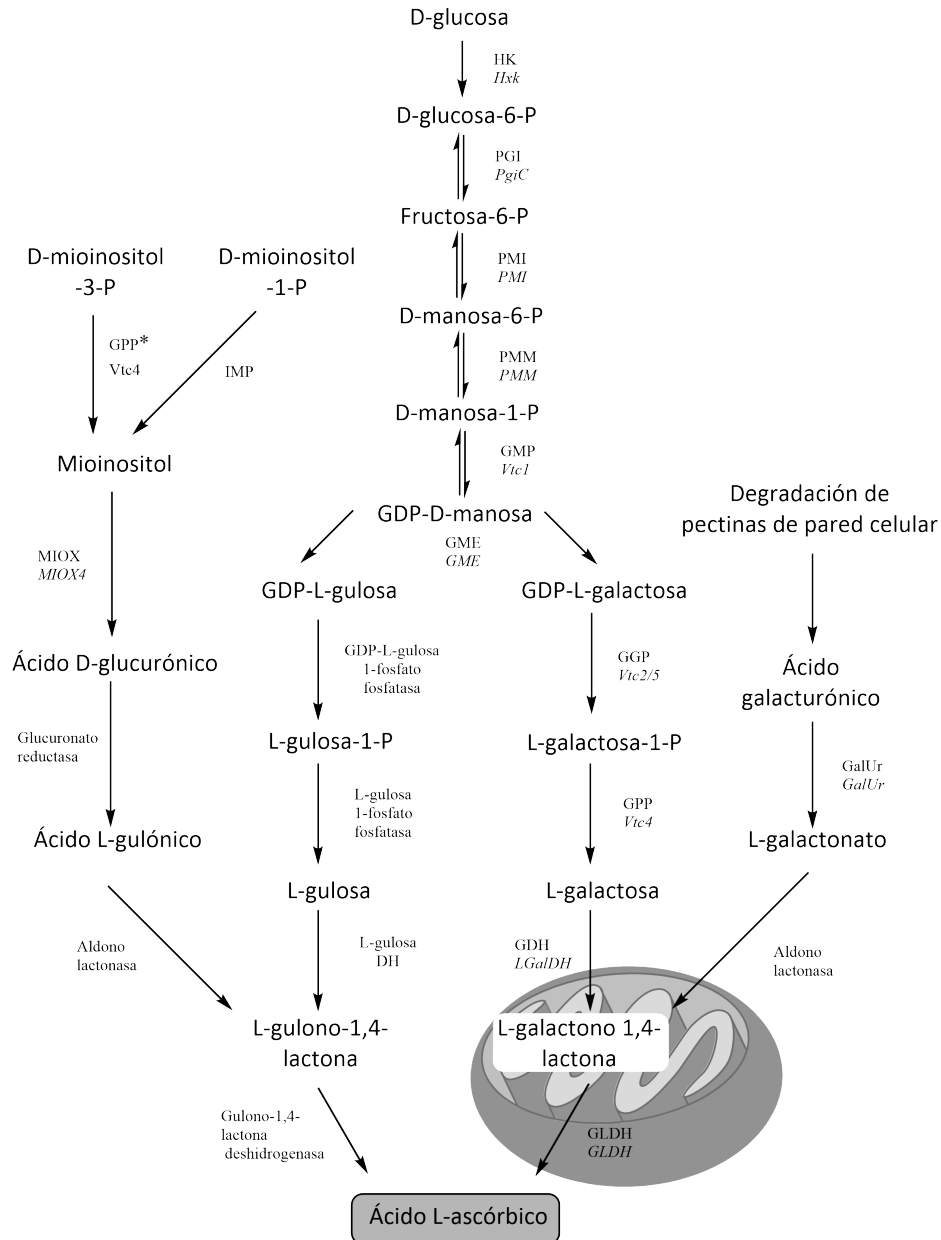


Figura 1. Rutas de biosíntesis del ácido L-ascórbico en plantas. HK: hexocinasa, PGI: fosfoglucoisomerasa, PMI: manosa-6-fosfato isomerasa, PMM: fosfomanosa mutasa, GMP: GDP-manosa-fosforilasa, GME: GDP-D-manosa 3'5'-epimerasa, GPP: GDP-L-galactosa fosforilasa, GPP: L-galactosa-1-fosfatasa, GDH: L-galactosa deshidrogenasa, GLDH: L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa, GalUr: L-galacturonato reductasa, IMP: mioinositol monofosforilasa. *Se ha sugerido que tiene funcionalidad doble (Torabinejad et al., 2009). Los nombres de los genes/mutantes se presentan en cursivas. Adaptado de Venkatesh y Park 2014.

Las últimas dos rutas son menos estudiadas, pero se ha demostrado su presencia e impacto en el contenido de ácido L-ascórbico en ciertas especies vegetales, una de ellas, la D-galacturonato o ácido D-galacturónico, que genera ácido L-ascórbico a partir del ácido D-galacturónico. Éste último es producto de la degradación de las pectinas de la pared celular vegetal. Se ha observado que la sobreexpresión de la enzima D-galacturonato reductasa (GalUR), enzima importante en esta ruta, se asoció con el incremento del contenido de ácido L-ascórbico en las plantas de *A. thaliana* (Agius et al., 2003; Cruz-Rus et al., 2011). Además, se ha observado que la transformación de tomate con *FaGalUR*, proveniente del fruto de la fresa (*Fragaria x anassa*) proporcionó tolerancia ante el estrés abiótico debido a su sobreexpresión (Cai et al., 2015). Finalmente, la vía del mio-inositol ha sido propuesta como una ruta alterna para la biosíntesis del ácido L-ascórbico en *A. thaliana*. El establecimiento de que podría ser una ruta alterna de biosíntesis se basó en la sobreexpresión del gen *MIOX4* que codifica para la enzima mioinositol oxigenasa, la cual transforma el mio-inositol a ácido-D-glucurónico (Lorence et al., 2004; Lisko et al. 2013). Por lo tanto, se sugiere que estas rutas pudieran tener una contribución distinta en ciertas especies y estados de desarrollo de las plantas.

2.2.2 Regulación de la Ruta Biosintética de la D-manosa/L-galactosa

Se ha propuesto que la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa (GGP) es un paso regulatorio esencial en la síntesis de ácido L-ascórbico. En *Arabidopsis*, se han encontrado dos genes que codifican para esta enzima: *Vtc2* y *Vtc5*, mutantes dobles de estos genes en brotes de *A. thaliana* no fueron capaces de desarrollarse, y debieron ser rescatados mediante la adición de ácido L-ascórbico y L-galactosa (Dowdle et al., 2007). En este estudio se observó que *Vtc2* se expresa más que *Vtc5*; sin embargo, a pesar de su baja contribución, *Vtc5* compensó la síntesis del ácido L-ascórbico en estadios jóvenes de mutantes *Vtc2-1* de *A. thaliana*. Además, ambos genes se han visto reguladas bajo el ciclo circadiano y por la intensidad de luz (Gao et al., 2011).

La regulación de la síntesis de ácido L-ascórbico por medio de *GGP* ha sido demostrada en varios estudios, donde esta enzima se ve regulada a nivel transcripcional y traslacional (Bulley y Laing, 2016). La actividad del promotor de *GGP* parece responder a diferentes tipos de estrés abiótico, incluyendo el calor y la intensidad de la luz (Li et al., 2013). La comparación entre especies de kiwi, diferentes en su contenido de ácido L-ascórbico, revelan que la expresión de *GGP*, regulada por diferentes mecanismos, se correlaciona con un mayor nivel del compuesto (Li et al., 2014). Adicionalmente, la transformación en *A. thaliana* y la expresión transitoria de *GME* y *GGP* en hojas de tabaco revela un efecto sinérgico entre ellas (Bulley et al., 2009). Por lo anterior, se sugiere que los pasos que conciernen a *GME* y *GGP* son importantes en la ruta de la D-manosa/L-galactosa (Bulley y Laing, 2016).

2.2.3 El Sistema Antioxidante y de Reciclaje del Ácido L-ascórbico: Tolerancia ante el Estrés por Calor

El sistema antioxidante del ácido L-ascórbico se puede encontrar en diferentes partes de la célula que la protegen ante el estrés oxidativo generado por el metabolismo y el estrés abiótico. La enzima ascorbato peroxidasa (APX) utiliza el ácido L-ascórbico como agente reductor para reducir el peróxido de hidrógeno a agua. Las isoenzimas identificadas en *A. thaliana* se encuentran en diferentes compartimentos celulares: en citosol (APX1, APX2, APX6), peroxisomas, glioxisomas (APX3, APX4, APX5) y cloroplasto (sAPX Y tAPX) (Anjum et al., 2016). La sobreexpresión de ascorbato peroxidasa ha conferido tolerancia ante el calor a plantas transgénicas de *A. thaliana* y *Brassica oleracea* (Chiang et al., 2015; Jiang et al., 2016). Además, se ha visto que la expresión del factor de transcripción A2s (HsfA2) puede regular la transcripción de APX2, y conferir tolerancia al estrés por calor (Wang et al., 2016), mostrando que la enzima ascorbato peroxidasa responde durante los mecanismos de protección ante el estrés abiótico de la célula.

Durante los procesos de eliminación de EROs se producen formas oxidadas del ácido L-ascórbico. Se han identificado enzimas que reciclan el ácido L-ascórbico y contribuyen al mantenimiento del balance de este compuesto en plantas bajo estrés. La monohidroascorbato reductasa (MDHAR) se ha encontrado en varios compartimentos celulares en las plantas, en maíz, cuatro MDHARs se han encontrado localizadas en citosol y mitocondria (Liu et al., 2012), observando que los genes de MDHAR que se han expresado de manera distinta en respuesta al estrés abiótico. La sobreexpresión de una MDHAR cloroplástica de tomate mejoró la tolerancia ante el estrés por temperatura en protoplastos de *A. thaliana* (Li et al., 2010). Lo anterior sugiere la importancia de la presencia de la ruta de reciclaje del ácido L-ascórbico en diferentes compartimentos celulares, durante los mecanismos de defensa ante estrés abiótico en las plantas.

La enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) participa en el sistema de reciclaje del ácido L-ascórbico mediante el ciclo del glutatión-ascorbato, y se conoce que también participa durante el estrés abiótico. En *Arabidopsis* se han identificado tres genes de DHAR (*DHAR1*, *DHAR2* y *DHAR3*). Las diferentes isoenzimas de DHAR se localizan en distintas partes en la célula; DHAR1 y DHAR2 se han localizado en el citosol, mientras que la DHAR3 en el cloroplasto y su actividad es necesaria ante la tolerancia al estrés foto oxidativo (Noshi et al., 2016; Noshi et al., 2017). Se ha encontrado que la capacidad de los mecanismos antioxidantes de reciclaje difiere entre genotipos de plantas con diferente tolerancia al calor (Zou et al., 2016). Lo anterior puede deberse a diferencias en la regulación y capacidad del ciclo del glutatión-ascorbato, por lo que el estudio del sistema de reciclaje del ácido L-ascórbico también ha sido utilizado para estudiar la capacidad antioxidante en las plantas.

2.3 La Acción del Tratamiento Hidrotérmico en el Contenido de Ácido L-ascórbico por en Frutos

2.3.1 El Tratamiento Hidrotérmico como Medida Cuarentenaria en Mango

Los frutos de interés comercial como el mango cumplen con protocolos de fitosanidad y control de plagas que se ajusten a los requerimientos establecidos para ser exportados. Estos protocolos están diseñados para eliminar infestaciones por especies de la familia *Tephritidae*, del orden *Diptera*, entre las que se encuentran larvas de *Anastrepha ludens* (Loew), *A. suspensa* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) y *A. serpentina* (Wiedemann) (Yahia et al., 2011) que infestan frutos tropicales y subtropicales en México, a las cuales se les conoce colectivamente como moscas de la fruta. Los tratamientos cuarentenarios para la eliminación de estas larvas incluyen medidas químicas y físicas, dentro de cuales se incluyen los tratamientos con base en temperatura como el tratamiento hidrotérmico.

El tratamiento hidrotérmico (THC) es una opción adecuada para el control de las infestaciones de la mosca de la fruta en frutos de climas tropicales y subtropicales. La técnica se ha utilizado para el mango debido a su facilidad de implementación, relativo corto tiempo del proceso y su alta capacidad para eliminar los insectos invasores en los frutos (Ducamp Collin et al., 2007). Hernández y colaboradores (2012) indican que los frutos de mango cv. “Ataulfo” deben de someterse por 95 minutos a 46.1- 47°C, para asegurar la eliminación de las larvas del primer estadio de *Ceratitidis capitata*, que son las más resistentes al calor. Los frutos de mango en la práctica, es común que se sometan al THC a 46.1°C por un tiempo variable (el cual depende de su peso) de entre 75 a 110 minutos dependiendo del peso del fruto. Estas condiciones son recomendadas para garantizar la calidad del producto para la exportación, especialmente hacia los Estados Unidos (USDA-APHIS, 2016).

Existen diferentes factores que afectan el contenido de ácido L-ascórbico en los frutos en postcosecha. Es importante recalcar que el ácido L-ascórbico es un compuesto lábil a las altas temperaturas y es fácilmente oxidado. Algunos de estos factores incluyen largos tiempos de almacenamiento, altas temperaturas, baja humedad relativa, daño físico al fruto y daño por frío, entre otros (Lee y Kader, 2000). Por otra parte, en tiempos de exposición cortos a altas temperaturas, como el THC existen cambios debido al estrés por calor en los frutos, los cuales incluyen el aumento de proteínas de defensa y enzimas antioxidantes (Lurie y Pedreschi, 2014). Las pérdidas de ácido L-ascórbico causados por estos factores afectan el valor nutricional de los productos hortícolas, por lo que su estudio podría proporcionar información acerca de su influencia sobre el metabolismo del ácido L-ascórbico en frutos en postcosecha.

2.3.2 Respuestas Fisiológicas de los Frutos ante el Estrés Debido el Tratamiento Hidrotérmico

Los efectos de los tratamientos postcosecha se han estudiado principalmente con el objetivo de evaluar los cambios en las características fisiológicas y sensoriales de los frutos. Luna-Esquivel (2008) reportó que el THC en mangos cv. “Ataulfo” afecta la fisiología y bioquímica del fruto. Los frutos de mango (cosechados en madurez fisiológica) fueron sometidos a un THC de 46.1°C por 75 minutos y fueron almacenados a 22±2 °C por 11 días. Entre los distintos aspectos evaluados, los más afectados fueron la firmeza, el contenido de ácido L-ascórbico, los sólidos solubles totales, el aumento en la susceptibilidad al frío y el adelanto de la maduración. También se observó un incremento del 40% del desorden denominado “tejido seco” en mangos sometidos al THC, aunque el THC no haya sido el agente causal, se menciona que el calor del tratamiento potenció este defecto fisiológico.

2.3.3 Efectos en la Expresión Génica Debido a la Aplicación de Calor a los Frutos

La expresión diferencial de genes que codifican para proteínas del sistema antioxidante se ha reportado para frutos sometidos a tratamientos con base en el calor. Huan y colaboradores (2017), reportaron la inducción de la expresión de genes de enzimas del ciclo glutatión-ascorbato, *PpaSOD*, *PpaCAT1* y *PpaAPX2* después del tratamiento hidrotérmico de durazno (*Prunus persica* L. cv Xiahui 5). El contenido de ácido L-ascórbico, la calidad de los frutos de durazno y la capacidad antioxidante se vieron mejorados después del tratamiento con agua o con aire caliente durante el almacenamiento en frío. El tratamiento hidrotérmico a 48°C por 10 minutos, fue más efectivo en mejorar el metabolismo de ácido L-ascórbico al inicio del almacenamiento de los frutos. La efectividad del THC se puede deber a la mayor transmisión de calor del agua, induciendo los mecanismos antioxidantes (Huan et al., 2017).

Wang y colaboradores (2014), estudiaron los efectos del tratamiento con aire caliente sobre el metabolismo del ácido L-ascórbico en frutos de durazno bajo condiciones de estrés por frío. Los frutos de durazno se sometieron a 37°C por 3 días y el calor provocó la producción de peróxido de hidrógeno, seguida de la inducción de expresión de los genes de las enzimas GLDH, APX, MDHAR y DHAR. Evidentemente, el incremento de las EROs tiene como consecuencia la inducción del metabolismo y del sistema de reciclaje del ácido L-ascórbico, previniendo los daños fisiológicos del fruto causados por el estrés por temperatura. Además, se ha observado que las temperaturas bajas también desencadenan reacciones de respuesta ante el estrés abiótico. En frutos de tomate “Cherry” (*Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme cv. Conchita F1) almacenados a 5°C y 10°C, se observó un aumento en la expresión de genes de biosíntesis, de reciclaje del ácido L-ascórbico y del sistema antioxidante (Tsaniklidis et al., 2014).

