

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR
DE ETILENO ERS1 EN DISTINTAS ETAPAS DE DESARROLLO
DEL MANGO (*Mangifera indica* L.)

POR:

NORMA AURORA STEPHENS CAMACHO

**Tesis aprobada por la
Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen
Vegetal**

Como requisito parcial para obtener el grado de

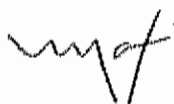
Maestría en Ciencias

Hermosillo, Sonora

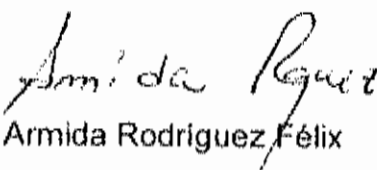
Diciembre de 2007

APROBACIÓN

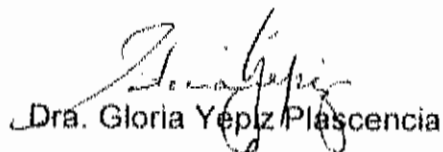
Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Norma Aurora Stephens Camacho la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



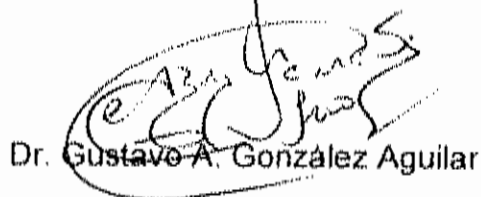
Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Director de tesis



M.C. Armida Rodríguez Félix



Dra. Gloria Yepiz Plascencia



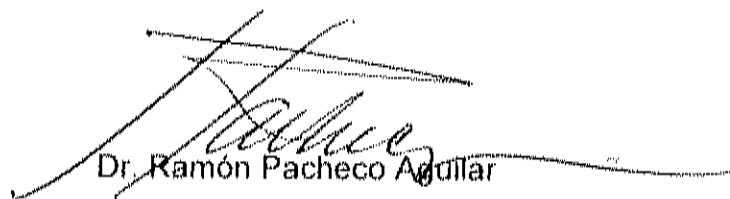
Dr. Gustavo A. González Aguilar

Dra. Mayra de la Torre Martínez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico a quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor.

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho.

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

A quienes depositaron toda su confianza en mí, con todo su amor y cariño, esto va por ustedes: mi familia, los amo con todo mi corazón.

Esta dedicada también a mi futuro esposo, a ti mi amor porque has sabido comprenderme durante los momentos críticos y por llegar a mi vida cuando más te necesitaba, gracias por estar conmigo, te amo!

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT: *por el apoyo económico brindado durante la realización de esta tesis, en especial a los proyectos de ciencia básica 40466 y 60950.*

A CIAD: *por abrirme las puertas al interesante mundo de la investigación y permitirme realizarme profesionalmente.*

A Dios: *por acompañarme siempre en todo momento de dificultad y permitirme terminar satisfactoriamente mis estudios, cuidando siempre de mi familia en las horas de ausencia.*

A mis padres y hermanos: *porque no existen palabras que puedan expresar su amor incondicional y por haberme dado un hogar en el que siempre reino el amor y la unión familiar.*

A mi asesora: *Dra Mary, gracias por sus enseñanzas a lo largo de estos dos años y fracción, y más que nada por hacer que la relación alumno- investigador se convirtiera en una buena amistad.*

A mi comité de tesis: *gracias a ustedes aprendí muchísimas cosas que me ayudaron en el camino, sobre todo a forjar el carácter y a creer más en mi misma, por ello estoy infinitamente agradecida.*

A Coordinación de Programas Académicos: *en especial a la Dra. Ana María Calderón, Laurita García y Héctor Galindo, por su infinita paciencia y apoyo brindado.*

Al Laboratorio de Inmunología: *principalmente al Dr. Jesús Hernández, por facilitarme la entrada a su laboratorio y disponer de su tiempo y equipo de trabajo. Mónica, Lillian y Erika, gracias por ayudarme con los "problemitas técnicos" del tiempo real...!*

Al personal de los laboratorios: *de Fisiología Vegetal, de Fisiología y Bioquímica Vegetal y del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos.*

A la DTAOV: *a todos los compañeros de esta área, en especial a Mónica Villegas, Carmen Granados (Pame), Ely Peralta, Javier Ojeda, Olivia Briseño, Francisco Soto (Panchito), Jorge Mercado, Nidia Cacéres, Lizet del Toro, Magda Pacheco y Norma Ferrer, gracias por su ayuda y por los buenos momentos, sobretodo antes de las 3...!!! ☺*

A Brenda Silva: aunque llegaste a la mitad del camino, tengo mucho que agradecerte, por que fuiste un gran apoyo para mí en la última etapa del recorrido, tienes un angelote Brenda y se te quiere un chorrooo...!

A ti Jesús: por haberte encontrado y compartir conmigo tu existencia además de tenerme tanta paciencia ya que has estado conmigo en las buenas y en las malas, QUIERO DARTE LAS GRACIAS A TI, A TI AMOR.

A mis amigas de siempre: Yurita & Manuel, Nysse & Alonso, Ady & César, Mariana & Enrique y Martha & Fher. PVR's se les quiere y a veces se les extraña...!!!

A mis amigos de la maestría: chamacos como los voy a extrañar, sobre todo los viajecitos de desestress que nos aventábamos a Kino a final de semestre. Gracias por esos buenos momentos. Nidia, Javier, Angel, Chabela, Orlando, Oliy, Margarito, Denise, Tere, Cipa, Luis Molina, Sandra, Joa, Lillian, Erika, Danny, Isabel, Luis Enrique y no puedo nombrarlos todos pero saben que las palabras sobran, no se awtten...!

A la familia Rosas-Rodríguez: gracias por todo el cariño y el apoyo incondicional que he recibido de ustedes.

"Los libros son, entre mis consejeros, los que más me agradan porque ni el temor ni la esperanza les impiden decirme lo que debo hacer..."
Alfonso II

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XII
RESUMEN	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	2
Maduración de frutos de mango	2
Producción de etileno y tasa respiratoria.....	3
Cambios de textura.....	7
Cambios de color, sabor y aroma	7
Percepción del etileno y señalización	9
Receptores de etileno identificados en la planta <i>Arabidopsis thaliana</i> y tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	9
Transducción de señales.....	12
Expresión génica de los receptores de etileno durante el proceso de maduración de frutos	14
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos	18
HIPÓTESIS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19

Obtención de muestras de mango 'Kent' y análisis fisiológicos y bioquímicos.....	19
Recolección de hojas de mango.....	19
Recolección de frutos de mango	19
Producción de CO ₂	19
Color	20
Actividad específica de poligalacturonasa (PG).....	20
Clonación del receptor de etileno ERS1 de mango	21
Extracción de DNA genómico.....	21
Extracción de RNA total.....	22
Obtención de DNA complementario (cDNA).....	22
Cuantificación de gDNA y RNA total por espectrofotometría.....	23
Análisis electroforético del gDNA y RNA total.....	23
Amplificación de los receptores de etileno.....	23
Amplificación a partir de cDNA sintetizado de tejido de embrión de mango.....	24
Clonación, secuenciación y análisis de los fragmentos amplificados	25
Evaluación de la expresión génica de los genes <i>ETR1</i> y <i>ERS1</i>	26
Extracción de RNA total.....	26
RT-PCR en tiempo real de los genes <i>ETR1</i> y <i>ERS1</i>	26
Análisis estadístico	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29

Producción de CO ₂ , color y actividad de poligalacturonasa en los mangos en diferentes etapas de desarrollo	29
Actividad específica de poligalacturonasa (PG).....	34
Clonación del receptor de etileno ERS1 de mango	36
Expresión de los genes <i>ETR1</i> y <i>ERS1</i> de mango	44
CONCLUSIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta biosintética de etileno y el ciclo de la metionina.	4
Figura 2. Producción de etileno y CO ₂ en mango 'Kensington Pride' almacenado a 21°C.....	6
Figura 3. Ubicación esquemática de los dominios componentes del receptor de etileno ERS1 de melón.....	11
Figura 4. Modelo de señalización como respuesta a etileno.....	13
Figura 5. Producción de CO ₂ de los frutos de mango 'Kent'.....	30
Figura 6. Cromo y ángulo de tono (°HUE) de mango 'Kent' en diferentes etapas de desarrollo.....	32
Figura 7. Ubicación del ángulo de tono y croma de los mangos muestreados en las diferentes etapas de desarrollo.....	33
Figura 8. Actividad específica de la enzima poligalacturonasa (PG) en mesocarpio de mango.....	35
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los PCR de colonia de clones obtenidos con los iniciadores degenerados.....	37
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de RNA extraído de embriones de mango.....	39
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del fragmento de 1173 pb del receptor ERS1 obtenido a partir de cDNA de hueso de mango.....	40
Figura 12. Secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos deducida del fragmento clonado (ERS1).	42
Figura 13. Predicción de dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de ERS1 de mango 'Kent'.	43

Figura 14. Expresión del gen que codifica para el receptor de etileno ETR1 de mango en 4 etapas de desarrollo.	46
Figura 15. Expresión del gen que codifica para el receptor de etileno ERS1 de mango en las 4 etapas de desarrollo.	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados en la clonación del gen <i>ERS1</i>	25
Tabla 2. Iniciadores específicos usados para evaluar la expresión de <i>ERS1</i> y <i>ETR1</i> por qRT-PCR	27
Tabla 3. Porcentajes de identidad del fragmento del receptor <i>ERS1</i> de mango con <i>ERS1</i> de otros frutos climatéricos y la planta modelo <i>A. thaliana</i>	41

RESUMEN

El etileno es una hormona vegetal necesaria para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En los frutos climatéricos la síntesis de etileno se incrementa al inicio de la maduración promoviendo los cambios fisiológicos y bioquímicos que le otorgarán al fruto sus características organolépticas de madurez. Para ejercer su acción el etileno se une a sus receptores, proteínas de membrana con actividad de histidina cinasas que funcionan como reguladores negativos de la cascada de transducción de señales del etileno. En la actualidad se han clonado receptores de etileno de frutos climatéricos y no climatéricos, encontrando diferencias tanto en el número de receptores así como en su expresión. El objetivo de la presente investigación fue clonar al gen que codifica para el receptor de etileno ERS1 y a su vez., evaluar la expresión de ERS1 y ETR1 en distintas etapas durante el desarrollo de frutos de mango. Se logró clonar un fragmento de 1173 pb del receptor de etileno ERS1 de mango a partir de cDNA. Este fragmento codifica para 391 aminoácidos, que tiene un porcentaje de identidad de 69 % con el homólogo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y alrededor del 73 % con ERS1 de otros frutos climatéricos como pera, papaya, durazno y fruto de la pasión. El fragmento del receptor amplificado presenta un dominio GAF, un dominio híbrido de histidina cinasa que contiene el núcleo catalítico de actividad de histidina cinasa y el dominio regulador de respuesta, los cuales también están presentes en los receptores de etileno caracterizados en otras plantas y frutos. Por otro lado, la expresión de los genes ERS1 y ETR1 varía durante el desarrollo del mango 'Kent'. El gen ERS1 de mango presentó un patrón de expresión similar al ERS1 de otros frutos climatéricos, En ambos genes la expresión se incrementó durante el desarrollo, siendo mayor la expresión de ETR1 que de ERS1.

INTRODUCCIÓN

El etileno es una de las principales hormonas involucradas en el desarrollo de los vegetales. Los frutos se clasifican como climatéricos cuando presentan un incremento en la síntesis de etileno al inicio de la maduración y como no climatéricos, cuando los niveles de etileno permanecen constantes durante todo su desarrollo (Bleecker y Kende, 2000). La función principal del etileno en la maduración de los frutos es desencadenar las reacciones características de este proceso. Éstas, involucran la síntesis de enzimas encargadas del ablandamiento (degradación de pared celular), de la degradación de carbohidratos y de la producción de compuestos volátiles y pigmentos. El etileno se une a receptores ubicados en la membrana del retículo endoplásmico, iniciando la transducción de señales mediante la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización (Klee y Tieman, 2002). La señal llega hasta el núcleo provocando cambios en la expresión génica, la cual culmina en cambios en color, textura, sabor, aroma y contenido nutricional de los frutos (Giovannoni, 2001).

Los receptores de etileno son proteínas de membrana con actividad de histidina cinasa que presentan homología con los sistemas de dos componentes de transducción de señales de los procariontes (Grefen y Harter, 2004). Estos receptores han sido estudiados en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), en la actualidad han sido identificados 5 receptores en *Arabidopsis* y 6 en tomate. En frutos tropicales como el mango, la identificación del número de isoformas de los receptores de etileno contribuirá al entendimiento del proceso de maduración. De tal manera que conociendo el número de receptores, su estructura y expresión en distintos estados de desarrollo del fruto se podría pensar en la manipulación selectiva de aquellos receptores que se expresan durante la maduración para controlar dicho proceso.

ANTECEDENTES

Maduración de frutos de mango

El mango 'Kent' se distingue por ser un fruto de tamaño grande, con un peso que puede variar entre 500 y 800 g. Cuando el mango está maduro el color de la cáscara varía, presentando tonalidades amarillas e incluso puede presentar vetas rojas. Esta variedad posee un sabor dulce debido a su alto contenido de azúcares y su pulpa no es tan fibrosa como la de otras variedades. El mango 'Kent' está clasificado como una variedad tardía, por ser cosechado durante los meses de julio y agosto en los estados de Nayarit, Sinaloa, Oaxaca y Michoacán (EMEX, 2006).

El mango es un fruto climatérico y durante su proceso de maduración están involucrados una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y organolépticos, que le permiten al fruto llegar a la etapa comestible. Estos cambios son inducidos por la presencia del etileno y ocurren una vez que el fruto ha adquirido su tamaño máximo. Este proceso se encuentra asociado a la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en reacciones enzimáticas características. Las enzimas de maduración participan en reacciones de catabolismo y anabolismo, como la degradación de la pared celular y de clorofilas y en la síntesis de compuestos volátiles y aceites esenciales (Avilán *et al.*, 1998).

Por ser un fruto climatérico, el mango presenta un incremento en la tasa de respiración y en la producción de etileno al inicio de la maduración. Sin embargo, existen frutos donde no se presentan estos cambios en la producción de etileno y respiración, mismos que son clasificados como no-climatéricos (Kader, 2003).

Producción de etileno y tasa respiratoria

El etileno es un potente modulador del crecimiento y desarrollo de las plantas (Czarny *et al.*, 2006). Se produce en la mayoría de los órganos de las plantas superiores, aunque la tasa de producción depende del tipo de tejido y del estadio de desarrollo (Kepczynski *et al.*, 2003). Sin embargo, también puede ser sintetizado como respuesta al estrés biótico y abiótico (Zhou *et al.*, 2006).

El etileno se sintetiza en los tonoplastos de la célula vegetal a partir de L-metionina y teniendo como intermediario la S-Adenosil-L-Metionina (Ado-metionina) por la reacción catalizada por la enzima S-Adenosilmetionina sintetasa. La ruta metabólica que fue descubierta a principios de 1980 por Yang y colaboradores y se conoce como ciclo de Yang (Figura 1). Una etapa limitante de la ruta es la conversión de S-Adenosil-Metionina a ácido-1-aminociclopropanocarboxílico (ACC), catalizada por la ACC sintasa (Brummell, 2005). La ACC sintasa es codificada por una familia multigénica y se ha visto que los diferentes genes de ACC sintasa son regulados diferencialmente durante procesos como maduración, estrés abiótico o tratamientos con otras hormonas. La etapa final en la síntesis de etileno es catalizada por la ACC oxidasa que cataliza la conversión de ACC a etileno liberando CO₂ y HCN. Esta enzima también proviene de una familia multigénica y anteriormente se le conocía como la enzima formadora de etileno. La ACC oxidasa también es una enzima reguladora de la síntesis de etileno, especialmente en condiciones donde se estén sintetizando grandes cantidades de etileno (Kepczynski y Kepczynska, 2005; Schaller y Kieber, 2002)

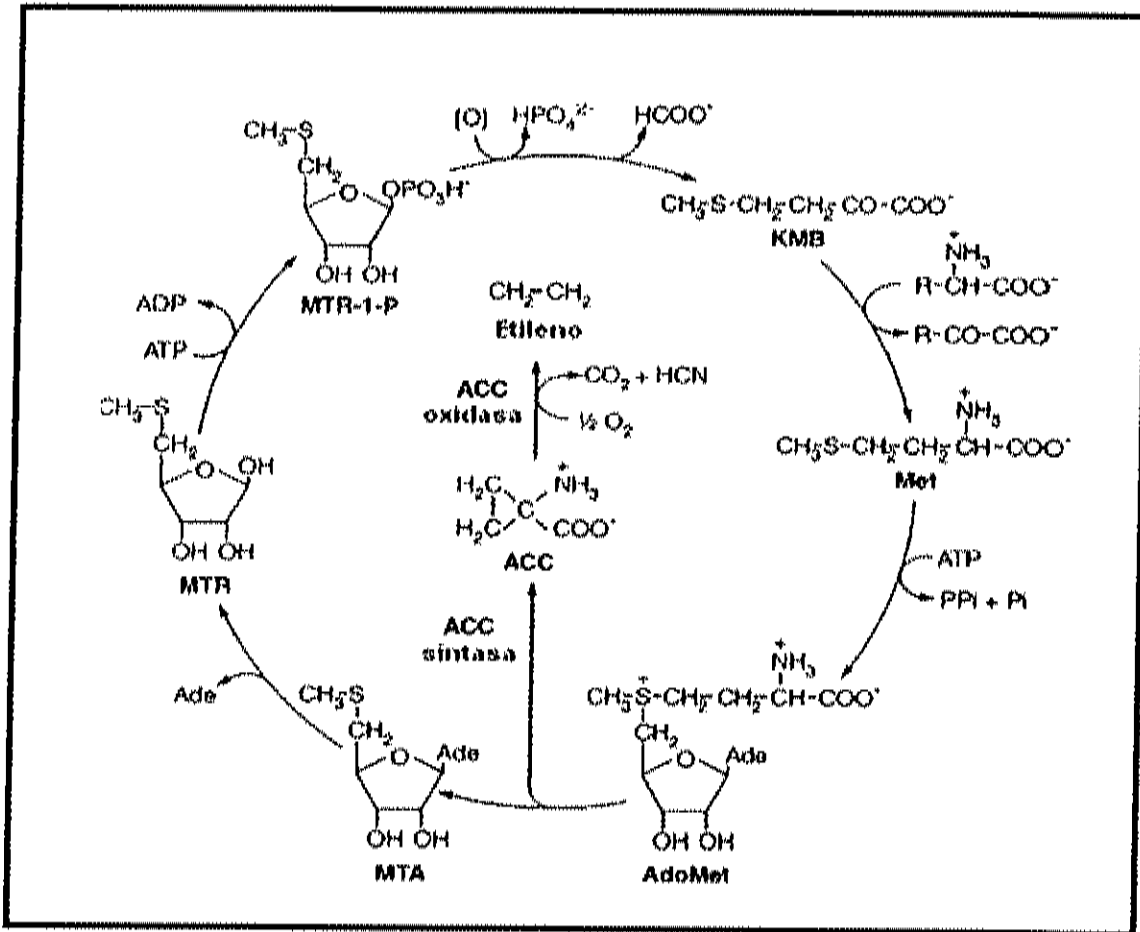


Figura 1. Ruta biosintética de etileno y el ciclo de la metionina. ACC, ácido-1-aminociclopropanocarboxílico; Ade, adenina; AdoMet, S-adenosil- L-metionina; KMB, 2-ceto-4-ácido metilbutírico; Met, L-metionina; MTA, 5'-metiladenosina; MTR 5'-metilribosa; MTR-1-P, 5'-metilribosa-1-fosfato. Tomado de Bleecker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

Durante la maduración de frutos climatéricos, la producción del etileno es autocatalítica ya que el fruto sintetiza más etileno para mantener niveles elevados durante este proceso (Brummell *et al.*, 2002). La maduración se caracteriza por iniciar en la región donde el etileno fue sintetizado y gracias a la capacidad del etileno de dispersarse libremente de célula a célula se puede uniformizar el proceso de maduración en el fruto (Thiman, 1980). Esta característica del etileno se basa en su capacidad de difundirse a través de las membranas de una forma rápida (Bleecker y Kende, 2000; Yahyaoui *et al.*, 2002). En muchos frutos las concentraciones de etileno requeridas para iniciar la maduración varían en un rango de 0.0042 nmol/L hasta 0.042 nmol/L. En el caso de mango 'Kent', la concentración de etileno requerida va de 0.0016 nmol/L hasta 0.0168 nmol/L (Kader, 2002). Gómez-Lim y colaboradores (Gómez-Lim, 1992) reportaron un valor máximo en la producción de etileno de 5.7 nmol/Kg-h en mango 'Manila' almacenado a 25°C. En la variedad 'Kensington Pride', almacenado a 21°C, las concentraciones de etileno presentaron un valor de 1.8 nmol/Kg-h en etapas preclimáticas, para luego incrementarse hasta 3.2 nmol/Kg-h en el pico climatérico (Figura 2) (Lalel *et al.*, 2003).