Los transcriptomas realizados en mango cv. “Ataulfo” sometido al THC mostraron expresión diferencial de genes relacionados a una variedad de rutas metabólicas. Entre ellos, aquellos relacionados al metabolismo de la degradación de la pared celular (Dautt-

Castro et al., 2018). Lo anterior lleva al cuestionamiento de cómo los genes relacionados a distintos parámetros de calidad y nutricionales son afectados en sus niveles de expresión por esta medida cuarentenaria. Además, la necesidad de analizar a detalle cada ruta de biosíntesis de compuestos relacionados con el color, sabor, aroma, así como de aquéllos relacionados con la pérdida de firmeza y de manera importante los relacionados con aspectos de salud y nutrición.

Por lo anteriormente mencionado, el estudio de las respuestas de los genes ante el estrés abiótico en los frutos podría ayudar a elucidar los eventos que ocurren a nivel molecular. En concreto para el caso del metabolismo del ácido L-ascórbico, este trabajo se enfoca en investigar los factores que pudieran llevar a la inducción de genes de biosíntesis y reciclaje del ácido L-ascórbico. Es por ello, que el objetivo a futuro es aportar información más a detalle acerca del impacto que causa el estrés abiótico que ocurre durante la postcosecha de los frutos de importancia económica como el mango.

3. HIPÓTESIS

El estrés por calor causado por el tratamiento hidrotérmico en mango cv. Ataulfo induce los genes de las enzimas GDP-manosa 3,5 epimerasa, GDP-galactosa fosforilasa y monodehidroascorbato reductasa citosólica durante la maduración de los frutos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la expresión de GDP-manosa 3,5 epimerasa, GDP-galactosa fosforilasa y monodehidroascorbato reductasa citosólica en la maduración del mango cv. Ataulfo sometido a tratamiento hidrotérmico.

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el color, la firmeza y contenido de ácido L-ascórbico en mango cv. Ataulfo con y sin tratamiento hidrotérmico durante la maduración postcosecha.
2. Identificar los transcritos que codifican para enzimas de la biosíntesis y reciclaje de ácido L-ascórbico del transcriptoma de mango cv. Ataulfo y mapearlos al genoma del mango cv. Tommy-Atkins.
3. Evaluar la expresión relativa de los genes GDP-manosa 3,5 epimerasa, GDP-galactosa fosforilasa, y monodehidroascorbato reductasa citosólica en la maduración postcosecha de mangos cv. Ataulfo con y sin tratamiento hidrotérmico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestreo de los Frutos de Mango cv. Ataulfo

La recolección de los mangos cv. Ataulfo se llevó a cabo en la Huerta Díaz, localizada en Escuinapa, Sinaloa. Se colectaron mangos en madurez fisiológica, considerando ésta a partir de los 120 días después de floración. Se tomaron en cuenta criterios de inclusión como la uniformidad del peso y del color, y que además estuvieran libres de daño aparente. Los mangos se sometieron a las condiciones de tratamiento hidrotérmico definidas por la USDA-APHIS (2016), las cuales son de 46.1°C por 75 minutos, seguido de un hidrogenfriado a 25°C por 30 minutos. Los frutos se almacenaron en una cámara a 20°C hasta alcanzar la madurez comercial. Se muestrearon tres réplicas biológicas por cada día y por tratamiento (se formaron dos grupos, el grupo testigo y el grupo sometido al THC). Los días de muestreo fueron 1 hora después del THC (día 0), día 1, día 2, día 5 y día 9. En cada estado de madurez se evaluaron parámetros físicos como color y firmeza, el contenido de ácido L-ascórbico y la expresión de los genes de biosíntesis y reciclaje del ácido L-ascórbico de interés.

5.2 Análisis de los Parámetros Físicos

Con el objetivo de evaluar los estados de madurez del mango cv. Ataulfo, se realizaron determinaciones de los siguientes parámetros físicos principales: color interno (pulpa) y externo (cáscara) y la firmeza de los mangos en cada tiempo de almacenamiento evaluado. El color interno y externo de cada fruto se determinó por medio de un colorímetro manual Konica Minolta CM-700d, utilizando el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$. En este espacio, L^* indica luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad. En este sistema, a^* y b^* indican direcciones de colores: $+a^*$ es la

dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-b^*$ es la dirección del azul. El color externo se evaluó en la cáscara de cada lado del fruto (dos puntos) y el color interno se evaluó en dos puntos opuestos en la pulpa del fruto. Los resultados se expresaron como los tres atributos de color L, ángulo de tono y croma. L^* indica la luminosidad o claridad, e indica que tan claro u oscuro es el color. El valor de croma C^* indica la saturación del color y si estos son vivos o apagados. Los colores son apagados cerca del centro y se hacen más vivos a medida que los valores se alejan del centro. El ángulo del tono h se define el tono del color y se expresa en grados: 0° sería (rojo), 90° sería amarillo), 180° sería verde y 270° sería azul (Konica Minolta, 2007). El ángulo de tono y el croma se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ángulo de tono} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (1)$$

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

La firmeza de los frutos se evaluó por medio de un penetrómetro Lloyd-Ametek LS1 utilizando un punzón de 0.8 mm. Este parámetro se determinó en lados opuestos de la parte media, con dos mediciones por fruto. Los resultados se expresaron en Newtons (N).

5.3 Identificación y Análisis de Secuencias Nucleotídicas y Aminoacídicas de *MiGME*, *MiGGP1*, *MiGGP2* y *MiMDHAR*

Para el diseño de los iniciadores que se utilizaron en la evaluación de la expresión de genes, se identificaron las secuencias de los genes de biosíntesis *MiGME*, *MiGGP1*, *MiGGP2* y de reciclaje *MiMDHAR* a partir del transcriptoma del mango cv. Ataulfo (Acceso: PRJNA286253) (Dautt-Castro et al., 2018). A partir de esta información, se diseñaron los iniciadores de cada uno de los genes de interés para *M. indica* cv. Ataulfo utilizando las herramientas PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies) y Primer-BLAST (NCBI), los cuales se muestran en la Tabla 1.

Las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas de los genes se analizaron por comparación con la base de secuencias no redundante del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) por medio del algoritmo BLASTp (Altschul et al., 1990), el cual proporciona los porcentajes de identidad y similitud de las enzimas putativas de mango con las de otros organismos. Los alineamientos múltiples se realizaron mediante el algoritmo ClustalW (Larkin et al., 2007) y el servidor BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html) utilizando las cinco secuencias aminoacídicas con el mayor puntaje de similitud asignado por la base de datos del NCBI, y las correspondientes de la planta modelo de estudio, *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 1. Iniciadores para amplificar fragmentos de los genes *MiGME*, *MiGGP1*, *MiGGP2* y *MiDHAR* en las reacciones de qPCR.

<i>Gen</i>		<i>Iniciadores</i> 5' – 3'	<i>Tm</i>	<i>GC%</i>
<i>MiGME</i>	FW	GAGCTTGAGAGGGAAC TTAC	60	47.6
	REV	TTCAACCGACGAGCAATG	60	50
<i>MiGGP1</i>	FW	CAGAATCAACCACCCTGAAG	60.3	50
	REV	GATGGCACCATTAGGTACAG	59.9	50
<i>MiGGP2</i>	FW	GAAAAGGAGAATAGCGAGCC	60.4	50
	REV	CACAGGCAGTGACATCATAG	60.4	50
<i>MiMDHAR</i>	FW	GGGTGACACAGTGCTATTT	60	47.4
	REV	CCAACAACCTTCCCATCTT	60	47.4

5.4 Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN, se utilizó la pulpa de mango, la cual fue congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -20 °C hasta ser utilizada. La extracción de RNA total se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita por López-Gómez y Gómez-Lim (1992), con ciertas modificaciones. Se pulverizaron 0.5 g de tejido de pulpa de mango utilizando nitrógeno líquido. A continuación, la muestra se mezcló en un vórtex con 1 mL buffer de lisis (SDS al 2%, mercaptoetanol al 1%, 50 mM EDTA y 150 mM Tris base a pH 7.5 con 1 M de ácido bórico). El ARN se dejó precipitar con 3 M cloruro de litio (concentración final) durante toda la noche. Se procedió a centrifugar la muestra a 20,000 g por 10 minutos. El pellet fue lavado con etanol al 75% dos veces y se resuspendió en agua tratada con dietilpicrocarbonato al 0.1%. Finalmente, se evaluó la integridad del ARN obtenido por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes y se cuantificó a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000 (Thermo Scientific).

5.5 Purificación del ARN y Síntesis de cDNA

Se sometió el ARN extraído a un tratamiento previo con la enzima DNAsa I libre de RNAsa (Roche) para eliminar cualquier residuo de DNA genómico que se encontrara en la muestra. Se sintetizó el cDNA a partir de 5 microgramos de RNA total utilizando la transcriptasa reversa del juego de reactivos comercial SuperScript III RT (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del protocolo del producto.

5.6 Evaluación de la Expresión de los Genes

La expresión de los genes *MiGME*, *MiGGP1*, *MiGGP2* y *MiMDHAR* se evaluó por PCR cuantitativa (qPCR), usando iniciadores específicos para cada uno de los genes evaluados. Las reacciones de amplificación se hicieron por triplicado de cada una de las 3 réplicas biológicas utilizando el sistema iTaq Universal SYBRGreen supermix (Bio-Rad), en un equipo termociclador StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems). La expresión de los genes de estudio se comparó contra el gen normalizador que codifica para la gliceraldehído 6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y como calibrador se utilizaron los resultados del día 9. Los niveles de expresión se calcularon utilizando el método de análisis de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ propuesto por Livak y Schmittgen (2001). La expresión relativa de los genes de interés a lo largo de la maduración, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Expresión Relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ GAPDH})_{\text{Día } 0,1,2,5} - (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ GAPDH})_{\text{Día } 9} \quad (4)$$

Para determinar el efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario en los niveles de expresión de los genes evaluados, se realizó de acuerdo a lo propuesto por Schmittgen y Livak (2008) y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Cambio en la expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (5)$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ GAPDH})_{\text{tratamiento}} - (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ GAPDH})_{\text{Testigo}} \quad (6)$$

Si el primer ΔCt es mayor que el segundo ΔCt , el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ resulta ser <1 , lo cual indica que hubo una reducción en los niveles de expresión del gen por efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario aplicado. Para evaluar el nivel de reducción en la expresión se obtiene el inverso negativo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.7 Determinación del Contenido de Ácido L-Ascórbico

Para determinar el contenido de ácido L-ascórbico, se utilizó el método descrito por Donner y Hicks (1981) con ciertas modificaciones. Se extrajo el ácido L-ascórbico a partir de 10 gramos de la muestra utilizando una solución extractora de 0.375 mol/L ácido metafosfórico (HPO_3) disuelto en una solución al 8% de ácido acético glacial. Se utilizó una columna analítica NH_2 de 25 cm por 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm y un inyector de lazo de muestreo de 10 μL . La fase móvil consistió en una solución de 0.0125 mol/L de fosfato de sodio monobásico (KH_2PO_4), disuelto en una solución al 75% de acetonitrilo. El ácido L-ascórbico se detectó por luz UV-visible a una longitud de onda de 268 nm. Se utilizó un estándar de ascorbato de sodio. El contenido de ácido L-ascórbico se expresó en mg/100 g de peso fresco.

5.8 Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x5. En donde los factores son el tiempo de almacenamiento a 20°C (días) y el tratamiento (testigo y sometido a THC). En cada estado de madurez y tratamiento se obtuvieron tres réplicas biológicas, en las que se evaluó el contenido de ácido L-ascórbico y los parámetros físicos (firmeza, color externo e interno). Se realizó un ANOVA de una sola vía para la variable de expresión relativa de cada uno de los genes de interés, de manera separada, en función del tiempo de almacenamiento y durante el THC. Cada uno de los valores evaluados se expresan como media \pm error estándar (EE).

En los casos donde hubo un efecto significativo del tratamiento, se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con un nivel de significancia del 95%. Los datos se analizaron en el paquete estadístico NCSS 2011.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Parámetros Físicos de Madurez en mango cv. Ataulfo

6.1.1 Firmeza del Mango cv. Ataulfo

En la Figura 2 se observan los cambios de firmeza de los frutos durante el almacenamiento a 20°C, conforme los frutos maduraron. La firmeza de los frutos se mantuvo sin cambios significativos ($p > 0.05$) durante los primeros dos días a 20°C. Sin embargo, a partir del día 5, los valores disminuyeron significativamente ($p \leq 0.05$) tanto en los frutos testigo como en los sometidos a tratamiento hidrotérmico, observando una disminución de aproximadamente un 78% en la firmeza inicial de los frutos, hasta alcanzar un valor de 9.1 N y 8.0 N en el día 9 en los frutos testigo y tratados hidrotérmicamente, respectivamente. No se observó un efecto significativo del THC ($p > 0.05$) en la firmeza de los frutos de mango cv. Ataulfo.

Los frutos sufren un gran número de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos durante su maduración, entre los cuales se incluyen la producción de pigmentos, de compuestos volátiles y la degradación de la pared celular, resultando en un ablandamiento de estos. Los cambios en la firmeza y la composición de la pared celular de los frutos se deben a la acción de las enzimas que degradan los componentes de la pared celular. Algunas de esas enzimas son las poligalacturonasas, las pectinmetil esterases, pectato liasas, entre otras, las cuales rompen los enlaces de la matriz de polisacáridos que componen la pared celular (Payasi et al., 2009). Los resultados del efecto del THC en la firmeza de mango cv. Ataulfo de este estudio son similares con lo observado por Luna-Esquivel (2006) quien mostró un efecto significativo en la firmeza de los frutos de mango cv. Ataulfo sometidos al THC de 46.1°C por 75 minutos. De la misma manera, Dautt-Castro y colaboradores (2018) reportaron valores similares de

firmeza y una disminución de este parámetro de los mangos cv. Ataulfo debido al THC (46.1°C) entre los días 1 y 4 de almacenamiento a 20°C.

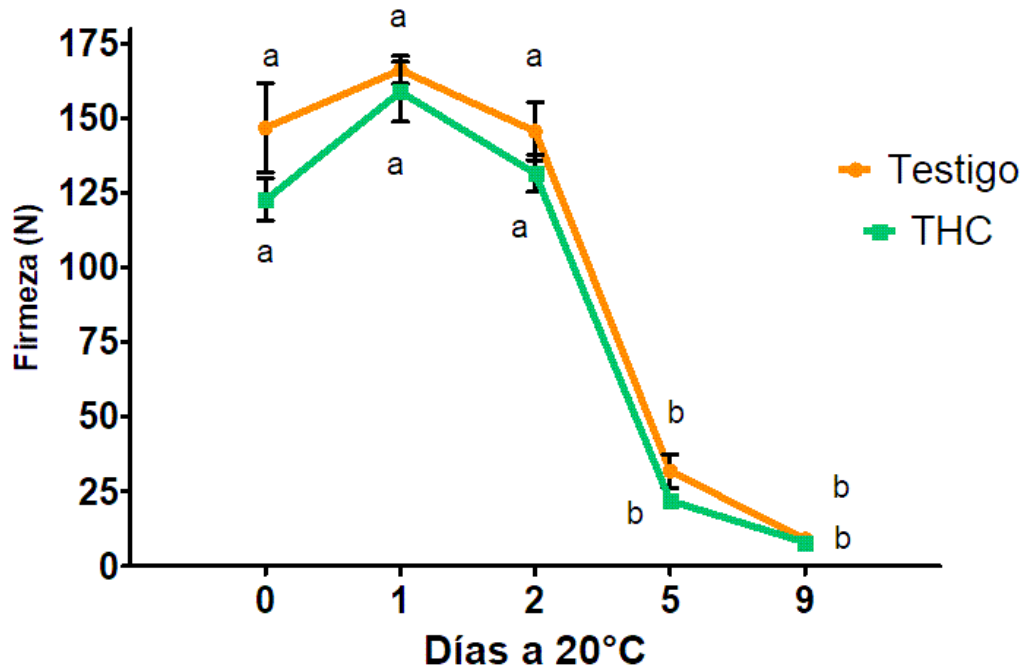


Figura 2. Cambios en la firmeza (N) de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C (media±EE). Diferentes literales indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre las medias de cada día de maduración en postcosecha.