En lo que respecta a la producción de CO₂, esta se ve incrementada por el metabolismo acelerado que presenta el fruto al inicio de la maduración, principalmente por la degradación de carbohidratos. La producción de CO₂ es un buen índice de la longevidad del fruto una vez que ha sido cosechado ya que está asociado con la vida de anaquel de los frutos. Altas tasas de respiración causan un rápido deterioro de los frutos, provocando la pérdida de valor nutritivo y la senescencia (Kader, 2002). Se ha evaluado la tasa respiratoria de frutos de mango 'Kensington Pride' en etapas preclimáticas y climatéricas almacenados a 21°C, observándose que la producción de CO₂ en los frutos de mango preclimáticos es de 1.4 mmol/Kg.h y alcanza en la etapa climatérica niveles de 2.2 mmol/Kg.h (Figura 2) (Lalel *et al.*, 2003; Salunkhe, 1995)

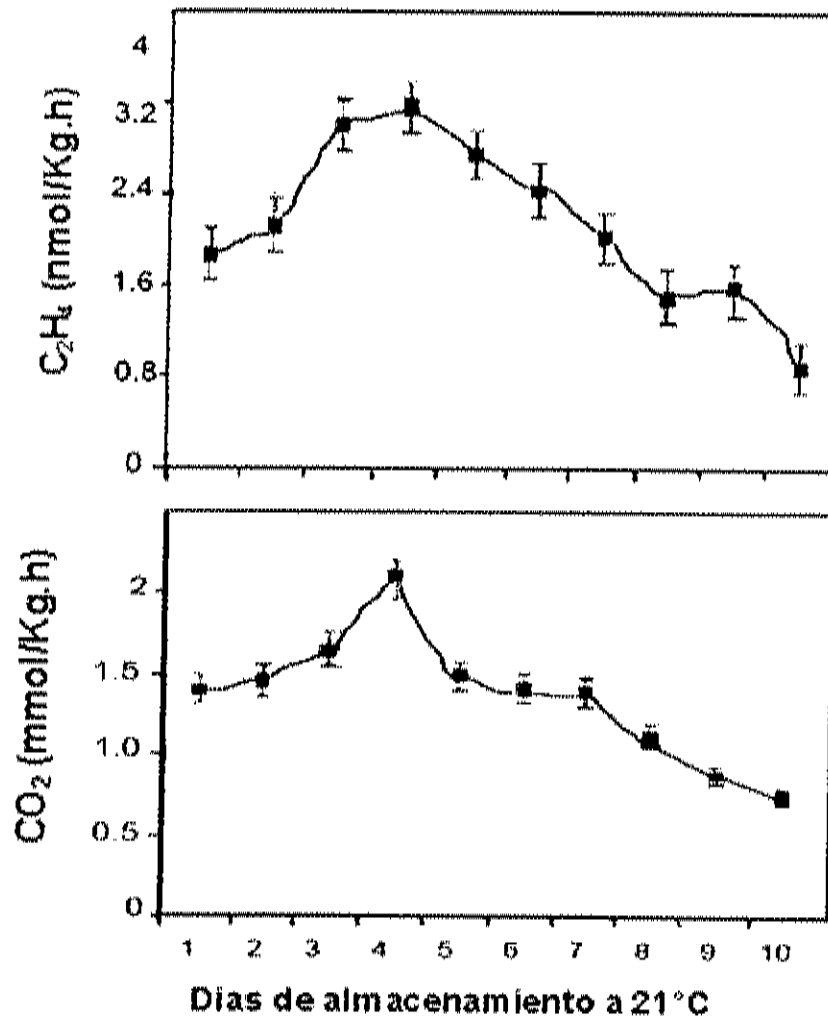


Figura 2. Producción de etileno y CO_2 en mango 'Kensington Pride' almacenado a 21°C. El incremento en la producción de etileno y en la tasa respiratoria (CO_2) se presentaron al tercer y cuarto día de almacenamiento respectivamente. Tomado de Lalel *et al.* (2003).

Se ha demostrado que en la mayoría de los frutos climatéricos el incremento en la tasa de respiración (CO₂) y el incremento en la biosíntesis de etileno son casi simultáneos. En la figura 2 se observa que en frutos de mango primero se presenta el incremento en la producción de etileno y posteriormente el incremento en la tasa de respiración (CO₂) (Lalel *et al.*, 2003; Salunkhe, 1995).

Cambios de textura

Los cambios en textura se deben a la degradación enzimática de los polisacáridos estructurales de la pared celular y de la lámina media, principalmente pectinas, celulosa y hemicelulosa (Brummell *et al.*, 2004). Los cambios estructurales de la pared celular ocurren por reacciones de demetilesterificación, solubilización y depolimerización de las sustancias pécticas, catalizadas por enzimas como poligalacturonasa (PG), pectinmetilesterasa (PME), ramnogalacturonasa (RGasa), arabinasas, liasas y galactanasas (Nishiyama *et al.*, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007). Durante el desarrollo del fruto estas enzimas presentan niveles de actividad muy bajos; sin embargo, incrementan su actividad en la maduración, mostrando un máximo de actividad en la etapa climatérica (Owino *et al.*, 2005). Se ha determinado que la actividad de PG se incrementa a medida que el fruto va madurando y que el máximo de actividad enzimática y el pico climatérico de etileno coinciden (Nishiyama *et al.*, 2007; Prasanna *et al.*, 2004; Prasanna *et al.*, 2003).

Cambios de color, sabor y aroma

El cambio de color es otro de los procesos que se inicia con la maduración. Para el caso de frutos de mango, el color de la pulpa y de la cáscara, cambia de una tonalidad verde (madurez fisiológica) a una coloración amarilla (madurez comercial). Este proceso se atribuye a la conversión de los cloroplastos a cromoplastos, con la consecuente inactivación del sistema

fotosintético (Bramley, 2002). El sistema fotosintético es inactivado debido a la degradación de las clorofilas, responsables de la coloración verde de la cáscara del fruto, catalizada por la enzima clorofilasa (Thiman, 1980)

Los carotenoides presentes en los frutos de mango son los responsables de la coloración amarilla en los mangos maduros. Estos pigmentos presentan una estructura simétrica de 40 átomos de carbono con insaturaciones alternadas en su cadena. El carotenoide más abundante en mango es el β -caroteno y es el responsable de otorgarle esa coloración con tonalidades que van desde el amarillo hasta el naranja (Hendry, 1999).

Otros dos procesos que están involucrados en la maduración de los frutos son la generación del sabor y el aroma y se dan principalmente por la degradación de carbohidratos y ácidos grasos, presentes en el fruto. Estos dos procesos están regulados por las enzimas amilasa y aciltransferasa, respectivamente (Aharoni y O'Connell, 2002). El sabor se debe a la degradación del almidón almacenado durante todo el desarrollo del fruto, el cual al ser hidrolizado le confiere al fruto el sabor dulce característico (Tharanathan *et al.*, 2006). A su vez, la síntesis de compuestos aromáticos se debe a la acetilación de grupos alifáticos como alcoholes y ésteres, provenientes de la degradación de ácidos grasos (Yahyaoui *et al.*, 2002). En mango los principales azúcares son fructosa, sacarosa y glucosa y los compuestos aromáticos predominantes son el orcímeno y mirceno, miembros de la familia de los monoterpenos y sesquiterpenos (Edwards y Gatehouse, 1999).

En conjunto todos estos cambios físicos, químicos y fisiológicos le proporcionan al fruto todas sus características organolépticas de consumo, que se ven reflejadas en una alta demanda del fruto en el mercado (Giovannoni, 2001).

Percepción del etileno y señalización

Receptores de etileno identificados en la planta *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Se han identificado cinco receptores de etileno en la planta modelo *A. thaliana* (*ETR1*, *ERS1*, *ERS2*, *ETR2* y *EIN4*) y seis en tomate (fruto climatérico modelo de estudio) (*ETR1*, *ETR2*, *NR*, *ETR4*, *ETR5* y *ETR6*) (Bleecker *et al.*, 1998). Estos receptores están localizados en la membrana del retículo endoplásmico (Chen *et al.*, 2002). En *A. thaliana* se ha demostrado que el dominio de los receptores que tiene afinidad y que une al etileno está conformado por 165 aminoácidos y que la unión del etileno al receptor es mediada por cofactores metálicos como el cobre (Rodríguez *et al.*, 1999). Existe evidencia que indica que estos receptores también tienen una fuerte afinidad por el ión plata, que se une al receptor y media la unión del etileno, desplazando al ión cobre del sitio activo del receptor (Napier, 2004).

Los receptores de etileno de *A. thaliana* han sido clasificados de acuerdo a su estructura primaria y a estudios filogenéticos en dos sub-familias. La primera subfamilia, tipo *ETR1*, está integrada por los receptores *ETR1* y *ERS1*, los cuales poseen actividad de histidina cinasa (HK, por sus siglas en inglés) al tener conservados los residuos catalíticos de las histidinas cinasas (Sakai *et al.*, 1998) y además presentan 3 regiones transmembranales en el N-terminal. La segunda subfamilia, tipo *ETR2*, está integrada por *ERS2*, *ETR2* y *EIN4*, estos receptores, a diferencia de los del tipo *ETR1*, carecen de uno o varios residuos conservados de histidina cinasa, por lo cual no presentan actividad enzimática de HK (Guo y Ecker, 2004). Esta subfamilia, también está caracterizada por tener, a diferencia de la primera, cuatro regiones transmembranales en el amino terminal a los que se une el etileno. En tomate, la subfamilia-1 está conformada por *NR*, *LeETR1* y *LeETR2*, mientras que la subfamilia-2 por *LeETR4*, *LeETR5* y *LeETR6*. La clasificación de los receptores de etileno en

tomate, también se basa en el número de regiones transmembranales que presentan los diferentes receptores. De igual manera que en *A. thaliana*, los miembros de la subfamilia-1 poseen tres regiones transmembranales en el N-terminal y los miembros de la subfamilia-2 cuatro regiones transmembranales (Klee y Tieman, 2002).

Los receptores de etileno de *A. thaliana* y de frutos climatéricos como el melón están conformados por tres dominios (Figura 3). El primero, es el dominio al que se une el etileno, está localizado en el amino terminal (N-terminal) y se encuentra asociado a la membrana. Este dominio además de que contiene todos los aminoácidos involucrados en la unión y afinidad por el etileno, contiene dos cisteínas (C4 y C6), las cuales permiten la unión covalente de dos monómeros mediante puentes disulfuro para la formación del dímero, el cual es la forma activa del receptor (Ma *et al.*, 2006; Schaller y Bleecker, 1995). El segundo dominio se encuentra localizado después del dominio de unión al etileno y no se tiene claro cuales son sus funciones. Se ha encontrado que tiene cierta homología con el dominio GAF, asociado con la unión del GMP cíclico. También se ha reportado que está involucrado en el proceso de regulación de la luz en proteínas fototransductoras (Aravind y Ponting, 1997; Bleecker *et al.*, 1998). El tercer dominio se encuentra localizado en el carboxilo terminal (C-terminal) y presenta actividad de HK. El dominio HK presenta similitud con el sistema de señalización de dos componentes en procariontes, ya que posee el núcleo catalítico característico de las HK (integrado por los aminoácidos His, Asn, Gly, Phe y Gly). Este dominio tiene la capacidad de autofosforilarse en el residuo de histidina y de transferir los grupos fosfato hacia los residuos de aspartato. El receptor así activado inicia una cascada de señalizaciones hacia otras proteínas efectoras (cascada del tipo MAP cinasa, con destino final a nivel del DNA)(Qu y Schaller, 2004).

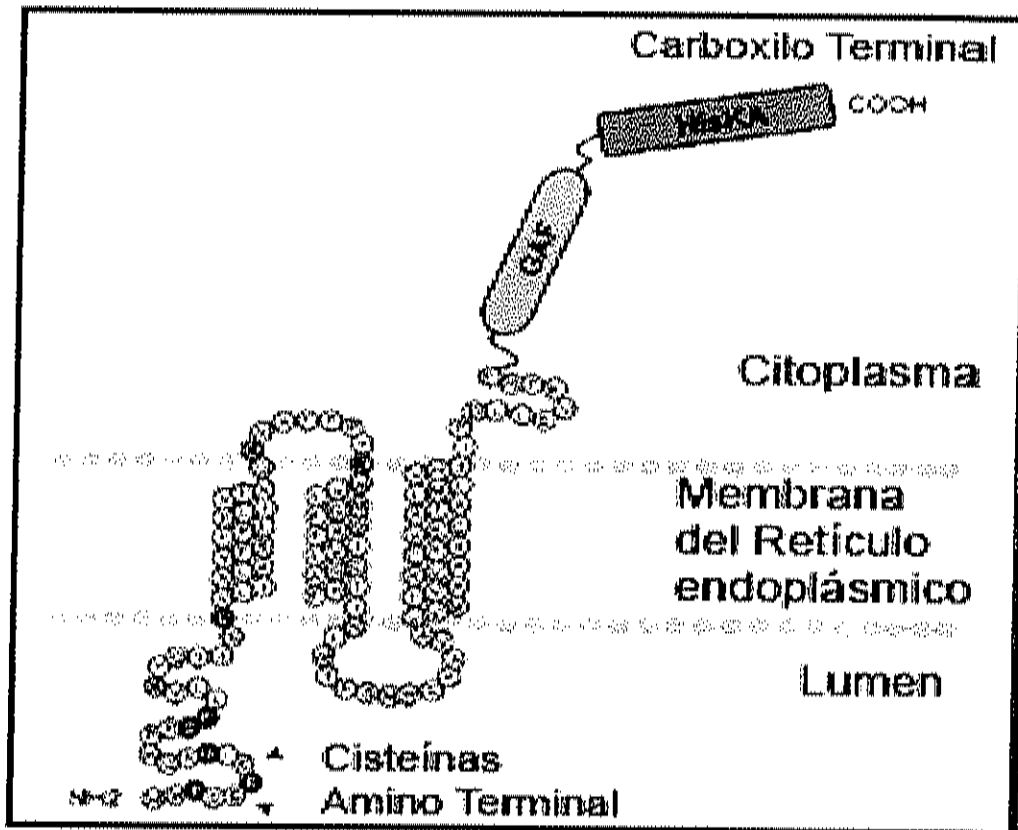


Figura 3. Ubicación esquemática de los dominios componentes del receptor de etileno ERS1 de melón. El receptor ERS1 presenta 3 regiones transmembranales, un dominio tipo GAF y el dominio de histidina cinasa. El amino terminal se encuentra ubicado en el lumen del retículo endoplásmico y el carboxilo terminal en el citoplasma. Tomado de Ma *et al.* (2006).

Transducción de señales

La unión del etileno al receptor da como resultado la inactivación de un regulador negativo CTR1, que presenta similitud con proteínas del tipo RAF cinasa, provocando una fosforilación hacia otras proteínas involucradas en la señalización, mediante una cascada tipo MAPKKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase, por sus siglas en inglés). La transferencia de fosfatos de la cascada MAPK llega hasta proteínas de membrana nuclear, como EIN2 que funciona como canal de iones (probablemente iones Ca^{+2}), regulando la señalización de etileno alterando las concentraciones de iones en el núcleo. Una vez activada EIN2, se induce la activación de factores de transcripción como EIN3, miembro de la familia de EIN3/EIL. Estos factores de transcripción están involucrados en la inducción de la expresión de otros factores de transcripción como ERF1 (Ethylene Response Factor, por sus siglas en inglés), el cual es el responsable de la expresión de genes específicos para dar inicio a la maduración (Figura 4). (Brummell, 2005; Jiang y Fu, 2000)

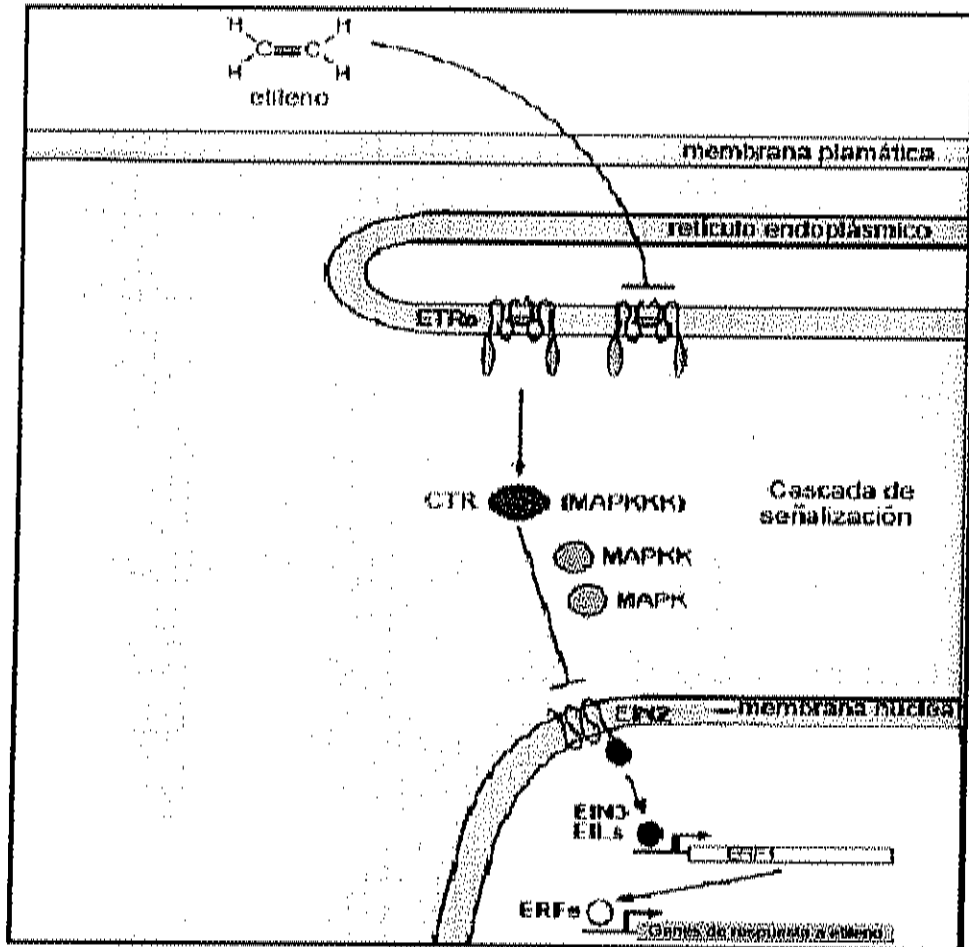


Figura 4. Modelo de señalización como respuesta a etileno. La unión del etileno al receptor provoca la activación de la cascada de señalización tipo MAPKKK, con la consecuente activación de proteínas de membrana nuclear y factores de transcripción para la expresión de genes en respuesta a etileno. Tomado de Brummell (2005).

Expresión génica de los receptores de etileno durante el proceso de maduración de frutos

Los cDNAs para receptores de etileno han sido obtenidos de varias especies de plantas y frutos, debido a esto ha sido posible evaluar la expresión de estos genes en plantas y frutos en diferentes estadios de desarrollo y durante la maduración de frutos (Trainotti *et al.*, 2005). En los frutos climatéricos conforme el fruto madura, se incrementa la respuesta al proceso de señalización al etileno y esto podría deberse a un aumento en la expresión de los genes que codifican para los receptores (Mita *et al.*, 1998).