6.1.2 Color Externo del Mango cv. Ataulfo

El color de los frutos está dado por el tipo de pigmentos que se encuentran en la cáscara y el mesocarpio de estos. Cuando el fruto se encuentra inmaduro, éste presenta en su cáscara un color verde característico debido a la clorofila, al madurar, el fruto cambia de color verde a los colores característicos que, en el caso particular del mango cv. Ataulfo, es amarillo. Este cambio a color amarillo está dado por la síntesis de carotenoides y la degradación de la clorofila a lo largo de la maduración (Kuai et al., 2017).

En la figura 3, se aprecian los atributos de color (ángulo de tono, luminosidad y croma o saturación de color) evaluados durante la maduración del mango a 20°C. El ángulo de tono indica los cambios de matiz, valores de ángulo de tono de alrededor de 100° a 180° indican un matiz verde. Al inicio del estudio, los frutos de ambos tratamientos presentaron valores de ángulo de tono de aproximadamente 100°, lo cual indica un tono del color de verde amarillento (figura 3A). Los valores de ángulo de tono de los frutos testigo y los del THC se mantuvieron sin cambios significativos ($p > 0.05$) durante los primeros dos días de almacenamiento a 20°C. En cambio, a partir del día 5 los frutos sometidos al THC mostraron una disminución significativa en comparación con los dos primeros días y valores significativamente menores que los frutos testigo ($p \leq 0.05$). Estos resultados indican que el THC adelantó el cambio de color externo de los frutos. Al finalizar el periodo de almacenamiento los valores de ángulo de tono fueron de 73.4° y 71.9° para frutos testigo y THC, respectivamente; estos valores se ubican en la región de tonos amarillos de la esfera de color (Konica Minolta, 2007)

De manera similar o contrario a este estudio Luna-Esquivel y colaboradores (2006), encontraron un comportamiento similar en el ángulo de tono durante la maduración de mangos cv. Ataulfo con valores de 111° en el día 1 y de 81° en el día 9 en frutos testigo y de 100 a 74 ° en frutos con THC, sin embargo, no se observó un efecto del THC. Dautt-Castro y colaboradores (2018) reportaron valores desde 92 a 80 ° en frutos testigo y 88 ° (día 1) hasta 72 ° (día 10) en frutos con THC, en contraste con lo reportado por Luna-Esquivel y colaboradores (2006), el THC afectó el ángulo de tono del color externo de los frutos.

Los valores de luminosidad (L^*) indican que tan claro u oscuro es el color. Durante el almacenamiento, en ambos tratamientos se presentó un incremento en L^* en los frutos. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.5$) en la luminosidad entre los frutos testigo y THC durante los primeros 2 días a 20°C. Sin embargo, se observó que el THC adelantó el incremento en los valores de éste atributo. Lo anterior sugiere o muestra que el color de los frutos se fue aclarando ligeramente a lo largo de la maduración.

Por otro lado, se puede apreciar que los valores de croma incrementaron durante el almacenamiento de los frutos a 20°C (figura 3C). Los mangos presentaron valores de croma de 38.1 y 47.0 al inicio del estudio (día 0), en los frutos los cuales se incrementaron hasta alcanzar valores de 57.6 y 58.6 en el día 9 en los frutos testigo y THC, respectivamente. En general, el promedio de los valores de croma de los frutos testigo fueron menores (44.0) en comparación con los frutos sometidos al THC (48.9). Lo anterior, indica que la saturación o viveza del color se fue intensificando durante el almacenamiento de los frutos y que color de los frutos sometidos al THC fue más intenso.

Se ha observado que, en respuesta al estrés por calor, la degradación de la clorofila se ve más acentuada debido al desmantelamiento de la maquinaria fotosintética (Wang et al., 2018; Allakhverdiev et al., 2008) y en *Arabidopsis*, se observó un aumento de la actividad de la enzima clorofilasa) al someter la planta a 38°C por 24 horas (Todorov et al., 2003). Lo que puede explicar el adelanto del cambio de coloración verde a amarillo en el día 5 en los frutos sometidos al THC.

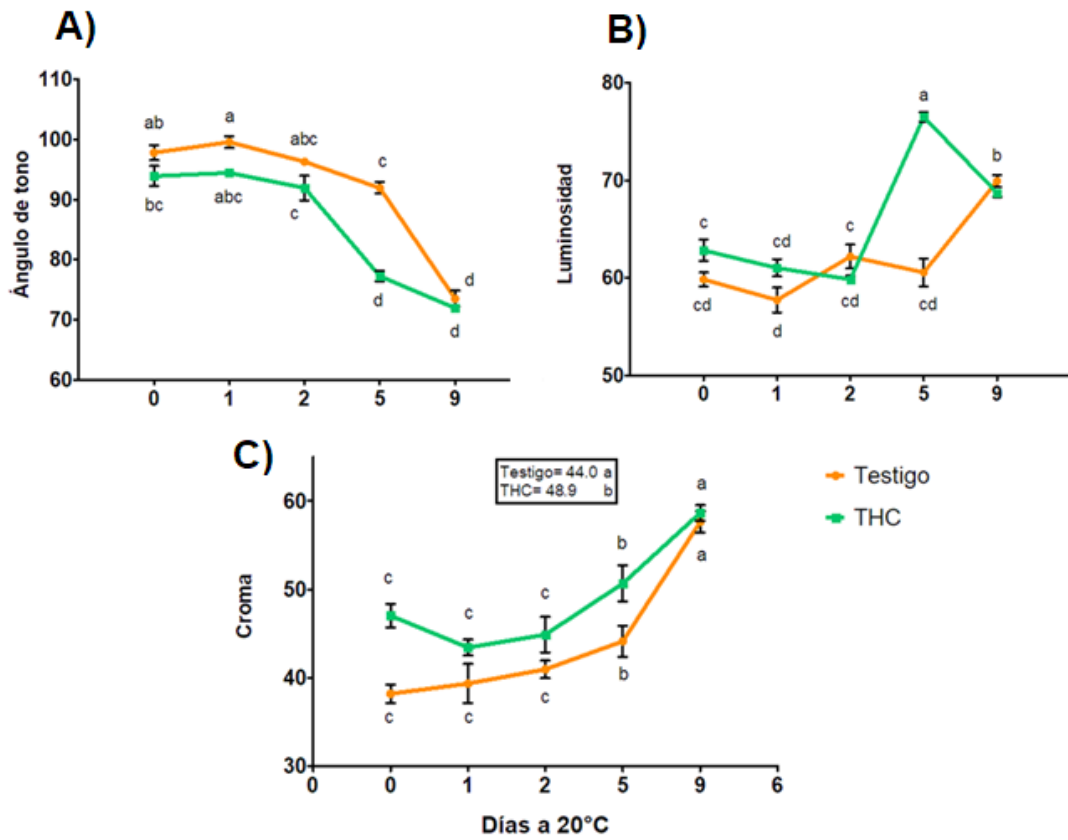


Figura 3. Color externo (A) ángulo de tono, B) luminosidad y C) croma) de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C (media±EE). Diferentes literales indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre las medias de cada día de maduración en postcosecha. Se realizó una prueba de *t* de Student para muestras independientes entre los frutos testigo y tratado en cada día, las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) se indican con un asterisco.

6.1.3 Color Interno del Mango cv. Ataulfo

El comportamiento del color interno de los frutos a lo largo de su maduración en postcosecha se muestra en la Figura 4. Al inicio del estudio, ambos tratamientos presentaron valores de ángulo de tono de 78 ° y 77 ° en los frutos testigo y los frutos sometidos al THC, respectivamente (figura 4A), los cuales se ubican en el cuadrante del color amarillo de la esfera de color (Konica Minolta, 2007). El ángulo de tono de la pulpa de los frutos en ambos tratamientos se mantuvo sin cambios significativos durante los primeros 5 días de almacenamiento a 20°C y disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) en el día 9 a valores de 68° y 67 °, que se ubican en el área del color anaranjado. Lo anterior indica que existió un cambio de color del amarillo a un color anaranjado durante la maduración en la pulpa del fruto. No se observó un efecto significativo ($p > 0.05$) del THC en el ángulo de tono de los frutos. En contraste, Dautt-Castro y colaboradores (2018) reportaron que el THC afectó el ángulo de tono del color interno de los frutos, con valores similares de 88 ° a 72 ° en los días 1 y 10, respectivamente, en frutos testigo y 78 ° 68 ° en frutos.

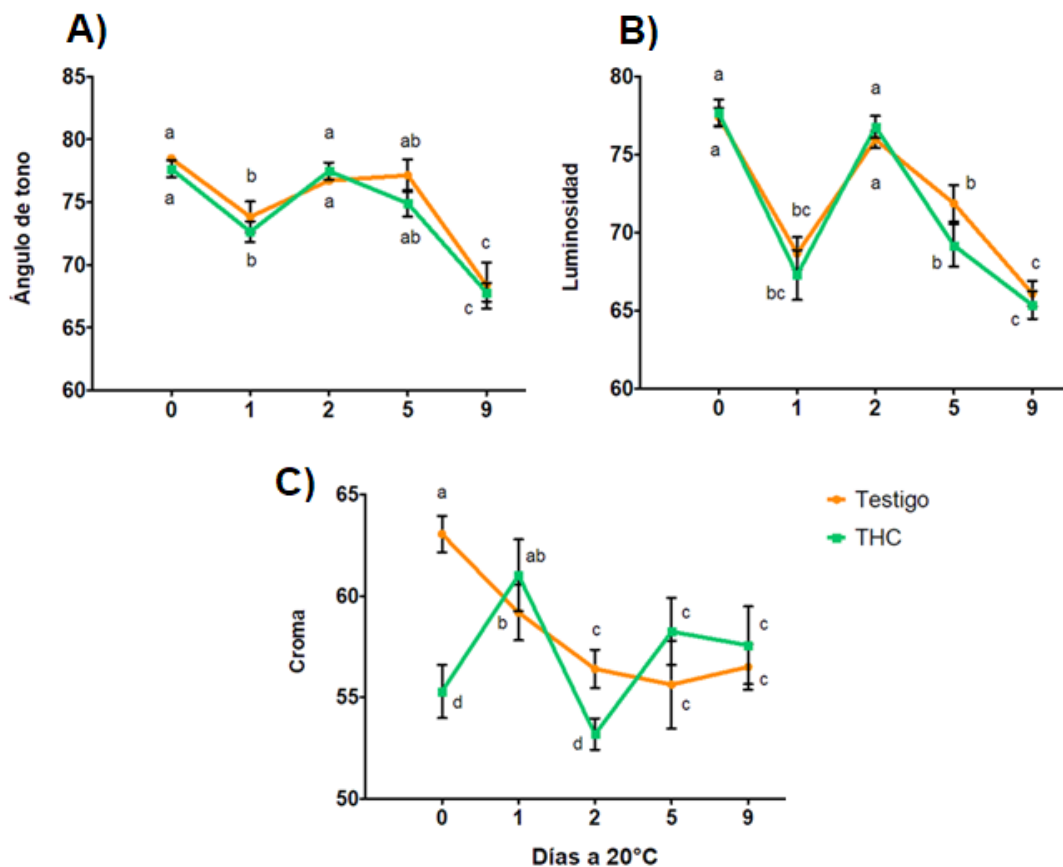


Figura 4. Color interno (A), ángulo de tono, B) luminosidad y C) cromía) de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C (media±EE). Diferentes literales indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre las medias de cada día de maduración en postcosecha. Se realizó una prueba de *t* de Student para muestras independientes entre los frutos testigo y tratado en cada día, las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) se indican con un asterisco.

En cuanto a la luminosidad, la tendencia de este atributo del color fue a disminuir durante el almacenamiento a 20°C (Figura 4B), indicando un oscurecimiento del color de la pulpa durante este proceso. No se observó un efecto significativo del THC ($p>0.05$) en la luminosidad del color de la pulpa de los frutos. Los valores de croma (figura 4A) disminuyeron durante el almacenamiento a 20°C en frutos testigo; sin embargo, en frutos sometidos al THC se observó un comportamiento variable durante la maduración.

Finalmente, en la figura 5, se presenta el color subjetivo tanto de cáscara como de pulpa de los frutos testigo y los sometidos al THC durante su maduración. Se puede apreciar que el día 0 (inicio del estudio) tanto los frutos testigo como los frutos del THC presentan un color amarillo claro en su pulpa, aun cuando la cáscara todavía presentaba un color verde claro y muestra de manera visual, la maduración del fruto inicia desde el centro del fruto y avanza hacia afuera. En el día 2, el color verde claro en la cáscara seguía presente, en cambio a partir del día 5 se observó un cambio de color a amarillo claro, aunque no de manera uniforme, y finalmente en el día 9 se observó que los frutos presentaron un cambio completo al amarillo en la cáscara, indicando un fruto maduro para su consumo. El color amarillo inicial de la pulpa se intensificó y se observó un cambio al color naranja en el día 9.



Figura 5. Apariencia visual del mango cv. Ataulfo durante su maduración a 20°C. Los frutos testigo se encuentran al lado izquierdo. Los frutos con el tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) se muestran al lado derecho.

6.1.4 Contenido de Ácido L-Ascórbico en Mango cv. Ataulfo

El contenido de ácido L-ascórbico en el mesocarpio de mango cv. Ataulfo de este estudio se presenta en la figura 6 donde se observa que el contenido de este antioxidante se mantuvo constante durante el almacenamiento a 20°C de los mangos testigos y sometidos al THC, observando hasta un máximo en frutos almacenados por 1 día de ambos tratamientos, los cuales que fueron significativamente mayores (200.75 mg y 175.71 mg/100 g de peso fresco, para frutos testigo y tratados, respectivamente). Ortega y colaboradores (2013) obtuvieron valores de ácido L-ascórbico desde 134.98 mg/100 g de peso fresco hasta 149.14 mg/100 g de peso fresco, observando un patrón similar al reportado en este trabajo en mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 25°C por 16 días.

El THC disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido de ácido L-ascórbico de los frutos. Los valores promedio del ácido L-ascórbico fueron 156.01 y 137.72 mg/100 g de peso fresco en frutos testigo y sometidos a THC, respectivamente. Lo anterior representa una disminución del 12% en el contenido de este antioxidante. El ácido L-ascórbico es susceptible a la oxidación como resultado del efecto de factores como la temperatura, por lo que se pueden presentar pérdidas de este antioxidante durante el manejo postcosecha de los frutos (Lee y Kader, 2000).

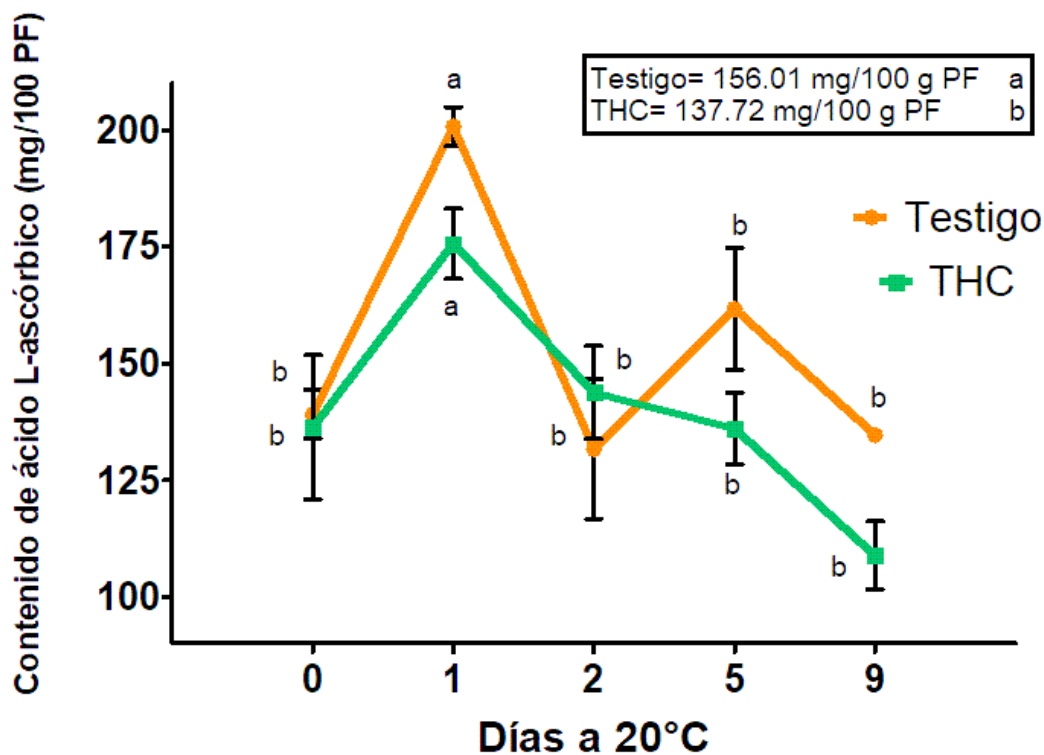


Figura 6. Contenido de ácido L-ascórbico (mg/100 g de peso fresco) de los frutos de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Diferentes literales indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre las medias de cada día de maduración en postcosecha. Se realizó una prueba de *t* de Student para muestras independientes entre los frutos testigo y tratado en cada día, las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) se indican con un asterisco.