En ciertos frutos climatéricos como tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y el fruto de la pasión (*Pasiflora edulis*), se ha reportado que los niveles de expresión de los receptores varían dependiendo del tejido analizado. En el caso de tomate, el gen *LeETR4* se expresó principalmente en el fruto (verde y maduro) y en la flor (0.01-0.05% mRNA), mientras que su expresión fue mínima (0.00002-0.00009 % mRNA) en las hojas (Klee, 2002). De la misma forma, en el fruto de la pasión, la expresión de *PeERS1* y *PeERS2*, varió en los diferentes tejidos analizados. Mita y colaboradores (Mita *et al.*, 2002), reportaron que la expresión del gen *PeERS1* es mucho mayor en los arilos, donde había mayor cantidad de etileno, que en las semillas. Estos resultados sugieren que la expresión de estos genes puede ser regulada diferencialmente por la cantidad de etileno presente en el tejido (Lashbrook *et al.*, 1998).

En frutos de durazno (*Prunus persica*), se clonó el gen *PpETR1*, el cual presenta 85% de identidad con el gen *ETR1* de *A. thaliana* y 95% con el gen *MdETR1* de manzana (*Malus domestica*). La expresión de *PpETR1* fue evaluada por medio de RT-PCR en hojas de diferentes variedades del fruto, encontrando que la cantidad de transcrito en hojas no mostró variación alguna; Sin embargo, se presentó un pequeño incremento en la expresión de *PpETR1* como respuesta al daño mecánico en hojas. También se evaluó la expresión de

PpETR1 en tres diferentes variedades de durazno en distintas etapas de desarrollo. En durazno 'P19-63' y 'Bailey', la expresión fue constante durante todo el desarrollo. En cambio, la expresión de *PpETR1* en durazno 'Loring' presentó un ligero incremento en etapas de desarrollo tempranas y declinó en las etapas de desarrollo posteriores (Bassett *et al.*, 2002). Este comportamiento podría deberse al grado de maduración en el que se encontraban los frutos (Rasori *et al.*, 2002).

Estudios realizados en frutos de melón (*Cucumis melo*), muestran que dos receptores clonados (*CmERS1* y *CmETR1*), presentan similitud de 70% y 64%, con *ERS1* y *ETR1* de *A. thaliana*, respectivamente. La expresión de estos transcritos fue evaluada por medio de análisis de hibridación (Northern blot) en frutos de melón en etapas de crecimiento (elongación celular) y maduración. El gen *CmERS1* mostró una mayor expresión en la fase de elongación del fruto, cuando la sensibilidad a etileno es mayor. Por otro lado, los niveles del gen *CmETR1*, fueron proporcionales a la producción de etileno durante el inicio de la maduración (Sato-Nara *et al.*, 1999). En pera (*Pyrus communis*), la evaluación de la expresión de *PcETR1* y *PcERS1* por medio de Northern blot, mostró que la expresión de ambos genes fue constante durante el crecimiento del fruto. Sin embargo, se observó un incremento que coincidió con el aumento de la producción de etileno al inicio de la maduración del fruto. *PcETR1* y *PcERS1* de pera, presentan un 87% y 50% de similitud con los receptores *ETR1* y *ERS1* de *A. thaliana*, respectivamente (El-Sharkawy *et al.*, 2003).

En frutos como pèrsimo (*Diospyris kaki*), manzana (*Malus domestica*) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la expresión del gen *ETR1* fue evaluada por medio de RT-PCR en tiempo real. Los resultados sugieren que la expresión del gen *ETR1* es constitutiva, porque no se detectaron cambios conforme los frutos se fueron desarrollando (Dal Cin *et al.*, 2005; Lashbrook *et al.*, 1998; Mita *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2007). Sin embargo, el patrón de expresión de *ERS1* para estos mismos frutos sí varió y mostró sus valores máximos al inicio de la

maduración. Este incremento coincide con la presencia del pico climatérico de etileno de estos frutos y por este motivo lo clasifican como un gen dependiente de etileno, puesto que sus niveles de expresión coinciden con el incremento de biosíntesis de etileno (Mita *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2007).

En lo que respecta a frutos de mango, hay un reporte de evaluación de la expresión de *ETR1* por la técnica de Northern blot. El patrón de expresión de este gen, presentó variaciones en su expresión en diferentes etapas de desarrollo, notándose un incremento en la expresión al inicio de la maduración. Debido a este resultado los autores consideran que *ETR1* de mango es un gen cuya expresión es inducida por el etileno, a diferencia de lo reportado en tomate, pèrsimo, pera y fruto de la pasión en los cuales la expresión de *ETR1* no varió (Gutierrez-Martínez *et al.*, 2001).

También se ha evaluado la expresión de los receptores de etileno durante la maduración de frutos no climatéricos como la fresa (*Fragaria X ananasa*) (Trainotti *et al.*, 2005), evidenciando que los receptores de la subfamilia II son los que presentan mayor expresión en este tipo de frutos, a diferencia de lo reportado en otros frutos climatéricos. En cereales como el arroz (*Oriza sativa*), se ha evaluado la expresión de algunos receptores en diversos tejidos, como *ETR1*, *ERS2*, *ERS1* y *ETR2* (Yau *et al.*, 2004). Los patrones de expresión de los genes *ERS1*, *ERS2*, *ETR1* y *ETR2* durante la senescencia de la zona de abscisión fueron distintos en diversas flores como belladona (*Delphinium*), petunias (*Petunia hibrida*) y rosas (Kuroda *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006; Tanase y Ichimura, 2006; Wang y Kumar, 2007). Esto indica que los patrones de expresión de los receptores de etileno no son similares en plantas y frutos, evidenciando diferentes formas de regulación de la señalización del etileno en estas variedades.

JUSTIFICACIÓN

El fruto de mango se caracteriza por ser muy perecedero debido a su rápida maduración, sensibilidad a bajas temperaturas de almacenamiento y su susceptibilidad al ataque de microorganismos. Todos estos factores son responsables de que su vida de anaquel a temperaturas de almacenamiento de 10°C a 13°C, se limite a un tiempo máximo que varía de 2 a 3 semanas. Para mantener la calidad del mango se han utilizado atmósferas modificadas o controladas, pero se tienen limitaciones debido a la alta incidencia de enfermedades como la antracnosis, a la pérdida de atributos organolépticos como sabor y olor y a los daños internos en los frutos. Estos cambios disminuyen la calidad del mango y se reflejan en pérdidas económicas considerables (Zambrano *et al.*, 1995).

Por lo anterior, es necesario tener tecnologías que permitan mantener la calidad de frutos como el mango por lapsos más largos y reducir las pérdidas poscosecha. Por lo tanto, el conocer a fondo el proceso de maduración del mango, en particular el conocimiento del número de receptores de etileno y la expresión de los mismos, será útil para definir estrategias de inhibición por periodos cortos del proceso fisiológico de maduración del mismo y podría aplicarse a otros frutos climatéricos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Clonar y evaluar la expresión del receptor de etileno ERS1 de mango (*Mangifera indica* L.) en diferentes estados de desarrollo

Objetivos Específicos

- Clonar y secuenciar al gen que codifica para el receptor de etileno ERS1 de mango.
- Comparar la secuencia de aminoácidos del receptor ERS1 de mango con el de otros frutos climatéricos.
- Evaluar los niveles de expresión génica de los receptores de etileno ERS1 y ETR1 en diferentes etapas de desarrollo del mango.

HIPÓTESIS

El receptor de etileno ERS1 de frutos de mango es similar a ERS1 de plantas y de otros frutos y se presentan cambios en su expresión génica durante el desarrollo del fruto

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras de mango 'Kent' y análisis fisiológicos y bioquímicos

Recolección de hojas de mango

Las hojas jóvenes de mango 'Kent' fueron recolectadas en el campo experimental "El Mayo" del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el municipio de Navojoa, Sonora (27°04'37.96" N y 109°27'05.56" O). Las hojas se colocaron en bolsas plásticas, se mantuvieron en hielo y se transportaron al laboratorio del CIAD-Hermosillo, donde fueron congeladas y pulverizadas en nitrógeno líquido para almacenarlas a -70°C hasta su análisis.

Recolección de frutos de mango

Los frutos de mango cultivar Kent en tres etapas de desarrollo fueron obtenidos del INIFAP en Navojoa, Sonora. Los mangos fueron seleccionados en el campo lo más uniforme posible en cuanto a apariencia y estado de desarrollo (de acuerdo a los días después de floración), tamaño y color. Las etapas de desarrollo se definieron basándose en los días después de floración (DDF) y fueron las siguientes: etapa 1 (106 DDF), etapa 2 (122 DDF), etapa 3 (189 DDF). Los frutos fueron lavados en el laboratorio con una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio y se tomaron 3 frutos por etapa de desarrollo. La cuarta etapa fue mango de 189 DDF, madurado bajo condiciones de almacenamiento a 20°C con una humedad relativa entre 60 y 65%

Producción de CO₂

A los frutos seleccionados y cosechados en cada etapa se les midió la producción de CO₂ por triplicado, para lo cual se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 (Varian-USA) equipado con detectores de ionización de

flama (FID) y de conductividad térmica (TCD), una columna metálica de 2 metros de largo y 1/8" de diámetro interno, empacada con Hayesep N 800/100 (Watada y Massie, 1981). Los frutos individuales fueron colocados en contenedores de plástico sellados y mantenidos a 20°C durante 1 hora. Después de ese tiempo se muestreó 1 mL del espacio de cabeza de los contenedores y se inyectó en el cromatógrafo. Las condiciones de temperatura fueron las siguientes: columna 80°C, inyector 100°C, FID 120°C y TCD a 170°C y se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 25 mL/min. Para la cuantificación del CO₂ se utilizó el estándar de 5% y la concentración de CO₂ fue determinada con la siguiente fórmula:

$$\text{mL CO}_2/\text{kg h} = \frac{(\text{área muestra}) (\text{conc. estándar}) (\text{área espacio de cabeza})}{(\text{tiempo incubación}) (\text{área estándar}) (\text{peso muestra})}$$

Color

El color de la pulpa se midió con un colorímetro Minolta CR-300. Los valores de L*, a* y b*, donde L* es la luminosidad, el cambio de color verde a rojo (a) y el del azul a amarillo (b). Con los valores obtenidos se calculó el croma (grado de saturación o pureza del color) de acuerdo a la fórmula:

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

El ángulo del tono (HUE) de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Hue} = \text{arcTan}(b^*/a^*)$$

Un ángulo de 360° representa un color rojo, uno de 90° un color amarillo, uno de 180° un color verde y uno de 270° un color azul (Konica Minolta, 2003).