El mango Ataulfo es uno de los cultivares comerciales con mayor contenido de ácido L-ascórbico. Se ha reportado con anterioridad que el contenido de ácido L-ascórbico del mango cv. Ataulfo es de 158.5 mg/100 g de peso fresco (Robles-Sánchez et al., 2009). En este trabajo se obtuvieron valores similares con un promedio de 146.86 ± 33.42 mg/100 g de peso fresco y se consideran altos al compararse con lo reportado para mangos de otros cultivares. En el trabajo realizado por Manthey y colaboradores (2009), el mango cv. Ataulfo presentó valores de 125.4 ± 6.4 mg/100 g; mientras que los mangos cv. Keitt, Kent, Tommy-Atkins y Haden, presentaron en promedio 24.7 ± 7.9 , 25.6 ± 4.9 , 19.3 ± 4.8 y 31.0 ± 5.2 mg/100 gramos de peso fresco, respectivamente. Adicionalmente, se ha reportado un contenido de ácido L-ascórbico de 77.7 mg/100 g de peso fresco en mango del cultivar Ubá (Rocha-Ribeiro, 2007).

El estrés por temperatura provoca los cambios a nivel molecular que incluyen la acumulación tanto de proteínas de defensa y enzima antioxidantes como también recientemente se ha observado, especialmente la estimulación de enzimas de reciclaje del ácido L-ascórbico (Lurie y Pedreschi, 2014, Huan et al., 2017; Wang et al., 2014). Por lo que el THC puede influenciar la expresión de genes de biosíntesis y reciclaje de ácido L-ascórbico y el contenido de este compuesto.

6.2 Análisis de Genes de Biosíntesis y Reciclaje de Ácido L-Ascórbico

6.2.1 Análisis de las Secuencias Aminoacídicas de los Genes *MiGME*, *MiGGP1*, *MiGGP2* y *MiMDHAR* citosólica

Los transcritos de los genes *MiGME*, *MiGGP1*, *MiGG2* y *MiMDHAR* citosólica que codifican para las enzimas GDP-manosa 3,5 epimerasa y GDP-galactosa fosforilasa de la ruta de D-manosa/L-galactosa fueron obtenidos en el transcriptoma (acceso en NCBI: PRJNA286253) del mango cv. Ataulfo (Dautt-Castro et al., 2018). Los resultados de nuestro estudio mostraron que el cDNA de *MiGME* es de 1889 pares de bases (pb) y la región codificante de 1131 pb que genera una proteína de 376 aminoácidos. Es importante mencionar que se encontraron dos transcritos que codifican para la enzima GDP-galactosa fosforilasa en el transcriptoma del mango cv. Ataulfo. Para GGP, el tamaño de su cDNA es de 1958 y 2290 pb para *MiGGP1* y *MiGGP2*, respectivamente. La región codificante de *MiGGP1* es de 1113 y la de *MiGGP2* es de 1350 pb que genera una proteína de 370 y 446 aminoácidos, respectivamente.

En *Arabidopsis thaliana*, también se han encontrado dos genes que codifican para esta enzima, las cuales se denominaron *Vtc2* y *Vtc5* (Dowdle et al., 2007) y son necesarias para la síntesis de ácido L-ascórbico en la planta modelo. La proteína GGP2 (c19672_g1_i1) de mango es 77% idéntica a la codificada por *VTC2*, mientras que la GGP1 (c8973_g1_i2) es 32% idéntica a la proteína codificada por *VTC2* y *VTC5* de *Arabidopsis*.

Por otra parte, se identificó la secuencia del transcrito para la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) citosólica, perteneciente a la ruta de reciclaje del ácido L-ascórbico, junto con otros 3 transcritos que codifican para esta enzima (datos no reportados). El cDNA de *MiMDHAR* es de 1750 pb y la región codificante es de 1305 pb que se traduce a una proteína de 434 aminoácidos.

Los cuatro transcritos evaluados en este trabajo se compararon al genoma de mango cv. Tommy Atkins (Dr. David Kuhn, comunicación personal) corroborando que se encuentran codificados en el genoma del mango. De cada una de las secuencias, se identificaron las regiones no traducidas 5'UTR y 3'UTR y la región codificante. El gen *GME* (Manin02g006480.1) fue 88% idéntico con el transcrito *MiGME* (c13795_g1_i1), contiene 6 exones y se encontró en el cromosoma 2. El gen de *GGPI* se identificó como Manin18g010880.1 el cual fue 100% idéntico a *MiGGPI* (c8973_g1_i2), contiene 7 exones y está localizado en el cromosoma 18. El gen de *GGP2* (Manin19g015510.1) fue 99% idéntico a *MiGGP2* (c19672_g1_i1), contiene 7 exones y está localizado en el cromosoma 19. Finalmente, el gen de *MiMDHAR* (Manin19g00500.1) es 99% idéntico al transcrito *MiMDHAR* (c19463_g1_i1), contiene 10 exones y fue localizado en el cromosoma 19.

Para el análisis comparativo se utilizaron las secuencias aminoacídicas deducidas de cada uno de los transcritos, por medio del algoritmo BLASTp (NCBI). Los resultados muestran que las enzimas de síntesis de ácido L-ascórbico tienen relativamente una alta identidad con proteínas encontradas en otros frutos como naranja (*Citrus sinensis*), cacao (*Theobroma cacao*) y durián (*Durio zibethinus*). Por otro lado, la MDHAR mostró una alta identidad a una proteína perteneciente a la familia de las monodehidroascorbato reductasas del álamo *Populus trichocarpa* (Tabla 2).

Tabla 2. **Comparación de los transcritos de genes de síntesis y reciclaje del ácido L-ascórbico de mango cv. Ataulfo.** Secuencias aminoacídicas con el mayor porcentaje de identidad encontrados en la base de datos del NCBI por medio del algoritmo BLASTp. Los transcritos del mango cv. Ataulfo fueron anotados de acuerdo con el resultado y se presenta la longitud en aminoácidos (aa) de cada uno de ellos.

<i>Enzima</i>	<i>Clave en el transcriptoma</i>	<i>Similitud</i>	<i>Identidad (%)</i>
<i>MiGME</i> (376 aa)	c13795_g1_i1	GDP-manosa 3,5-epimerasa 2 [<i>Durio zibethinus</i>] (376 aa)	98
<i>MiGGP1</i> (370 aa)	c8973_g1_i2	GDP-L-galactosa fosforilasa 1 [<i>Citrus sinensis</i>] (358 aa)	60
<i>MiGGP2</i> (446 aa)	c19672_g1_i1	GDP-L-galactosa fosforilasa 2 [<i>Theobroma cacao</i>] (446 aa)	82
<i>MiMDHAR</i> (434 aa)	c19463_g1_i1	Monodehidroascorbato reductasa [<i>Populus trichocarpa</i>] (434 aa)	89

En la secuencia aminoacídica de MiGME (Figura 7), se encontró un motivo particular para esta proteína: GAGGFIA y el par ácido/base (C145 y K217) necesario para realizar la epimerización (Major et al., 2005). Este motivo es una modificación del motivo GXXGXXG de enzimas pertenecientes a la familia extendida de las deshidratasa/reductasa de cadena corta (en inglés, extended short-chain dehydratase/reductase family, o SDR), el cual hace posible la unión del cofactor de NAD(P)H/NAD(P)⁺ a la proteína (Persson et al., 2003).

El alineamiento múltiple de MiGGP1 se muestra en la figura 8, en esta enzima no se encontró un motivo específico al realizar el análisis BLAST. Sin embargo, MiGGP1 comparte la misma función putativa que MiGGP2.

En el caso de MiGGP2 (Figura 9), se encontró el motivo HIT (triada de Histidinas), el cual se encuentra en proteínas tipo HIT (HxHxHxx, “x” indicando un residuo hidrofóbico). Las proteínas que contienen este motivo tienen la capacidad de actuar sobre el α -fosfato de los ribonucleótidos como el guanosil difosfato (GDP) (Brenner, 2002). Sin embargo, en las GGP el motivo es ligeramente distinto (HLHFQAY), cambiando la tercera histidina por una glutamina. Eso clasifica a las GGPs en una enzima de la superfamilia HIT, cuya función fue caracterizada por Linster y colaboradores en el 2007 y probada experimentalmente (Linster et al., 2008).

El estudio estructural de la MDHAR de *O. sativa* realizado por Park y colaboradores en el 2016, reveló los residuos necesarios para la función de esta proteína. En la Figura 10 se muestra el alineamiento de MDHAR pertenecientes a distintas especies vegetales, resaltando cada uno de estos residuos. Estos residuos son la R320 (ligación al sustrato) y Y349 (transferencia de electrones de NAD(P)H por medio de FAD), los cuales se resaltan en rojo. Las MDHAR también presentan un bucle único que permite formar el bolsillo del sitio catalítico (marcado con azul). Sin embargo, este bucle único no se encontró en la secuencia de MDHAR de *A. thaliana*.

<i>C. sinensis</i>	1	-----MVTIKQLEHTKSLTKSATPEQLKCSFLCFQGV	TLNYCLGNQSFDDNTSFVEPSGVP-EDLSLL	LAALLA	QWE																													
<i>C. clementina</i>	1	-----MVTIKQLEHTKSLTKSATPEQLKCSFLCFQGV	TLNYCLGNQSFDDNTSFVEPSGVP-EDLSLL	LAALLA	QWE																													
<i>M. indica</i>	1	-----MTTIKQFQHNRIPLKSAATEDLKS---	FQGV	TPTYNLGTQSLVEKASSGGLLSNPEEHSIL	NLNL	LAQWE																												
<i>M. esculenta</i>	1	-----MVTAKPLADTNMLLKCAT-EQLGCPFCFSQGI	KIPVYCFGTQYLI	DNSLFGGVSHTSDEEQSL	LSL	LAQWE																												
<i>H. brasiliensis</i>	1	-----MVTVKPLADNLLRCAT-EQLGCPFCFSQGI	KIPVYCFGTQYLI	NNGLFGGISNTSEEHSL	LSL	LAQWE																												
<i>Q. suber</i>	1	-----MVTVKQVEDDNLVSKGAPEQLKCFRCFRDI	RIPLYRFSSQSL	DDSPPEGHVCIT	EDQSAL	LSL	LAQWE																											
<i>A. thaliana</i>	1	MLKIKRVP	TVVSNYQKDDGAEDPVGCGRNCLGACCLNGAR	LPL	ACKN-LVKS	GEKLVISHEAIE	PPVAL	LSL	LAQWE																									
<i>C. sinensis</i>	73	ERMW	GCFRYDVTASEIKV	ISGGKFLAQLNEK-----	WIMDPFILNSIDQ-NEEL	LCVTRS	KANSE																											
<i>C. clementina</i>	73	ERMW	GCFRYDVTASEIKV	ISGGKFLAQLNEK-----	WIMDPFILNSIDQ-NEEL	LCVTRS	KANSE																											
<i>M. indica</i>	70	ERMW	GYFRYDVTASEIKV	ISGRENFPAQLNEERSMNIL-SKT	EDSKVCHQRDSFLSHRINH-PEEL	LCVASS	NMNSQ																											
<i>M. esculenta</i>	73	ERMW	GHFEYDVTASEIKV	IRGRKFLAQLNSDGGIDCL-QDP	DHKMCHQKDLPVFDQTKH-CEEL	LCITNS	KADSE																											
<i>H. brasiliensis</i>	73	ERML	GHFYDVTASEIKV	IRGRKFLAQLNNDWGMDCF-KDPE	KLMCHCEDTPVFDRTKH-CEEL	LCITNS	KADSE																											
<i>Q. suber</i>	74	DKMW	GILLRYDVTASEIKV	IRGRKFLAQLNE	RLGMDYV-PKPE	PKICGQGNLSEFQRTKH-CEEL	LYVASS	MAIPE																										
<i>A. thaliana</i>	80	DRFQ	GCLFRYDVTASEIKV	IRGKYGFVAQLNEGRHLK	KRPTFRVDKVLQSF	DGSKFNFTKVGCEEL	LQFEAG	DAQVO																										
<i>C. sinensis</i>	136	LIPSA	AVP--NDSI	LVIINANPIEYGHV	FVPCGSNRLY--PDARS	FEMIVRI	AFAEINNYS	FRIFY--DCSS	PGASHVYF																									
<i>C. clementina</i>	136	LIPSA	AVP--NDSI	LVIINANPIEYGHV	FVPCGSNRLY--PDARS	FEMIVRI	AFAEINNYS	FRIFY--DCSS	PGASHVYF																									
<i>M. indica</i>	148	FIPLA	AVP--NGAI	LILANATPIEYGHV	FVYPGSRLY--LDSTYLE	MLRFTA	EINNHS	FRIFY--DCSS	SAGASHMYF																									
<i>M. esculenta</i>	151	LIPSA	AVP--NGAI	LIVINVNPIEYGHV	FVPHGFDRLYQVVDARYL	VVVFVA	EINNES	FRIFY--NWP	--RHSHLYF																									
<i>H. brasiliensis</i>	151	LIPSA	AVP--NDAI	LIVINVNPIEYGHV	FVPHGFDSLYRFLDARFLE	VARVAV	EMNNS	FRIFY--NCP	--GHSSLHF																									
<i>Q. suber</i>	152	LVPAA	AVP--DGAV	LIIINEIPVEYGHV	FVPCGSDSLAQVLDTKSLE	VARFAV	EINNES	FRIFY--DCPT	AGTSHRYF																									
<i>A. thaliana</i>	160	FFPCMP	DPENS	SPVAIIVSPEYGHV	LIPRVLDCLPQRI	DHKSLL	LAVHMAA	BAANPYFR	IGNSLGAFATINHLHF																									
<i>C. sinensis</i>	210	QACYFPDHL	PELMPID	FFSDGQRG	YIISTLIDYPIK	TILFEY	TNNRIIM	MEAL	SEICSS	REKNI	SYNLI	ISDCGR																						
<i>C. clementina</i>	210	QACYFPDHL	PELMPID	FFSDGQRG	YIISTLIDYPIK	TILFEY	TNNRIIM	MEAL	SEICSS	REKNI	SYNLI	ISDCGR																						
<i>M. indica</i>	222	QACYFPNHL	PEHLPV	DTFFSDEQGG	CIGTVIDYPIK	TILFQHD	CN-VKIM	VEAL	SEICSY	WEKNI	PHNLI	ISDLGK																						
<i>M. esculenta</i>	225	QACYFPDLL	PEHMPV	DILFDAGQKG	QISTVIDYPIK	TILFES	NCN-IRM	VEIV	SETRYL	LDKEI	PYNLM	ISDCGK																						
<i>H. brasiliensis</i>	225	QACYFPDLL	PEHMPV	DILFDAGQGG	HIPTVIDYPIK	TILFES	NWN-FKI	VEIV	AETCS	CLDKI	QYNLM	ISDCGK																						
<i>Q. suber</i>	228	EACYFPSP	PELTPV	DTFFHEGRG	RISAVT	DEPIK	TILFES	KKK-FKR	VEIV	VEIC	COEKN	IPYNLI	ISDCGK																					
<i>A. thaliana</i>	240	QAYFLAM	FPPEK	APT	TKIT	TVS-GV	KISEL	SYPI	VRSIL	FE	GGSS-MQEL	SETV	SECCV	QONNI	IPFNLI	ISDCGQ																		
<i>C. sinensis</i>	290	IFLFLOK	-----	SAISG--NLL	AWECCGYFLFGSKY	FFDQV	TEA	IHKRL	SAVSN	DNDE	GFQV	VVKQLCCS	IASK																					
<i>C. clementina</i>	290	IFLFLOK	-----	SAISG--NLL	AWECCGYFLFGSKY	FFDQV	TEA	IHKRL	SAVSN	DNDE	GFQV	VVKQLCCS	IASK																					
<i>M. indica</i>	301	IFLFQOK	-----	PTASV--NLS	AWECCGYFLFRSKY	FEENQV	TEA	LLKYLS	SAVSN	DNNE	FE	AVKLCGS	SIAG																					
<i>M. esculenta</i>	304	VFLFOA	-----	QTLSS	SNLSAWECCGYFLFKSR	QEEVEV	TEA	LLKRL	STVSL	DDDE	GFATV	KQFC	TMASK																					
<i>H. brasiliensis</i>	304	FFLFOA	-----	QTLST	SNLSAWECCGYFLFRSR	QEEDEV	TEA	LLKRL	STVSL	DDDE	GF	AAV	KGLCCRI	ATK																				
<i>Q. suber</i>	307	IFLFLOK	-----	QNMANS	GTLSAWECCGYFLFQSR	SEFDQA	TEA	TLN	KRL	RDVSL	DDDE	GFQV	VVKELCCS	IADK																				
<i>A. thaliana</i>	318	IFLMFO	CYAEKQAL	GEVSP	EVLETQVNP	AVWEISGHM	VLRK	EDYEG	SEDNA	WRLLAEASL	SEER	FE	KVTAL	AFAE	IGC																			
<i>C. sinensis</i>	356	LAV	-----																															
<i>C. clementina</i>	356	LAV	-----																															
<i>M. indica</i>	367	KLAI	-----																															
<i>M. esculenta</i>	372	IVF	-----																															
<i>H. brasiliensis</i>	372	IAT	-----																															
<i>Q. suber</i>	375	FAA	-----																															
<i>A. thaliana</i>	398	SNQE	E	LE	G	T	I	V	H	Q	N	S	G	N	V	N	Q	S	N	R	T	H	G	P	I	T	G	A	E	C	L	V	L	Q

Figura 8. Alineamiento múltiple de la secuencias aminoacídicas de GPI con la secuencia deducida de *MiGGPI* (*M. indica*) obtenida a partir del transcriptoma del mango cv. Ataulfo (PRJNA286253). El alineamiento se realizó contra cinco secuencias aminoacídicas con mayor similitud encontradas del análisis comparativo en la base de datos del NCBI : *Citrus sinensis* (XP_006468321.1), *Citrus clementina* (XP_006448886.1), *Manihot esculenta* (XP_021592431.1), *Hevea brasiliensis* (XP_021657801.1), *Quercus suber* (XP_023894161.1) y *Arabidopsis thaliana* (AEE85260.1). En negro se indican los residuos idénticos y en gris los residuos con la misma naturaleza química.