Actividad específica de poligalacturonasa (PG)

La actividad de poligalacturonasa (PG) se determinó usando la técnica descrita por Gross (1982). Se homogenizaron 10 g de muestra con 10 mL de bisulfito de sodio al 1 %, pH 6.0 en un Ultra Turrax® T25 a 8000 x g. Posteriormente se filtró en 6 capas de tela de organza, el residuo sólido se lavó

2 veces con 10 mL de bisulfito de sodio al 1% y fue resuspendido en 15 mL de NaCl 1 M. Se ajustó el pH de los extractos a 6.0 y se agitaron por 3 horas en un agitador (Thermolyne Speci-Mix) a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 8900 x g a 4°C por 15 minutos y se filtró en tela de organza. Los extractos se desalaron en columna Sephadex PD10 G25 (previamente equilibrada con acetato de sodio 50 µM, pH 4.4) (Gross, 1982).

Se tomó una alícuota de 250 µL del extracto desalado y se le agregaron 750 µL de acetato de sodio 37.5 mM, pH 4.4 y 2 mg de ácido poligalacturónico y se incubó a 30°C en un baño de agua con circulación continua por 2 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 8,000 x g a 4°C por 15 min, para precipitar el ácido poligalacturónico que no reaccionó. Se tomaron 200 µl del sobrenadante, se agregó 1 mL de buffer de borato 0.1 M, pH 9.0 y 200 µL de cianoacetamida 1%, la reacción se calentó a 100°C por 10 min., transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS VARIAN CARY 50 BIO a 276 nm contra el blanco de reactivos.

Los resultados se expresaron como unidades de actividad/mg de proteína, donde una unidad está definida como los µmoles de grupos reductores producidos por hora. Para determinar la formación de los grupos reductores, se hizo una curva de calibración de 0 a 0.09 µmoles de ácido galacturónico/mL. La concentración de proteína (mg/mL) se determinó de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976), con una curva estándar de albúmina de suero bovino de 0.05 a 0.35 mg/mL.

Clonación del receptor de etileno ERS1 de mango

Extracción de DNA genómico

La extracción se realizó a partir del pulverizado obtenido de hojas jóvenes de mango (congeladas en nitrógeno líquido), siguiendo el protocolo de Lodhi *et*

al., (Lodhi *et al.*, 1994) modificado por Islas-Osuna *et al.*, (Islas-Osuna *et al.*, 2006). El método consiste en la extracción del DNA utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como agente de lisis celular.

Se pesaron 200 mg de tejido pulverizado y se adicionaron 400 μ L de buffer extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 20 mM, pH 8, NaCl 1.4 M, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2% y β -Mercaptoetanol al 0.2%), se mezcló suavemente y se adicionaron 200 μ L de polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 10%, se agitó hasta formar una mezcla y se procedió a una primera incubación por 25 min a 60°C y a una segunda a 4°C por 5 min. Posteriormente se añadieron 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclando suavemente. Las muestras se centrifugaron a 6000 x g por 15 minutos recuperando la fase acuosa a la cual se le añadieron 0.5 volúmenes de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol frío al 95% y se incubó por 5 minutos a 4°C. Se repitió la centrifugación por 10 min a 10500 x g. El precipitado fue lavado dos veces con etanol frío al 70%. El pellet se dejó secar y se resuspendió en 50 μ L de solución TE (Tris-HCl 100 mM y EDTA 10 mM, pH 8), se le añadió 1 μ L de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 15 minutos (Sambrook y Russell, 2001).

Extracción de RNA total

Para la obtención del cDNA fue necesario extraer el RNA total del embrión del mango. La extracción se realizó a partir de 200 mg de tejido pulverizado, utilizando el reactivo Concert RNA plant (Invitrogen), extracciones con cloroformo y una posterior precipitación del RNA con isopropanol. El RNA fue resuspendido en 50 μ L de agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) para evitar la degradación del mismo.

Obtención de DNA complementario (cDNA)

A partir de 200 μ g de RNA total, se aisló el RNA mensajero, utilizando el sistema de reactivos comercial OLIGOTEX (QIAGEN). Obtenido el mRNA se

procedió a la síntesis del cDNA partiendo de 0.3 µg de mRNA, utilizando el sistema de genotecas comercial SMART (CLONTECH Laboratories Inc.).

Cuantificación de gDNA y RNA total por espectrofotometría

La concentración de gDNA y RNA total fue determinada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm convirtiéndola a µg/µL utilizando las siguientes fórmulas: [DNA]= 50 x Factor de Dilución X A_{260} . [RNA] = 40 X Factor de Dilución X A_{260} . La determinación de la pureza se hizo mediante la relación (A_{260}/A_{280}).

Análisis electroforético del gDNA y RNA total

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio a una concentración de 20 mg/mL, utilizando como solución de corrida TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 7). Se cargaron 5 µL de gDNA ó RNA total en cada pozo más 1 µL de solución de carga 6X. El voltaje de corrida fue de 80 V y se dejó correr por aproximadamente una hora.

Amplificación de los receptores de etileno

Para la amplificación de fragmentos de los genes que codifican para los receptores de etileno primeramente se utilizaron iniciadores degenerados reportados por Trainotti *et al.*, (2005) (ReET-Fw y ReET-Rw), modificados en nuestro laboratorio. Los iniciadores de Trainotti fueron diseñados con base a la secuencia de aminoácidos del dominio GAF del receptor *ETR1* de *Arabidopsis* y otras plantas. En nuestra investigación los iniciadores de Trainotti fueron modificados agregándoles inosina en las posiciones donde incluan más de una base nucleotídica, para permitir el alineamiento entre cualquiera de los cuatro posibles nucleótidos. Por otro lado, también se diseñaron otros iniciadores degenerados para el gen *ERS1* con base en las regiones conservadas de los receptores de etileno de las plantas *A. thaliana* (GeneBank NM_129658),

tomate (AF043084), pera (AF386515) y durazno (AY061640) (Tabla 1). Los oligonucleótidos se sintetizaron y purificaron por Sigma-Genosys (EE.UU.).

A las reacciones de amplificación se les agregó 5 μ L de solución de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM), 3 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 0.5 μ L de cada oligonucleótido (100 pmol/ μ L), 1 μ L de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 μ L de gDNA (100 ng/ μ L) como molde y 2.5 U de DNA polimerasa Taq (Invitrogen) en un volumen final de 50 μ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador DNA ENGINE PTC-200 (MJ Research), programado para iniciar a 94°C por 3 min., seguido de 25 ciclos a 94°C, 45 s; 50°C, 30 s; 72°C, 2 min, para terminar con una extensión final de 72°C por 7 min.

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con la solución TBE 0.5X (Tris-borato 0.045 M, pH 7, EDTA 0.001 M). Se analizaron 5 μ L de las reacciones de PCR, con 1 μ L de solución de carga 6X y como estándar de masa molecular λ DNA/Hind III- Φ X174/Hae III (Promega) ó 1 Kb plus ladder (Invitrogen). El gel fue preteñido con bromuro de etidio con una concentración de (1 mg/mL) y se fotografió en un transiluminador UV con una cámara digital (Kodak, USA).

Amplificación a partir de cDNA sintetizado de tejido de embrión de mango

Para la amplificación por PCR se utilizó como templado 150 ng de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 s, seguida de 2 min a 50-55°C (dependiendo de la T_m de los iniciadores) y una temperatura de extensión de 72°C por 2 min y finalmente 5 minutos a 72°C como extensión final de los productos de PCR.

Tabla 1. Iniciadores utilizados en la clonación del gen *ERS1*

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'
<i>ERS15-Fw</i>	GITGTGACTGCATTGAIC
<i>ERS13-Rw</i>	CCAIATGTGACCTICCAT
MIERS-Fw*	TCCAAATCAGCGATTGGC
MIERS-Rw*	GCCAATCGCTGATTTGGA
MIERS1- Fw	ATGGAGTCITGTGATTGC
MIERS4- Rw*	CTACTCTTTAGAACTGTCTC
MIERS3- Fw*	GCGCTGTAATGAACCATG
MIERS5- Fw*	GACTTGCCATTAGCAGAAGG
MIERS2- Rw*	GCGGAAATCATTTCGAGC
ERS1Mi 1F*	CTTGAGTGTTGCGTTGTGGATG
ERS1Mi 2F*	GGAGAGATCATGAGTTGG
ERS1Mi 1R*	GTGAAGATTGAATGGTCC
ERS1Mi 2R*	GCCACTTGCAGATTGAAC
ERS1Mi 3R*	ACCTGCCATGAGATTGAC

* Iniciadores específicos diseñados a partir de secuencias obtenidas en el laboratorio. I= Inosinas.

Clonación, secuenciación y análisis de los fragmentos amplificados

Los amplicones obtenidos con las diferentes combinaciones de iniciadores fueron clonados en el vector de clonación pCR®2.1 con el sistema de clonación T-A (TA Cloning, Invitrogen, Carlsbad, CA). Este plásmido contiene un sitio múltiple de clonación, el promotor T7, genes de resistencia a kanamicina y ampicilina y además el gen *LacZ* que codifica para la subunidad α de la β -galactosidasa. Cuando la secuencia del gen *LacZ* se interrumpe por una secuencia nucleotídica (inserto), la bacteria no produce la β -galactosidasa y crecen colonias de color blanco en el medio, en presencia del sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido). Para llevar a cabo la clonación, primero se hizo la reacción de ligación de los productos amplificados por PCR, seguida por la transformación de bacterias quimiocompetentes *E.coli* TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los clones obtenidos fueron identificados por medio

de PCR de colonia y por digestiones con la enzima de restricción *EcoRI* para verificar la presencia del inserto. Los clones seleccionados fueron secuenciados por el método de terminación de cadena con dideoxidos (Sanger *et al.*, 1997) en el LGATC (Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core) de la Universidad de Arizona. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas usando el algoritmo BLAST (Altschull *et al.*, 1990), del Nacional Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y el algoritmo T-Coffee (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) (Notredame *et al.*, 2000).

Evaluación de la expresión génica de los genes *ETR1* y *ERS1*

Extracción de RNA total

Se obtuvo RNA total de mesocarpio de mango con el sistema de reactivos comercial RNeasy (QIAGEN, USA) y se calculó la concentración por A_{260} en un espectrofotómetro modelo NANODROP ND-1000 UV-Vis. También se estimó la calidad del RNA por medio de la relación A_{260}/A_{280} .