<i>H. brasiliensis</i>	1	MSESLMLRIKRVPTVSNQKFBAEIGARRSGCGNCLQKCCIQGAKLPLYAFKKIINKIVSEKEVLGNINNEPPVAFLD
<i>M. esculenta</i>	1	MSDNLMLRIKRVPTVSNQKFBAEIGARRSGCGNCLRKCCIQGAKLPLYAFKKIINKIVCEKEVRGQINNEPPVAFLD
<i>T. cacao</i>	1	----MMLRIKRVPTVSNQKFBAEITARRSGCGNCLRSCCIEGAKLPLYAFKKVINTQSEKGVGRGNINKEPPVAFLD
<i>D. zibethinus</i>	1	----MMLRIKRVPTVSNQKFBSEITARRSGCGNCLRSCCIEGATLPLYAFKKVNNIESEKDVLDGINKEPPVAFLD
<i>M. indica</i>	1	----MLRIKRVPTVSNQKFBAEIGARRRGCGNCLNKCCIEGANLPLYLKKSKTETAKVVLEKINSEPPVAFLD
<i>A. chinensis</i>	1	----MLRIKRVPTVSNQKFBADIGARRSGCGNCLQKCCIQGAKLPLYAFKRVNEVVGEKGVLLALDNEEPPVAFLD
<i>A. thaliana</i>	1	----MLLRIKRVPTVSNQKFBETV----EGCGNCLSKCCINGARLPLYTCKNIDKSVG-----INTESEPVTFLE
<i>H. brasiliensis</i>	81	SLLLGEWEDRMORGLFRYDVTACETKVIIPGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQPFDFGNKFNFTKVGQEEVLFQFE
<i>M. esculenta</i>	81	SLLLGEWEDRMORGLFRYDVTACETKVIIPGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQPFDFGNKFNFTKVGQEEVLFQFE
<i>T. cacao</i>	77	SLVIGEWEDRMORGLFRYDVTACETKVIIPGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQPFDFGNKFNFTKVGQEEVLFQFA
<i>D. zibethinus</i>	77	SLVIGEWEDRMORGLFRYDVTACETKVIIPGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQPFDFGNKFNFTKVGQEEVLFQFE
<i>M. indica</i>	76	SLLLGEWEDRMORGLFRYDVTACETKVIIPGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQPFDFGNKFNFTKVGQEEVLFQFE
<i>A. chinensis</i>	76	SLLLGEWEDRMORGLFRYDVTACETKVIIPGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQPFDFGSKFNFTKVGQEEVLFQFE
<i>A. thaliana</i>	66	SLVIGEWEDRMORGLFRYDVTACETKVIIPGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQPFDFGNKFNFTKVGQEEVLFQFE
<i>H. brasiliensis</i>	161	SSE---DGEVQFFPNAPIDVENSPSVVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALMAAEAGNPVFRLGYNLSL
<i>M. esculenta</i>	161	SSE---DGEVQFFPNAPIDVENSPSVVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALMAAEAGNPVFRLGYNLSL
<i>T. cacao</i>	157	ASE---DGEVQFFPNAPIDVENSPSVVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALMAAEAGNPVFRLGYNLSL
<i>D. zibethinus</i>	157	ESE---DGEVQFFPNAPIDVENSPSVVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALMAAEAGNPVFRLGYNLSL
<i>M. indica</i>	156	ASQ---DGEVQFFPNAPIDVENSPSVVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALMAAEAGNPVFRLGYNLSL
<i>A. chinensis</i>	156	ASN---DNEVQFFPNAPIDVENSPSVVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALMAAEAGNPVFRLGYNLSL
<i>A. thaliana</i>	146	ASTNDDSEIQFLASMPIDALNPSVVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALMAAEAGNPVFRLGYNLSL
<i>H. brasiliensis</i>	238	GAFATINHLHFQAYYLAIFPPEKAPTRKKTLLDSGVKITYELMNYPVRGLVEGGNTIQDLSNTVSDACTSLQDNNIPVN
<i>M. esculenta</i>	238	GAFATINHLHFQAYYLAIFPPEKAPTRKKTLLDSGVKITYELMNYPVRGLVEGGNTIQDLSNTVSDACTSLQDNNIPVN
<i>T. cacao</i>	234	GAFATINHLHFQAYYLAIFPPEKAPTRKKTLLDSGVITISELKYVVRGLVEGGNTIQDLSNTVSDACTSLQDNNIPVN
<i>D. zibethinus</i>	234	GAFATINHLHFQAYYLAIFPPEKAPTRKKTLLKDGVTISELKYVVRGLVEGGNTIQDLSNTVSDACTSLQDNNIPVN
<i>M. indica</i>	233	GAFATINHLHFQAYYLAIFPPEKAPTRKKTLLMDNGVITISELKYVVRGLVEGGNTIQDLSNTVSDACTSLQDNNIPVN
<i>A. chinensis</i>	233	GAFATINHLHFQAYYLAIFPPEKAPTRKKTLLNGGVKITISELKYVVRGLVEGGNTIQDLSNAVSDSSVCLQDNNIPVN
<i>A. thaliana</i>	226	GAFATINHLHFQAYYLAIFPPEKASSKKTLLTNNGVKITSKLNYPVRGLVEGGNTIQDLADTVSDASVCLQDNNIPVN
<i>H. brasiliensis</i>	318	VLISDCGKRIFLLPQCYAEKQALGEVSEPELLDTQVNPVAVESGHMVLKRRKDYEASENAWRLLAEVSLSEREREVVK
<i>M. esculenta</i>	318	VLISDCGKRIFLLPQCYAEKQALGEVSEPELLDTQVNPVAVESGHMVLKRRKDYEASENAWRLLAEVSLSEREREVVK
<i>T. cacao</i>	314	VLISDCGKRIFLLPQCYAEKQALGEVSEPELLDTQVNPVAVESGHMVLKRRKDYEASENAWRLLAEVSLSEREREVVK
<i>D. zibethinus</i>	314	VLISDCGKRIFLLPQCYAEKQALGEVSEPELLDTQVNPVAVESGHMVLKRRKDYEASENAWRLLAEVSLSEREREVVK
<i>M. indica</i>	313	VLISDCGKRIFLLPQCYAEKQALGEVSEPELLDTQVNPVAVESGHMVLKRRKDYEASENAWRLLAEVSLSEREREVVK
<i>A. chinensis</i>	313	VLISDCGKRIFLLPQCYAEKQALGEVSEPELLDTQVNPVAVESGHMVLKRRKDYEASGNAWRLLAEVSLSEREREVVK
<i>A. thaliana</i>	306	VLISDCGKRIFLLPQCYAEKQALGEVSEPELLDTQVNPVAVESGHMVLKRRKDYEASKEAWRLLAEVSLSEREREVVK
<i>H. brasiliensis</i>	398	AIFWATISCRDKGSENDQDLEDANANNSL-EEVDAIN-KGSHCAMVSGNQECLVRQ
<i>M. esculenta</i>	398	AIFWATISCSN-GTENDGQDLEDPNDNKSL-EEVDAAINKGSHCAMVSGTHECLVQQ
<i>T. cacao</i>	394	AIFWATAIGETIAETLLDE--PDKTQS---LEIENAITKSSHREPMVAGTHECLVLQ
<i>D. zibethinus</i>	394	AIFWATIASGEDGIENVPELEPDRSQS---LEKENDITKSSHQAMVSGTQECLVLQ
<i>M. indica</i>	393	AIFWATISCGDIVNGNVAENLLEAGVKQAL-EEVNNVNPSSCCTFVPGTQECL---
<i>A. chinensis</i>	393	AIFWATISCADDGSGSTAENLLEPDDNPQSREANDALNKGSHCGMVPKGQECLVQH
<i>A. thaliana</i>	386	TIIFWATIGFSSHEEEEELEEQNSMNGGSTIVHCPSVKEEAVSN-----

Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencias aminoácidas de GGP2 con la secuencia deducida de *MiGGP2* (*M. indica*) obtenida a partir del transcriptoma del mango cv. Ataulfo (PRJNA286253). El alineamiento se realizó contra cinco secuencias aminoácidas con mayor similitud encontradas del análisis comparativo en la base de datos del NCBI : *Hevea brasiliensis* (XP_021687565.1), *Manihot esculenta* (XP_021607113.1), *Theobroma cacao* (XP_007020730.1), *Durio zibethinus* (XP_022716861.1), *Actinida chinesis* var. chinesis (PSR85311.1) y *Arabidopsis thaliana* (AED96583.1). En azul se indica el motivo HIT, en negro se indican los residuos idénticos y en gris los residuos con la misma naturaleza química.

<i>C. sinensis</i>	1	MAEKSFKYVI	GGGVSAGYAAREFA	KQGVKPGELAI	ISKEAVAPYERPALSKAYLF	PEGTARLPGFHVCVGGGERLLP
<i>C. clementina</i>	1	MAEKSFKYVI	GGGVSAGYAAREFA	KQGVKPGELAI	ISKEAVAPYERPALSKAYLF	PEGTARLPGFHVCVGGGERLLP
<i>P. trichocarpa</i>	1	MAEKSFKYVI	GGGVSAGYAAREFA	KQGVKPGELAI	ISKEAVAPYERPALSKAYLF	PEGTARLPGFHVCVGGGERLLP
<i>P. alba</i> <i>P. glan</i>	1	MAEKSFKYVI	GGGVSAGYAAREFA	KQGVKPGELAI	ISKEAVAPYERPALSKAYLF	PEGTARLPGFHVCVGGGERLLP
<i>V. vinifera</i>	1	MAEKSFKYVI	GGGVSAGYAAREFA	KQGVKPGELAI	ISKEAVAPYERPALSKAYLF	PEGTARLPGFHVCVGGGERLLP
<i>M. indica</i>	1	MAELLFKYVI	GGGVAAGYAAREFA	KQGVNPGELAI	ISKEAVAPYERPALSKAYLF	PEGTARLPGFHVCVGGGERLLP
<i>A. thaliana</i>	1	MAEKSFKYVI	GGGVAAGYAAREFA	SNQGLKPGELAI	ISKEAVAPYERPALSKAYLF	PEGTARLPGFHVCVGGGERLLP
<i>C. sinensis</i>	80	EWYKEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKTLLSATGLIF	FKYQILVIATGSTV	RLTDFGVEGADAKNI
<i>C. clementina</i>	80	EWYKEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKTLLSATGLIF	FKYQILVIATGSTV	RLTDFGVEGADAKNI
<i>P. trichocarpa</i>	80	EWYKEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKTLLSATGLIF	FKYQILVIATGSTV	RLTDFGVEGADAKNI
<i>P. alba</i> <i>P. glan</i>	80	EWYKEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKTLLSATGLIF	FKYQILVIATGSTV	RLTDFGVEGADAKNI
<i>V. vinifera</i>	80	EWYKEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKTLLSATGLIF	FKYQILVIATGSTV	RLTDFGVEGADAKNI
<i>M. indica</i>	80	EWYKEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKTLLSATGLIF	FKYQILVIATGSTV	RLTDFGVEGADAKNI
<i>A. thaliana</i>	81	NWYKEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKTLLSATGLIF	FKYQILVIATGSTV	RLTDFGVEGADAKNI
<i>C. sinensis</i>	160	AKKN-GKAV	IVGGGYIGLELSAAL	INNDVIMVY	PEPWCMPRLFTAG	IAAFYEGGYANKG
<i>C. clementina</i>	160	AKKN-GKAV	IVGGGYIGLELSAAL	INNDVIMVY	PEPWCMPRLFTAG	IAAFYEGGYANKG
<i>P. trichocarpa</i>	160	GKKN-GKAV	IVGGGYIGLELSAAL	INNDVIMVY	PEPWCMPRLFTAG	IAAFYEGGYANKG
<i>P. alba</i> <i>P. glan</i>	160	GKKN-GKAV	IVGGGYIGLELSAAL	INNDVIMVY	PEPWCMPRLFTAG	IAAFYEGGYANKG
<i>V. vinifera</i>	160	AKKN-GKAV	IVGGGYIGLELSAAL	INNDVIMVY	PEPWCMPRLFTAG	IAAFYEGGYANKG
<i>M. indica</i>	160	TKKN-GKAV	IVGGGYIGLELSAAL	INNDVIMVY	PEPWCMPRLFTAG	IAAFYEGGYANKG
<i>A. thaliana</i>	161	LYVGRGKAVI	IVGGGYIGLELSAAL	INNDVIMVY	PEPWLHREFTAG	IAAFYEGGYANKG
<i>C. sinensis</i>	239	VKEVKLKDGRV	LEADIVVVG	VGGRRPLISL	LFKQGFENKGGI	TDFFKTS
<i>C. clementina</i>	239	VKEVKLKDGRV	LEADIVVVG	VGGRRPLISL	LFKQGFENKGGI	TDFFKTS
<i>P. trichocarpa</i>	239	VKEVKLKDGRV	LEADIVVVG	VGGRRPLISL	LFKQGFENKGGI	TDFFKTS
<i>P. alba</i> <i>P. glan</i>	239	VKEVKLKDGRV	LEADIVVVG	VGGRRPLISL	LFKQGFENKGGI	TDFFKTS
<i>V. vinifera</i>	239	VKEVKLKDGRV	LEADIVVVG	VGGRRPLISL	LFKQGFENKGGI	TDFFKTS
<i>M. indica</i>	239	VKEVKLKDGRV	LEADIVVVG	VGGRRPLISL	LFKQGFENKGGI	TDFFKTS
<i>A. thaliana</i>	241	VTEVKLE	DGRVLEADIVV	VAGVGRPLISL	LFKQGFENKGGI	TDFFKTS
<i>C. sinensis</i>	319	RKSAEQAVKTI	MATEGGKTV	TCYDYLPLF	YSRAFDLSWQFY	GDNVGDI
<i>C. clementina</i>	319	RKSAEQAVKTI	MATEGGKTV	TCYDYLPLF	YSRAFDLSWQFY	GDNVGDI
<i>P. trichocarpa</i>	319	RKSAEQAVKAIK	SEEGKTV	TDYDYLPLF	YSRFDSWQFY	GDNVGDI
<i>P. alba</i> <i>P. glan</i>	319	RKSAEQAVKAIK	SEEGKTV	TDYDYLPLF	YSRFDSWQFY	GDNVGDI
<i>V. vinifera</i>	319	RKSAEQAVKAIK	SEEGKTV	TDYDYLPLF	YSRFDSWQFY	GDNVGDI
<i>M. indica</i>	319	RKSAEQAVKAIK	SEEGKTV	TDYDYLPLF	YSRFDSWQFY	GDNVGDI
<i>A. thaliana</i>	321	RKSAAQAVKAIK	SEEGKTV	TDYDYLPLF	YSRFDSWQFY	GDNVGDI
<i>C. sinensis</i>	399	GTPEENKAI	AKVARQPSVES	LDVLEKEGLSF	ACKI-----	
<i>C. clementina</i>	399	GTPEENKAI	AKVARQPSVES	LDVLEKEGLSF	ACKI-----	
<i>P. trichocarpa</i>	399	GTPDENKAI	AKVARQPPVEN	LDVLEKEGLSF	ACKI-----	
<i>P. alba</i> <i>P. glan</i>	399	GTPDENKAI	AKVARQPPVEN	LDVLEKEGLSF	ACKI-----	
<i>V. vinifera</i>	399	GTPEENKAI	AKVARQPAVEN	LDVLEKEGLSF	ACKI-----	
<i>M. indica</i>	399	GTPEENKAI	AKVARQPPV	LDVLEKEGLSF	ACKI-----	
<i>A. thaliana</i>	401	GTPEENKAI	AKVARQPSVES	LDVLEKEGLSF	ACKIFYSTSL	

Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencias aminoacídicas de MDHAR con la secuencia deducida de *MiMDHAR* (*M. indica*) obtenida a partir del transcriptoma del mango cv. Ataulfo (PRJNA286253). El alineamiento se realizó contra cinco secuencias aminoacídicas con mayor similitud encontradas del análisis comparativo en la base de datos del NCBI : *Citrus sinensis* (XP_006481820.1), *Citrus clementina* (XP_006430261.1), *Populus trichocarpa* (XP_006381300.1), *Populus alba* X *Populus glandulosa* (AGV08302.1), *Vitis vinifera* (XP_010653731.1) y *Arabidopsis thaliana* (AEE74838.1). En azul se indica el bucle único de MDHAR, en rojo los residuos R320 y Y349 en negro se indican los residuos idénticos y en gris los residuos con la misma naturaleza química .

6.3 Análisis de Expresión de Genes de *MiGME*, *MiGGP1*, *MiGGP2* y *MiMDHAR*

6.3.1 Análisis del ARN Total de la Pulpa de Mango cv. Ataulfo

La figura 11 muestra el análisis de integridad del ARN total de la pulpa de mango utilizada para la síntesis de cDNAs. Se observan las bandas correspondientes al ARN ribosomal (28S y 18S) que corroboran que el ARN está íntegro después del proceso de extracción. El ARN se incubó con la enzima DNasa I (Roche) para digerir el posible DNA genómico contaminante, una vez purificado se utilizó para la síntesis de los cDNAs (datos no mostrados) a emplearse en las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR).

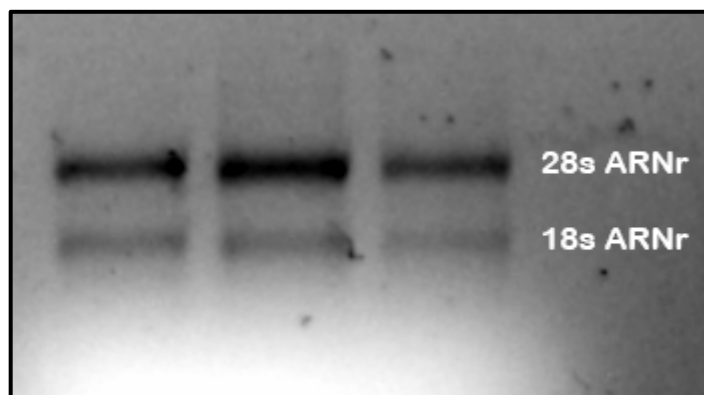


Figura 11. Análisis electroforético de muestras de ARN total extraídas de los frutos de mango cv. Ataulfo en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.

6.3.2 Expresión Relativa de Genes de Biosíntesis de Ácido L-Ascórbico: *MiGME*, *MiGGP1* y *MiGGP2* de Mango cv. Ataulfo Durante el Almacenamiento a 20°C

Los patrones de expresión de los genes de biosíntesis (*MiGME*, *MiGGP1*, y *MiGGP2*), fueron diferentes en los 3 genes evaluados. La acumulación de estos transcritos corrobora que la ruta de biosíntesis de Smirnoff-Wheeler se encuentra activa en el fruto del mango cv. Ataulfo. En Chile (*Capsicum annuum* L.), se ha reportado que la ruta principal de biosíntesis de ácido L-ascórbico también es la anteriormente mencionada (Gómez-García y Ochoa-Alejo, 2016). Por otro lado, se ha encontrado que la ruta del D-galactouronato predomina en frutos senescentes de uva y fresa debido a una acumulación del transcrito que codifica para la enzima D-galactouronato reductasa (Cruz-Rus et al., 2010; Cruz-Rus et al., 2011).

Los niveles de expresión del transcrito que codifica para la enzima GME se muestran en la figura 12, los cuáles presentaron niveles máximos en frutos almacenados por 9 días a 20°C. Al comparar los niveles de expresión en frutos del día 0 (justo después de aplicado el tratamiento hidrotérmico) y del día 1, se observó que *MiGME* aumentó 3 veces; y en los frutos almacenados por 5 y 9 días, se observó un incremento en la expresión de *MiGME* de 7 y 10 veces, respectivamente, con respecto al valor inicial. Es decir que conforme avanzó la maduración de mango durante el almacenamiento a 20°C hubo un aumento en la expresión de este gen de biosíntesis, lo cuál sugiere que durante la maduración postcosecha es importante mantener los niveles de ácido L-ascórbico en el fruto. En contraste con lo reportado en este trabajo, Jiang y colaboradores (2018), observaron que los niveles del transcrito de *GME* en kiwi (*Actinidia eriantha* Benth.) cv. White se mantuvieron constantes durante 9 días en almacenamiento a 20°C y posteriormente disminuyeron.

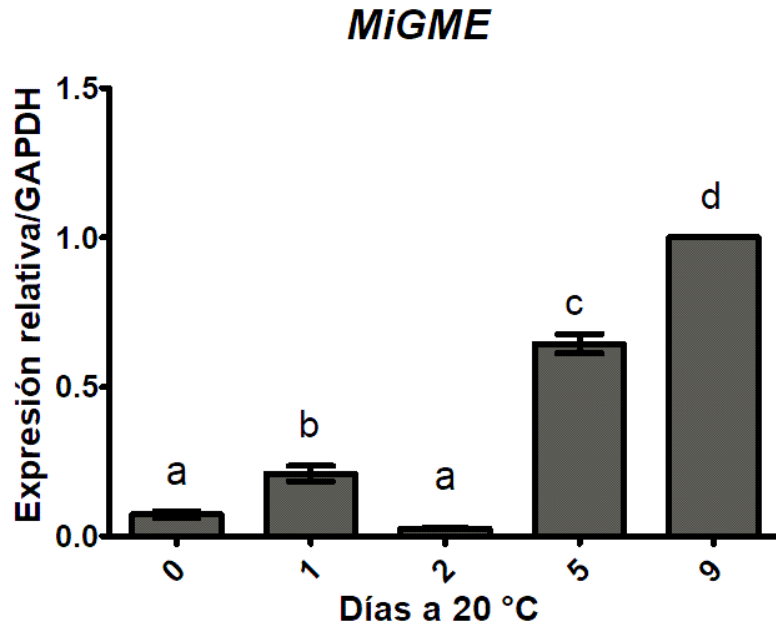


Figura 12. Expresión relativa de *MiGME* en pulpa de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión del gen durante el almacenamiento.

Por otro lado, en la figura 13 se presenta la expresión relativa de *MiGGPI*. En este trabajo, se identificaron dos transcritos que codifican para la proteína GGP y se detectaron patrones de expresión diferentes para estos genes durante el almacenamiento a 20°C. Los niveles de expresión de *MiGGPI* fueron significativamente menores ($p \leq 0.05$) en frutos almacenados por 0, 2 y 5 días a 20°C; mientras que valores significativamente mayores se encontraron en los frutos del día 1 y día 9; los niveles de expresión de *MiGGPI* fueron 6 y 14 veces más, respectivamente, que los encontrados en frutos del día 0. De manera similar que para *MiGME*, el gen *MiGGPI* tiene una tendencia a acumularse en frutos almacenados por 9 días a 20°C.

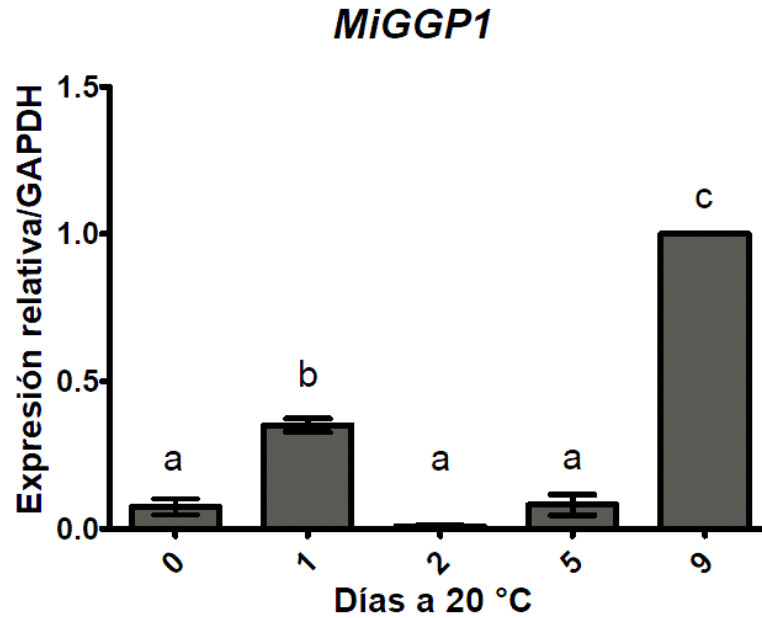


Figura 13. Expresión relativa de *MiGGP1* en pulpa de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión del gen durante el almacenamiento.

En la figura 14 se presenta la expresión relativa de *MiGGP2* puede observarse que los mayores niveles de expresión se dieron en frutos del día 0 y 1; mientras que los más bajos en el día 2. Este gen se expresó el doble en frutos del día 0 y 1, en comparación con frutos del día 9. En general, los niveles de expresión de *MiGGP2* fueron más altos que los de *MiGGP1* en los mangos almacenados a 20°C. En ciertas plantas, solamente uno de los genes que codifican para la proteína GGP, se expresa de manera mayoritaria durante la biosíntesis de ácido L-ascórbico. En *A. thaliana* se ha encontrado que la ausencia de uno de éstos genes (mutantes *vtc2* o *vtc5*) provoca que el otro gen ortólogo cubra la función del gen mutante nulo (Dowdle et al., 2007). En el caso del mango se encontró que ambos genes se expresan, aunque uno de ellos en niveles más altos que el otro. El gen que codifica para GGP es un punto de regulación importante en la ruta de Smirnoff-Wheeler. Varios autores han mencionado que el aumento en la expresión de *GGP* se relaciona con un elevado contenido de ácido L-ascórbico en varios frutos (Bulley et al., 2009; Mellidou et al., 2012). Es por ello que a este gen se le ha

considerado uno de los pasos regulatorios principales para la biosíntesis de ácido L-ascórbico.

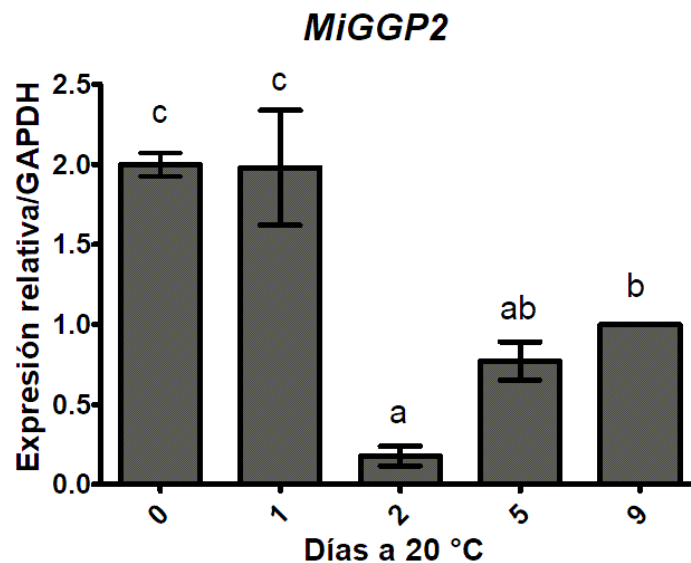


Figura 14. Expresión relativa de *MiGGP2* en pulpa de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión del gen durante el almacenamiento.

6.3.3 Expresión Relativa de Genes de Reciclaje de Ácido L-Ascórbico: *MiMDHAR* de Mango cv. Ataulfo Durante el Almacenamiento a 20°C

La expresión relativa de *MiMDHAR* se presenta en la figura 15, donde puede observarse que el nivel de expresión fue alto en frutos almacenados por 0 y 1 días a 20°C; posteriormente la expresión de este gen disminuyó en los frutos almacenados por 2 y 5 días, y en el día 9 alcanzó los niveles máximos (el doble con respecto al día 0). Se ha observado que durante la maduración ocurre un incremento progresivo del proceso de oxidación (Rogiers, 1998), lo cuál se relaciona con los requerimientos de la célula por el sistema antioxidante, al cual pertenece el ácido L-ascórbico. Los niveles de expresión observados para *MiMDHAR* sugiere que el sistema del reciclaje del ácido L-ascórbico está activo conforme los frutos llevan a cabo el proceso de maduración en postcosecha.

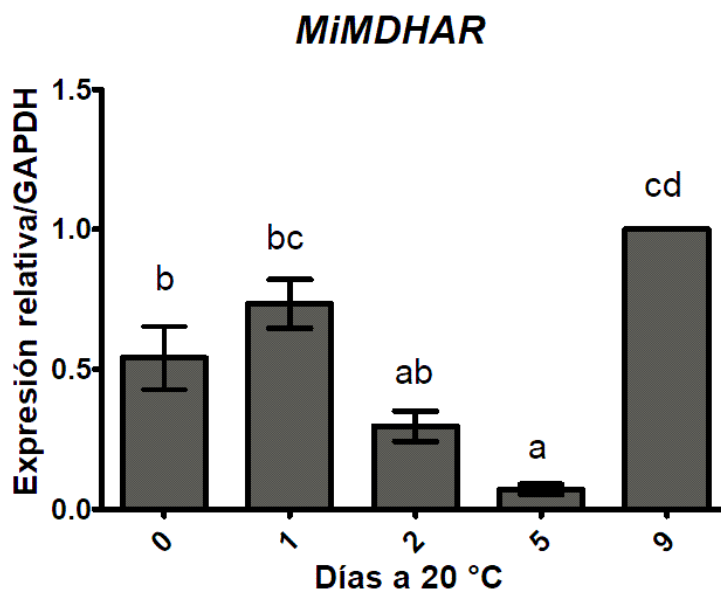


Figura 15. Expresión relativa de *MiMDHAR* en pulpa de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión del gen durante el almacenamiento.

Estudios realizados en diferentes frutos, donde evaluaron los niveles de expresión de genes de las enzimas de reciclaje, MDHAR y DHAR, y su relación con el contenido de ácido L-ascórbico han mostrado resultados variables. En estudios realizados en fresa y tomate, el contenido de ácido L-ascórbico se relacionó con una mayor expresión de MDHAR (Cruz-Rus et al., 2011; Stevens et al., 2008). En cambio, en frutos de castaña rosa (*Rosa roxburghii* Tratt) (Huang et al., 2014) y kiwi (*Actinidia eriantha* Benth.) cv. White se observó que DHAR se expresó en niveles más altos con respecto a MDHAR. En el estudio en kiwi, los autores sugieren que la DHAR contribuye más al reciclaje del ácido L-ascórbico (Jiang et al., 2018). En este trabajo se analizó la expresión de *MiMDHAR*, la cuál presentó un patrón de expresión similar a la MDHAR de kiwi, reportado por Jiang y colaboradores (2018). Es importante evaluar la expresión de la DHAR de mango y contrastarla con los niveles de expresión de *MiMDHAR* reportados en el presente trabajo.