RT-PCR en tiempo real de los genes *ETR1* y *ERS1*

Para evaluar la expresión de los genes *ETR1* y *ERS1* se utilizó RT-PCR (transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real (QRT-PCR) con el sistema de reactivos comercial FullVelocity SYBR Green QRT-PCR (Stratagene, USA). Se diseñaron iniciadores específicos para los genes *ETR1* y *ERS1* que codifican para dos receptores de etileno, además de iniciadores del gen gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH, por sus siglas en inglés), el cual se utilizó para normalizar los datos de expresión (Tabla 2).

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA de los receptores y el gen control GAPDH, se incubó el RNA total con la transcriptasa inversa StrataScript

a 50 °C por 30 min. Para la PCR se mezclaron 2.5 µL de cada iniciador (1 pmol/µL), 0.375 µL de la dilución del fluoróforo SYBRGreen (30 nM), 12.5 µL de la mezcla de reacción y 0.0625 µL de RT/RNasa StrataScript. Después de agregar la enzima se procedió a aforar la mezcla de reacción a 25 µL totales con agua libre de nucleasas. Se agregó 1 µL de RNA total de una concentración de 10 ng/µL. El programa utilizado consistió de un ciclo inicial de 15 min con una temperatura de 50°C, posteriormente un ciclo de 5 min a 95°C y 50 ciclos de 10 segundos y 30 segundos a 95°C y 60°C, respectivamente. Se corrió en un termociclador SmartCycler® (Sunnyvale, CA, USA). El análisis de datos se realizó con el software LinRegPCR (analysis of real-time quantitative PCR data) de BioTechniques (Ruijter, 2004), basado en el cálculo de eficiencias de la reacción de PCR en tiempo real (RTQ-PCR). La medición de la expresión se realizó por triplicado, graficándose el promedio y el error estándar de los datos.

Tabla 2. Iniciadores específicos usados para evaluar la expresión de *ERS1* y *ETR1* por qRT-PCR

NOMBRE	Temp. Fusión (°C)	SECUENCIA	Residuo de aa's
RT-ERS1-F	62.6	5'CTTTGATAAAGCCAATCGCA 3'	Dominio receptor de señal REC (ALTGNTD)
RT-ERS1-R	62	5'GTAAATTTACAGCGTTGCC3'	Dominio receptor de señal REC (RVLFEAI)
RT-ETR1-F	63.6	5'AATATATGCCTGGCGAGGTG3'	Dominio GAF (KYMPGEV)
RT-ETR1-R	63.5	5'TGCACTATCTGAGGGAAGCA3'	Dominio GAF (MLPSDSA)
MIGAPDH	62.8	5'GTGGCTGTAAACGATCCCTT3'	
MIGAPDH	63	5'GTGACTGGCTTCTCATCGAA3'	

Análisis estadístico

A los resultados de cada variable (producción de CO₂, color y actividad de PG) se les realizó un análisis de varianza simple (diseño completamente al azar), y las medias se compararon con la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$). El análisis estadístico de los datos se hizo utilizando el software NCSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de CO₂, color y actividad de poligalacturonasa en los mangos en diferentes etapas de desarrollo

Los resultados de la evaluación de la respiración de los mangos 'Kent' en las distintas etapas de desarrollo se presentan en la Figura 5. En las etapas tempranas de desarrollo del fruto (106 y 126 DDF) se observaron diferencias significativas en la producción de CO₂, a los 106 DDF los valores fueron de 50 mL de CO₂/Kg-h, posteriormente a los 122 DDF esos valores disminuyeron significativamente hasta 25 mL de CO₂/Kg-h ($p \leq 0.05$). A los 189 DDF la tasa respiratoria se incrementó al doble mostrando valores de 60 mL de CO₂/Kg-h, manteniéndose los niveles altos durante la madurez comercial con un valor de 65 mL de CO₂/ Kg-h. Estos resultados son similares a lo reportado por Akamine y Goo (Akamine y Goo, 1973), quienes estudiaron el proceso de respiración y producción de etileno durante el desarrollo de frutos de mango y reportaron un decremento en la producción de CO₂, en etapas de desarrollo del fruto cercanas al cese del proceso de elongación celular. Los mismos autores encontraron que los niveles de CO₂ vuelven a incrementarse en las etapas de maduración, lo cual coincide con los datos obtenidos a los 189 DDF y en madurez comercial (MC). El aumento en los valores de CO₂ en frutos en estas dos últimas etapas (madurez fisiológica y madurez comercial) se debe a la aceleración del metabolismo del fruto, característica del inicio de maduración y del pico climatérico. Según Hardenburg (1986), los frutos de mango almacenados a 20°C, producen alrededor de 113 mL de CO₂/Kg-h. Sin embargo, esto depende de la variedad y temperatura a la cual sean almacenados. El incremento en la tasa respiratoria provoca un rápido deterioro del fruto, el cual se ve reflejado en su calidad.

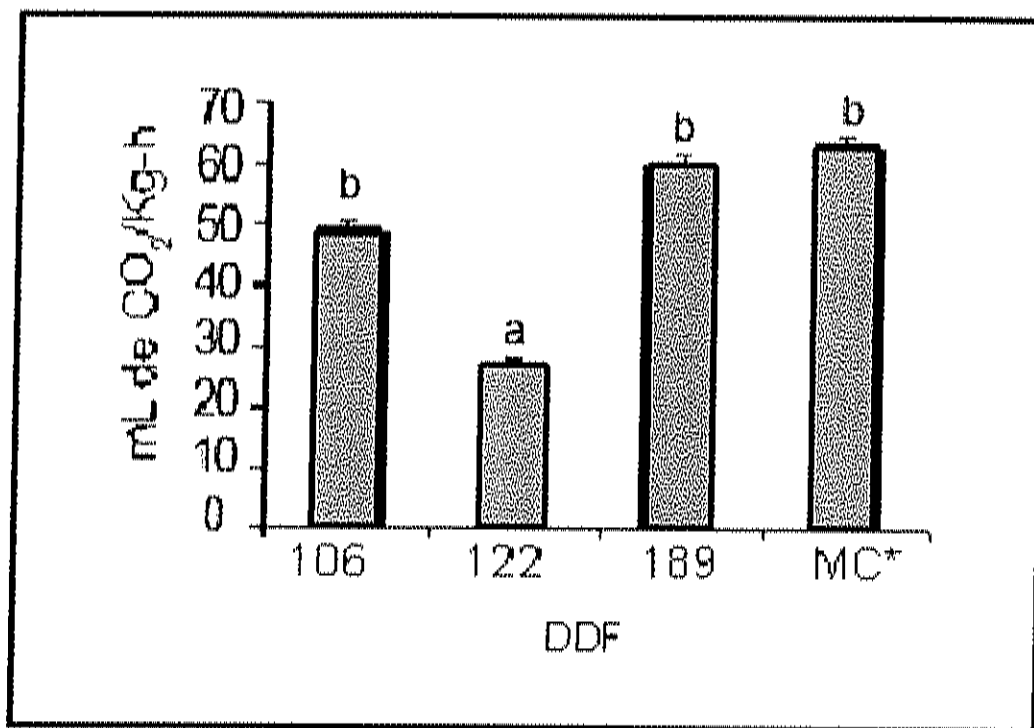


Figura 5. Producción de CO₂ de los frutos de mango 'Kent' cosechados a los 106, 122 y 189 días después de floración (DDF). MC*: mangos de 189 DDF almacenados a 20°C hasta alcanzar madurez comercial. Diferente literal indica diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Duncan $p \leq 0.05$).

La Figura 6 muestra los valores de croma y ángulo de tono de la pulpa de los mangos en las diferentes etapas evaluadas. Los frutos recolectados a los 106 DDF y 122 DDF presentaron valores de ángulo de tono similares entre ellos, los cuales fueron mayores a los de 189 DDF y MC* ($p \leq 0.05$). El ángulo del tono de la pulpa de los frutos cosechados a los 106 DDF y 122 DDF se ubican en el área de color verde y los de 189 DDF y MC* en el área de color amarillo. La coloración verde típica de frutos inmaduros, indica que los frutos cosechados a los 106 y 122 DDF contienen clorofila, a diferencia de los frutos cosechados a los 189 DDF y MC* (Mitcham y McDonalds, 1992). En el caso de los mangos recolectados a los 189 DDF y a los madurados en condiciones de almacenamiento (MC*), se observa una disminución del ángulo del tono con valores de 96° y 90°, respectivamente. Estos valores indican la degradación de la clorofila y la consecuente revelación de pigmentos como los carotenoides y xantofilas, correspondientes a estados de madurez fisiológica (189 DDF) y madurez comercial (MC*).

En lo que respecta a los valores de croma obtenidos para los mangos de cada una de las etapas evaluadas, estos se incrementaron significativamente conforme el fruto avanzaba en su desarrollo, mostrando valores significativamente menores a los 106 DDF y 122 DDF que a los 189 DDF y madurez comercial (MC*). Lo anterior indica que en las primeras etapas de desarrollo del fruto (106 y 122 DDF) el tono del color verde era pálido, y conforme el fruto avanzaba en su maduración el color se intensificó (Figura 7).