El ácido L-ascórbico cumple ciertas funciones durante la maduración de los frutos climatéricos como el mango. Estos frutos sufren una variedad de cambios medidos por

el etileno, los cuales se presentan con un aumento de la tasa de biosíntesis, que precede a un pico en la tasa respiratoria, conocido como pico climatérico (Bouzayen et al., 2010). Este antioxidante participa, junto con el bicarbonato, como cofactor para activar la enzima ACC oxidasa (Dilley et al., 2012), la cual pertenece a la ruta de biosíntesis del etileno. Al acercarse al pico climatérico, la acumulación de etileno aumenta, y por ende, la necesidad de disponer de ácido L-ascórbico en la célula. Por otro lado, se ha observado que se pueden introducir intermediarios de la ruta primaria de biosíntesis de ácido L-ascórbico, gracias a la degradación de las pectinas de la pared celular (Mellidou et al., 2017), evidenciada por el ablandamiento de los frutos. Por lo anteriormente mencionado, se espera que los niveles de expresión de las enzimas de biosíntesis y reciclaje incrementen durante la maduración de los frutos para mantener la disponibilidad de este antioxidante.

De igual manera, el metabolismo acelerado de los frutos climatéricos resulta en una mayor tasa respiratoria. Esto se traduce en que la generación de las EROs ocurre de manera acentuada. En papaya (*Carica papaya* L.), hubo un incremento de la peroxidación de lípidos y actividad de la ascorbato peroxidasa durante la maduración (a 22°C), acompañada de un incremento de la actividad de enzimas como glutatión reductasa y catalasa justo después del pico climatérico de etileno y de respiración (Resende et al., 2012). De igual manera se encontró una acumulación de EROs y un incremento del estrés oxidativo durante la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (Mondal et al., 2009; Singh y Dwivedi, 2008). Por ello, el sistema antioxidante debe de estar presente para contrarrestar el efecto de esta acumulación de EROs, y se pudiera relacionar con la acumulación de transcritos *MiMDHAR* durante la maduración de mango cv. Ataulfo observada en este trabajo.

6.3.4 Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario Sobre la Expresión Relativa de los Genes de Biosíntesis de Ácido L-Ascórbico: *MiGME*, *MiGGP1* y *MiGGP2* en Mango cv. Ataulfo

En la figura 16 podemos observar que la expresión relativa de *MiGME* se vio reprimida justo después del tratamiento hidrotérmico (día 0), y posteriormente se estimuló en frutos almacenados por 1, 2, 5 y 9 días a 20°C. La inducción máxima de la expresión relativa de *MiGME* se dió en los frutos almacenados por 2 días a 20°C, donde los niveles fueron de 10 veces en los frutos sometidos al THC con respecto a los observados en los frutos testigo.

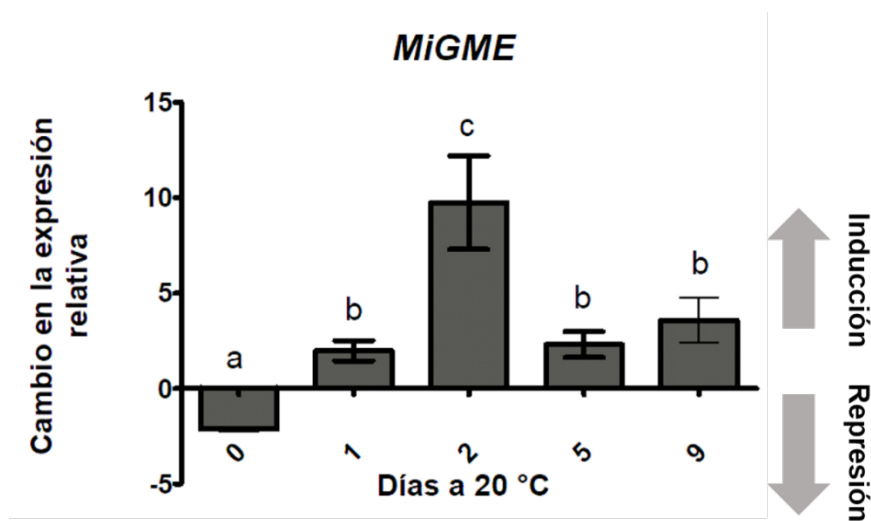


Figura 16. Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en la expresión relativa de *MiGME* de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión del gen durante el almacenamiento. Valores positivos indican una inducción o estimulación del gen, mientras que valores negativos indican una represión debido al THC.

La expresión relativa de *MiGGP1* (figura 17) se reprime en mangos almacenados por 0, 1, 5 y 9 días a 20°C y se induce solamente en frutos del día 2. Mientras que la expresión relativa de *MiGGP2* (figura 18) se reprime en frutos del día 0 y 1 y se induce en frutos del día 2, 5 y 9. El efecto negativo del THC es transitorio en el caso de *MiGGP2*, ya que

en frutos almacenados por 2, 5 y 9 días a 20°C, la expresión relativa se recuperó y se estimuló al doble. Como se había mencionado anteriormente, los patrones de expresión de ambos genes GGP son diferentes en condiciones normales (sin el estrés); y el efecto del THC sobre su expresión es diferente también. Un estudio previo, realizado en hojas de kiwi sometidas a un estrés por calor (42 °C), reportó una represión en la expresión del *AeGGP* a las 12 y 24 horas de exposición; sin embargo, este efecto fue transitorio ya que la expresión del gen se recuperó a las 48 horas (Li et al., 2013), similar al patrón presentado por *MiGGP2* en este estudio.

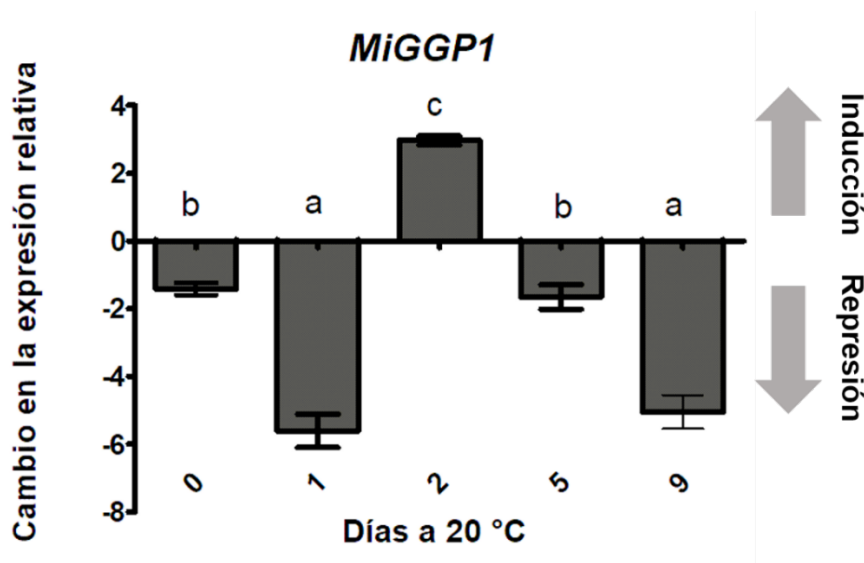


Figura 17. Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en la expresión relativa de *MiGGP1* de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión de cada gen durante el almacenamiento. Valores positivos indican una inducción o estimulación del gen, mientras que valores negativos indican una represión debido al THC.

Estos patrones de expresión apoyan la idea de que GME y GGP son puntos regulatorios de la síntesis de ácido L-ascórbico e influyen en el mantenimiento del contenido de ácido L-ascórbico en la célula. Se ha observado que al someter plantas de *A. thaliana* a una fuerte intensidad de luz ocasiona un aumento en el contenido de ácido L-ascórbico y se encontró que los genes de GME y GGP se estimularon de manera simultánea (Dowdle y colaboradores, 2007). En contraste a lo observado en este estudio, en plantas de té sometidas a un estrés por calor de 38°C por 24 horas, se observó una inducción de

los genes de biosíntesis de GME y GGP en las primeras horas del tratamiento y se mantuvo hasta el día 1 (Li et al., 2016). Lo anterior puede sugerir que estas enzimas son estimuladas debido a un estrés abiótico como las altas temperaturas.

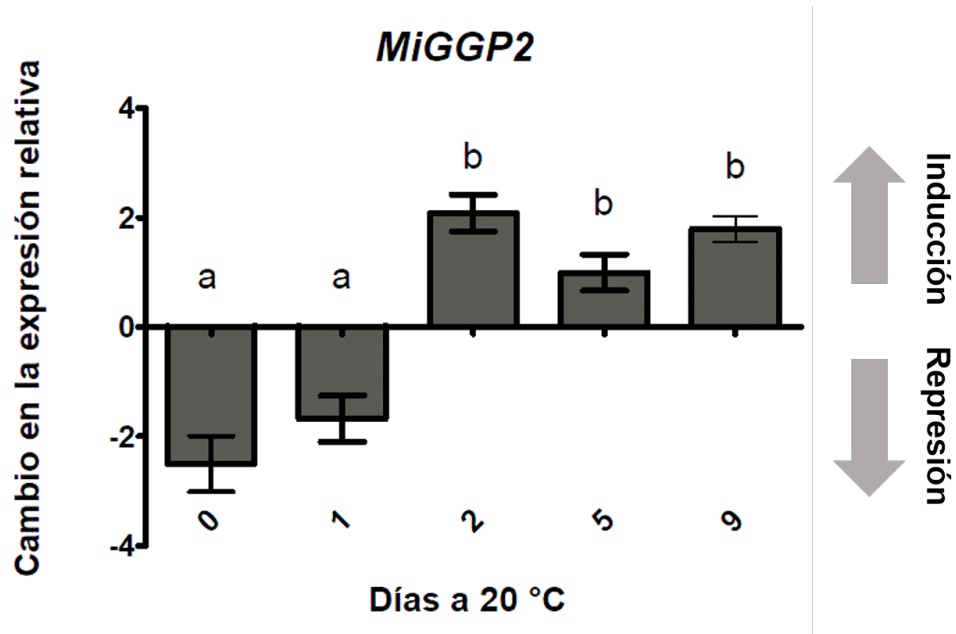


Figura 18. Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en la expresión relativa de *MiGGP2* de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión de cada gen durante el almacenamiento. Valores positivos indican una inducción o estimulación del gen, mientras que valores negativos indican una represión debido al THC.

6.3.5 Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario sobre la Expresión Relativa del Gen de Reciclaje de Ácido L-Ascórbico: *MiMDHAR* en Mango cv. Ataulfo

La expresión de *MiMDHAR* (Figura 19) se estimuló por el THC en frutos de todos los días de almacenamiento evaluados. El cambio en los niveles de expresión de *MiMDHAR* se mantuvo constante en todos los días ($p \leq 0.05$), excepto en frutos del día 5 donde se incrementó hasta 15 veces con respecto a los fruto testigo. Lo anterior sugiere que en respuesta al estrés casuado por el THC, la ruta de reciclaje permanece para mantener los niveles de ácido L-ascórbico que la célula necesita para contrarrestar los efectos del estrés por calor.

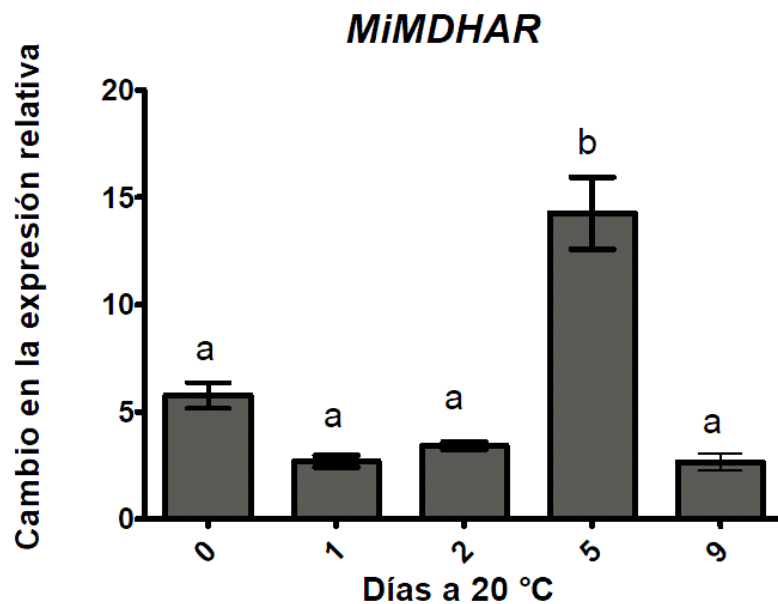


Figura 19. Efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) en los cambios en expresión relativa de *MiGME* de mango cv. Ataulfo durante el almacenamiento a 20°C. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de expresión de cada gen durante el almacenamiento. Valores positivos indican una inducción o estimulación del gen, mientras que valores negativos indican una represión debido al THC.

Es importante recordar que en condiciones de estrés abiótico, las células sufren cambios en su metabolismo, el cual genera un estrés que puede llevar a la acumulación de especies reactivas del oxígeno. Enzimas como la MDHAR y DHAR participan para reciclar el ácido L-ascórbico utilizado en estos procesos. Se ha observado que la actividad de la enzima MDHAR se ve inducida bajo el estrés causado por el daño por frío en tomate (Stevens et al., 2008) y en plantas de *Eleusine coracana* L. sometidas a un estrés por sequía (Bartwal y Arora, 2017). El gen de esta enzima se estimuló en plantas de té sometidas a un estrés por calor de 38°C por 24 horas (Li et al., 2016). Por otro lado, en plantas transgénicas de arroz, en las cuales se silenció un dominio principal de esta proteína, se observó que éstas plantas tuvieron deficiencias en su resistencia al estrés abiótico (Kim et al, 2017).

En este trabajo se observó la inducción de la expresión de *MiMDHAR* debido al efecto del tratamiento hidrotérmico, encontrando un aumento en sus niveles hasta de aproximadamente 15 veces más en comparación con los frutos testigo almacenados por 5 días a 20°C. Esta respuesta en mango ante estrés abiótico como el tratamiento hidrotérmico cuarentenario, permite que el contenido de ácido L-ascórbico se mantenga a pesar del estrés al que se someten los frutos de mango durante este tratamiento.

7. CONCLUSIONES

El tratamiento hidrotérmico cuarentenario provoca alteraciones en el ángulo de tono y luminosidad del color externo del fruto, observando un adelanto en el cambio de la coloración de verde a amarillo en la cáscara. Sin embargo, en este trabajo no se observó un efecto sobre las otras características físicas (firmeza, ángulo de tono, luminosidad y croma del color interno) del fruto debido al tratamiento hidrotérmico cuarentenario. En cuanto al contenido de ácido L-ascórbico en los frutos, en general se mantiene constante a lo largo del almacenamiento a 20°C; sin embargo, éste se ve reducido en un 12% debido al efecto tratamiento hidrotérmico aplicado. Por otro lado, el tratamiento hidrotérmico afectó la expresión de genes relacionados tanto de biosíntesis como de reciclaje del ácido L-ascórbico en los mangos. Los genes de biosíntesis *MiGME*, *MiGGP2* y el de reciclaje *MiMDHAR* fueron estimulados por el THC en diferente magnitud; mientras que el gen de biosíntesis *MiGGP1* se vio reprimido en la mayoría de los días de almacenamiento. Lo anterior refleja una regulación transcripcional en la expresión de los genes de biosíntesis (*MiGME*, *MiGGP1* y *MiGGP2*) y del gen de reciclaje (*MiMDHAR*) los cuáles responden de manera distinta al efecto del tratamiento hidrotérmico cuarentenario aplicado al mango cv. Ataulfo. Se encontró que a través del tiempo y ante este estrés abiótico, las rutas de biosíntesis y reciclaje del ácido L-ascórbico responden a nivel transcripcional para mantener el contenido de ácido L-ascórbico en la célula.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agius, F., Gonzalez-Lamothe, R., Caballero, J. L., Munoz-Blanco, J., Botella, M. A., y Valpuesta, V. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, 21(2): 177-181.
- Allakhverdiev, S.I, Kreslavski, V.D., Klimov, V.V., Los, D.A., Carpentier, R. y Mohanty, P. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98(1-3): 541-550.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., . . . Tuteja, N. 2016. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19): 19002-19029.
- Bartal, A. y Arora S. 2017. Drought stress-induced enzyme activity and *mdar* and *apx* gene expression in tolerant and susceptible genotypes of *Eleusine coracana* (L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 53(1): 41-49.
- Brenner, C. 2002. Hint, Fhit, and GalT: Function, Structure, Evolution, and Mechanism of Three Branches of the Histidine Triad Superfamily of Nucleotide Hydrolases and Transferases. *Biochemistry*, 41(29): 9003-9014.
- Bouzayen M., Latché A., Nath P. y Pech J.C. 2010. Mechanism of Fruit Ripening. En: Pua E.C., Davey M.R., Bouzayen M., Latché A., Nath P., y Pech J.C. *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 319-339 pp.
- Bulley, S., y Laing, W. 2016. The regulation of ascorbate biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 33: 15-22.
- Bulley S., Rassam M., Hoser D., Otto W., Schünemann N., Wright M., MacRae E., Gleave A. y Laing W. 2009. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 60(3): 765-778.
- Cai, X. F., Zhang, C. J., Ye, J., Hu, T. X., Ye, Z. B., Li, H. X., y Zhang, Y. Y. 2015. Ectopic expression of *FaGalUR* leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Growth Regulation*, 76(2): 187-197.
- Chiang, C. M., Chien, H. L., Chen, L. F. O., Hsiung, T. C., Chiang, M. C., Chen, S. P., y Lin, K. H. 2015. Overexpression of the genes coding ascorbate peroxidase from *Brassica campestris* enhances heat tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 59(2): 305-315.
- Cruz-Rus E., Botella, M.A., Valpuesta, V. y Gómez-Jimenez, M.C. 2010. Analysis of genes involved in L-Ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. *Journal of Plant Physiology*, 167(9): 739-748.
- Cruz-Rus E., Amaya I., Sánchez-Sevilla J.F., Botella M.A., y Valpuesta V. 2011. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* 46(12): 4191-4201.

- Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Pacheco-Sanchez, Muhlia-Almazán A., S., Rivera-Domínguez M., . . . Islas-Osuna, M. A. 2018. Mesocarp RNA-Seq analysis of mango (*Mangifera indica* L.) identify quarantine postharvest treatment effects on gene expression. *Scientia Horticulturae*, 227: 146-153.
- Davey M.W., Montagu M.V, Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie JJ I., Strain J.J., Favell D. y Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (80): 825-860.
- Demidchik, V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109: 212-228.
- Dilley R.D., Wang Z., Kadirjan-Kalbach D.K., Ververidis F., Beaudry R. y Padmanabhan K. 2012. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase reaction mechanism and putative post-translational activities of the ACCO protein. *AoB Plants*, 5: plt031.
- Donner L.W. y Hicks K. B. 1981. High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Ascorbic Acid, Erythorbic Acid, Dehydroascorbic Acid, Diketogulonic Acid, and Diketogluconic Acid. *Analytical Biochemistry* 115: 225-230.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., y Smirnoff, N. 2007. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant Journal*, 52(4): 673-689.
- Ducamp Collin, M.-N., Arnaud, C., Kagy, V., y Didier, C. 2007. Fruit flies: disinfestation, techniques used, possible application to mango. *Fruits*, 62(4): 223-236.
- Gao, Y., Badejo, A. A., Shibata, H., Sawa, Y., Maruta, T., Shigeoka, S., . . . Ishikawa, T. 2011. Expression Analysis of the *VTC2* and *VTC5* Genes Encoding GDP-L-Galactose Phosphorylase, an Enzyme Involved in Ascorbate Biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 75(9): 1783-1788.
- Gill, S. S., y Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Gómez-García, M. del R., y Ochoa-Alejo, N. 2016. Predominant role of the l-galactose pathway in l-Ascorbic acid biosynthesis in fruits and leaves of the *Capsicum annuum* L. chili pepper. *Brazilian Journal of Botany*, 39(1): 157-168.
- Hernández, E., Rivera, P., Bravo, B., Toledo, J., Caro-Corrales, J., y Montoya, P. 2012. Hot-Water Phytosanitary Treatment Against *Ceratitis capitata* (Diptera: *Tephritidae*) in 'Ataulfo' Mangoes. *Journal of Economic Entomology*, 105(6): 1940-1953.
- Huan, C., Han, S., Jiang, L., An, X. J., Yu, M. L., Xu, Y., . . . Yu, Z. F. 2017. Postharvest hot air and hot water treatments affect the antioxidant system in peach fruit during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, 126: 1-14.
- Huang, M., Xu, Q., y Deng, X.-X. 2014. l-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Journal of Plant Physiology*. 171: 1205–1216.
- Jiang M., Jiang J. J., He C., y Guan, M. 2016. Broccoli plants over-expressing a cytosolic ascorbate peroxidase gene increase resistance to downy mildew and heat stress. *Journal of Plant Pathology*, 98(3): 413-420.
- Jiang Z., Zhong Y., Jian Z., Ali M., Liu G. y Zheng X. 2018. L-ascorbic acid metabolism in an ascorbate-rich kiwifruit (*Actinidia. Eriantha Benth.*) cv. 'White' during postharvest. *Plant Physiology and Biochemistry*, 12: 20-28.
- Kim, JJ., Kim YS., Park SI., Mok JE., Kim, YH., Park HM., Kim IS. y Yoon HS. 2017. Cytosolic monodehydroascorbate reductase gene affects stress adaptation and grain yield

- under paddy field conditions in *Oryza sativa* L. *japonica*. *Molecular Breeding*, 37(118): 1-13.
- Konica Minolta. (2007). *Precise Color Communication, Color Control from Perception to Instrumentation*. [Folleto]
- Kuai B., Chen J. y Hörtensteiner S. 2017. The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *Journal of Experimental Botany*, 69(4): 751-767.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. y Higgins D.G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- Lee, S. K., y Kader, A. A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3): 207-220.
- Li, F., Wu, Q. Y., Sun, Y. L., Wang, L. Y., Yang, X. H., y Meng, Q. W. 2010. Overexpression of chloroplastic monodehydroascorbate reductase enhanced tolerance to temperature and methyl viologen-mediated oxidative stresses. *Physiologia Plantarum*, 139(4): 421-434.
- Li,H., Huang,W., Wang, G.L., Wu, Z.J. y Zhuang,J. 2016. Expression profile analysis of ascorbic acid-related genes in response to temperature stress in the tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Genetics and Molecular Research*, 15(4): 1-10.
- Li, J., Li, M. J., Liang, D., Ma, F. W., y Lei, Y. S. 2014. Comparison of expression pattern, genomic structure, and promoter analysis of the gene encoding GDP-L-galactose phosphorylase from two *Actinidia* species. *Scientia Horticulturae*, 169: 206-213.
- Li, J., Liang, D., Li, M. J., y Ma, F. W. 2013. Light and abiotic stresses regulate the expression of GDP-L-galactose phosphorylase and levels of ascorbic acid in two kiwifruit genotypes via light-responsive and stress-inducible cis-elements in their promoters. *Planta*, 238(3): 535-547.
- Linster, C. L., Gomez T.A., Christensen K.C., Adler L.N., Young B.D., Brenner C., y Clarke S.G. 2007 *Arabidopsis* VTC2 Encodes a GDP-I-Galactose Phosphorylase, the Last Unknown Enzyme in the Smirnoff-Wheeler Pathway to Ascorbic Acid in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (26): 18879–18885.
- Linster, C. L., Adler L.N., Webb K., Christensen K.C., Brenner C., y Clarke S.C. 2008. A Second GDP-I-Galactose Phosphorylase in *Arabidopsis* En Route to Vitamin C. *The Journal of Biological Chemistry* 283(27): 18483–92.
- Lisko, K. A., Torres, R., Harris, R. S., Belisle, M., Vaughan, M. M., Jullian, B., . . . Lorence, A. 2013. Elevating vitamin C content via overexpression of myo-inositol oxygenase and L-gulonolactone oxidase in *Arabidopsis* leads to enhanced biomass and tolerance to abiotic stresses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(6): 643-655.
- Liu, Y. J., Yuan, Y., Liu, Y. Y., Liu, Y., Fu, J. J., Zheng, J., y Wang, G. Y. 2012. Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 169(2): 183-192.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- López-Gómez, R. y Gómez-Lim, M.A. 1992. A Method for Extracting Intact RNA from Fruits Rich in Polysaccharides using Ripe Mango Mesocarp. *HortScience*, 27(5): 440-442.
- Lorence, A., Chevone, B. I., Mendes, P., y Nessler, C. L. 2004. *myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, 134(3): 1200-1205.

- Luna-Esquivel, G., Arévalo-Galarza M.L., Anaya-Rosales, S, Monter A.V., Ramos-Acosta M. y Leyva-Ruelas G. 2006. Calidad de mango "Ataulfo" sometido a Tratamiento Hidrotérmico. *Revista Fitotécnica de México*, 29(2): 123-128.
- Lurie S. y Predreschi R. 2014. Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research* (1): 14030.
- Major, L. L., Wolucka, B. A., y Naismith, J. H. 2005. Structure and function of GDP-mannose-3',5'-epimerase: An enzyme which performs three chemical reactions at the same active site. *Journal of the American Chemical Society*, 127(51): 18309-18320.
- Manthey, J. A., y Perkins-Veazie, P. 2009. Influences of Harvest Date and Location on the Levels of beta-Carotene, Ascorbic Acid, Total Phenols, the in Vitro Antioxidant Capacity, and Phenolic Profiles of Five Commercial Varieties of Mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22): 10825-10830.
- Mittler, R. 2016. ROS are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1): 11-19.
- Mellidou I., Keulemans J., Kanellis A. y Davey M. 2012. Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biology*, 12: 239.
- Myllyharju, J. 2008. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. *Annals of Medicine*, 40(6): 402-417.
- Mondal, K., Malhotra, S.P., Jain, V. y Singh, R. 2009. Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 15(4): 327-334.
- Noshi, M., Hatanaka, R., Tanabe, N., Terai, Y., Maruta, T., y Shigeoka, S. 2016. Redox regulation of ascorbate and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in *Arabidopsis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 80(5): 870-877.
- Noshi, M., Yamada, H., Hatanaka, R., Tanabe, N., Tamoi, M., y Shigeoka, S. 2017. Arabidopsis dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 81(3): 523-533.
- Ornelas-Paz, J. de J., Yahia, E.M. y Gardea, A.A. 2008. Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCI+-time-of-flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology*, 50 (2-3): 145-152.
- Ornelas-Paz, J. de J. y Yahia, E.M. 2014. Effect of the moisture content of forced hot air on the postharvest quality and bioactive compounds of mango fruit (*Mangifera indica* L. cv. Manila). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 6: 1078-1083.
- Ortega, V.G., Ramírez, J.A., Velázquez, G., Tovar, B., Mata, M. y Montalvo, E. 2013. Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant content of 'Ataulfo' mango during postharvest maturation. *Food Science and Technology*, 33(3): 561-568.
- Palafox H.C., Yahia E., Islas-Osuna M.A., Gutierrez-Martinez P., Robles-Sánchez M. y González-Aguilar G.A. 2012. Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, 135: 7-13.
- Park A. K., Kim I., Do H., Jeon B.W., Lee C.W., Roh S.J., Shin S.C, Park H., Kim Y., Kim Y., Yoon H., Lee J.H., y Kim H. 2016. Structure and Catalytic Mechanism of

- Monodehydroascorbate Reductase, MDHAR, from *Oryza Sativa* L. *Japonica*. Scientific Reports, 6: 33903.
- Payasi A., Mishra N.M., Soares-Chaves A.L., Singh R. 2009. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15(2): 103-113.
- Persson B., Kallberg Y., Oppermann U. y Jörnvall H. .2003. Coenzyme-Based Functional Assignments of Short-Chain Dehydrogenases/Reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions, Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism - 11th International Workshop* 143–144: 271–78.
- Resende, E.C.O., Martins, P.F., Azevedo, R.A., Jacomino, A.P. y Bron, I.U. 2012. Oxidative processes during ‘Golden’ papaya fruit ripening. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 24(2): 85-94.
- Robles-Sanchez, R. M., Islas-Osuna, M. A., Astiazaran-Garcia, H., Vazquez-Ortiz, F. A., Martin-Belloso, O., Gorinstein, S., y Gonzalez-Aguilar, A. 2009. Quality Index, Consumer Acceptability, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of Fresh-Cut "Ataulfo" Mangoes (*Mangifera indica* L.) as Affected by Low-Temperature Storage. *Journal of Food Science*, 74(3): S126-S134.
- Rocha-Ribeiro, S.M., Queiroz, J.H., Lopes-Ribeiro de Queiroz, M.E., Campos, F.M. y Pinheiro-Sant’ana, H.M. 2007. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. *Plant Foods Hum Nutr.*, 62(1):13-7.
- Rogiers, S. 1998. Maturation and Ripening of Fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are Accompanied by Increasing Oxidative Stress. *Annals of Botany*, 81(2): 203-211.
- Schieber, A., Ullrich, W., y Carle, R. 2000. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2): 161-166.
- Schmittgen, T.D. y Livak K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101-1108.
- Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zamir D. y Causse M. 2008. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, Cell & Environment*, 31(8): 1086-1096.
- Szarka, A., y Lőrincz, T. 2014. The role of ascorbate in protein folding. *Protoplasma*, 251(3): 489-497.
- Tharanathan, R. N., Yashoda, H. M., y Prabha, T. N. 2006. Mango (*Mangifera indica* L.), "The king of fruits" - an overview. *Food Reviews International*, 22(2): 95-123.
- Tsaniklidis, G., Delis, C., Nikoloudakis, N., Katinakis, P., y Aivalakis, G. 2014. Low temperature storage affects the ascorbic acid metabolism of cherry tomato fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84: 149-157.
- Todorov, D. T., Karanov, E. N., Smith, A. R., Y Hall, M. A. 2003. Chlorophyllase activity and chlorophyll content in wild type and *eti 5* mutant of *Arabidopsis thaliana* subjected to low and high temperatures. *Biologia Plantarum*, 46(4): 633–636.
- Torabinejad J., Donahue L.J., Gunesefera B.N., Allen-Daniels M.J. y Gillaspay G.E. 2009. VTC4 Is a Bifunctional Enzyme That Affects Myoinositol and Ascorbate Biosynthesis in Plants. *Plant Physiology*, 150(2): 951-961. Revisar formato de título
- U.S. Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service 2016. Plant protection and quarantine. Treatment Manual. APHIS-USDA: http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/ports/downloads/treatment.pdf.

- U.S. Department of Health and Human Services 2016. Vitamin C Fact Sheet for Health Professionals. National Institutes of Health: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/#h2>
- Venkatesh, J., y Park, S. W. 2014. Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies*, 55:38.
- Wall-Medrano, A., Olivas-Aguirre, F. J., Velderrain-Rodriguez, G. R., Gonzalez-Aguilar, A., de la Rosa, L. A., Lopez-Diaz, J. A., y Alvarez-Parrilla, E. 2015. Mango: agroindustrial aspects, nutritional/functional value and health effects. *Nutricion Hospitalaria*, 31(1): 67-75.
- Wang, K., Shao, X. F., Gong, Y. F., Xu, F., y Wang, H. F. 2014. Effects of Postharvest Hot Air Treatment on Gene Expression Associated with Ascorbic Acid Metabolism in Peach Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(4): 881-887.
- Wang, Q.L., Chen, J.H., He, N.Y. y Guo, F.Q. 2018. Metabolic Reprogramming in Chloroplasts under Heat Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3): 849-871.
- Wang, X., Huang, W., Yang, Z., Liu, J., Huang, B. 2016. Transcriptional regulation of heat shock proteins and ascorbate peroxidase by CtHsfA2b from African bermudagrass conferring heat tolerance in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 6: 28021-28033.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A., y Smirnoff, N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393(6683): 365-369.
- Wolucka, B. A., y Van Montagu, M. 2003. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48): 47483-47490.
- Yahia, E. M., Jones, R. W., y Thomas, D. B. 2011. Quarantine pests of tropical and subtropical fruits and their control. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, Vol 1: Fundamental Issues* (pp. 224-287). Cambridge: Woodhead Publ Ltd.
- Yahia Kazuz, E., Ornelas-Paz, J. d. J., y Ariza-Flores, R. 2006. *El Mango. Trillas*. Primera edición. México. 224 pp.
- Zou, M. Q., Yuan, L. Y., Zhu, S. D., Liu, S., Ge, J. T., y Wang, C. G. 2016. Response of osmotic adjustment and ascorbate-glutathione cycle to heat stress in a heat-sensitive and a heat-tolerant genotype of wucai (*Brassica campestris* L.). *Scientia Horticulturae*, 211: 87-94.