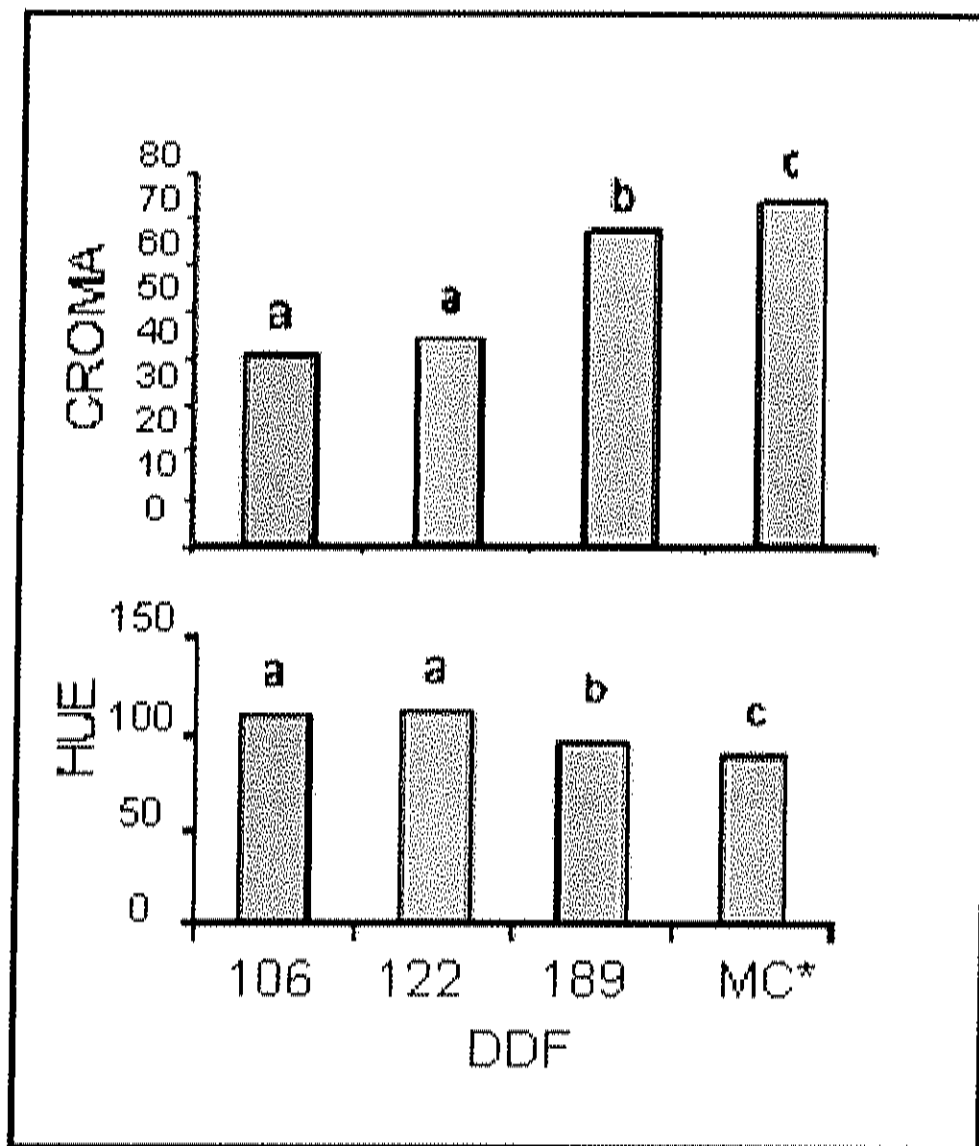


Figura 6. Cromo y ángulo de tono (°HUE) de mango 'Kent' en diferentes etapas de desarrollo. MC*: mangos de 189 DDF almacenados a 20°C hasta alcanzar madurez comercial. Diferente literal indica diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

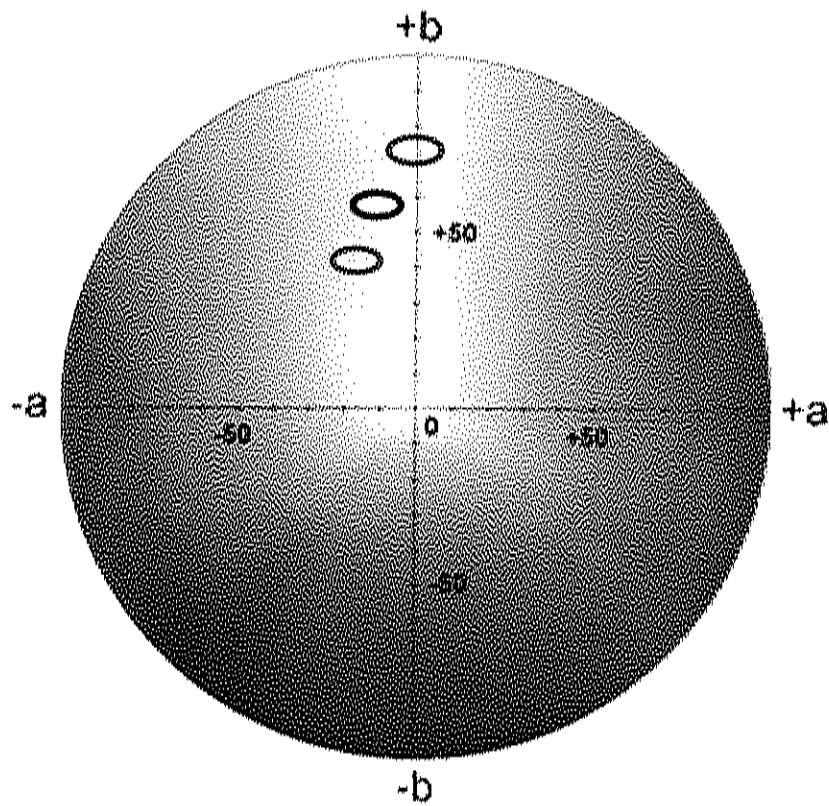


Figura 7. Ubicación de los valores de ángulo de tono y croma de los mangos muestreados en las diferentes etapas de desarrollo. Círculo azul: 106 y 102 DDF; Círculo negro: 189 DDF; Círculo rosa: Madurez comercial (MC*).

Actividad específica de poligalacturonasa (PG)

Los niveles de actividad específica de PG en los mangos evaluados en esta investigación se presentan en la Figura 8, los cuales se incrementaron significativamente al avanzar el desarrollo del fruto ($p \leq 0.05$). Los valores más bajos fueron para los mangos inmaduros de la etapa de 106 DDF, mientras que los más altos fueron para mangos maduros (MC*) ($p \leq 0.05$). Los valores de actividad específica (Unidades / mg de proteína) de PG estuvieron en un rango de 1.46 a 7.0. Anteriormente se ha reportado que en frutos climatéricos (tomate, pera y mango) se observa un incremento constante en la actividad de PG a medida que avanza la maduración (Grierson y Tucker, 1983; Pressey y Avants, 1976; Yashoda *et al.*, 2006).

En nuestro estudio se observó que la actividad de PG aumentó conforme el fruto avanzaba en su desarrollo, mostrando valores máximos de actividad durante la madurez comercial. Lo anterior coincide con lo reportado anteriormente para frutos de mango, los cuales también presentaron el máximo de actividad en frutos maduros y se presume que PG es una enzima inducida por etileno (Diaz-Sobac *et al.*, 1997; Mitcham y McDonalds, 1992; Roe y Bruemmer, 1981; Ketsa *et al.*, 1999; Lohani *et al.*, 2004; Prasanna *et al.*, 2004; Prasanna *et al.*, 2003).

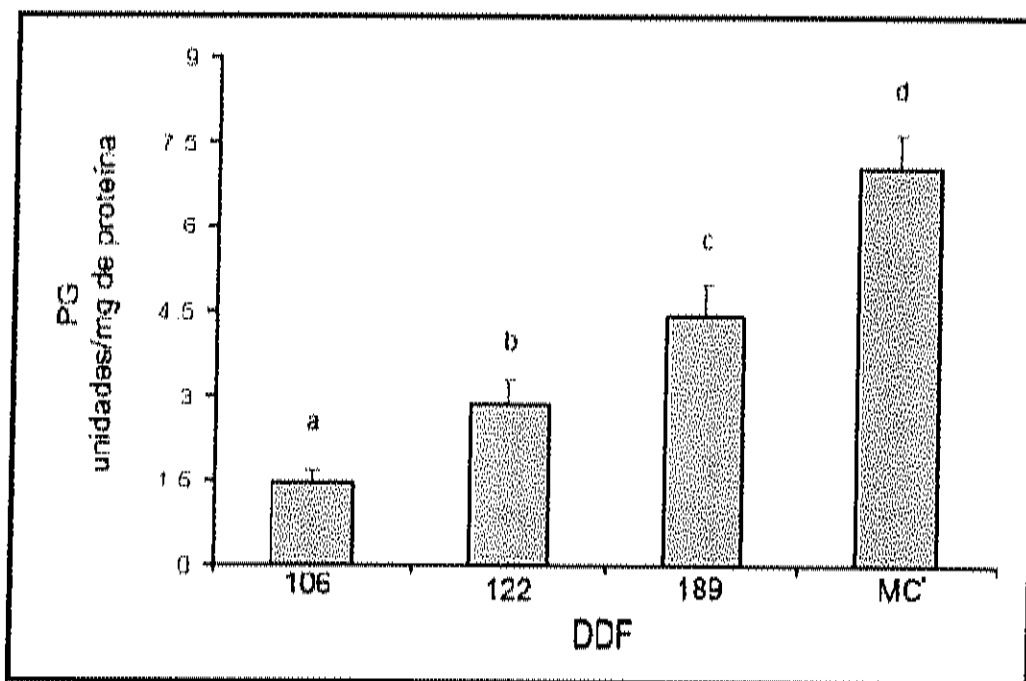


Figura 8. Actividad específica de la enzima poligalacturonasa (PG) en mesocarpio de mango de cada una de las etapas de desarrollo. DDF, días después de floración. MC*: mangos de 189 DDF almacenados a 20°C hasta alcanzar madurez comercial. Diferente literal indica diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

Todos los indicadores evaluados (producción de CO₂, actividad de poligalacturonasa y color) indican que los frutos de mango se encontraban en dos estados previos a la madurez fisiológica (106 y 122 DDF), uno en madurez fisiológica (189 DDF) y otro en madurez comercial (MC*).

Clonación del receptor de etileno ERS1 de mango

El gDNA obtenido de las hojas de mango fue analizado por electroforesis en geles de agarosa y posteriormente cuantificado. Una vez determinada su concentración y pureza fue utilizado como molde en reacciones de PCR, en un primer esfuerzo de clonación de genes que codifican para receptores de etileno de frutos de mango. Mediante la utilización de iniciadores degenerados de Trainotti modificados en nuestro laboratorio, se logró amplificar varias bandas de aproximadamente 500 pb (carril 4), 600 pb (carril 3) y 1000 pb (carril 2), las cuales fueron clonadas en el plásmido pCR2.1 (Figura 9) y secuenciadas para su identificación.

La secuencia nucleotídica de estos clones presentó similitud con genes que codifican para tres distintos receptores de etileno presentes también en otras plantas y frutos (Altschull *et al.*, 1990). El clon de 1000 pb presentó similitud con genes que codifican para el receptor de etileno ETR1 de plantas y frutos, mismo que en mango ya fue clonado (López-Gómez y Gómez-Lim, 1992). El clon de 400 pb corresponde al gen *ETR2*, miembro de la subfamilia 2 dentro de la clasificación de los receptores de etileno en *A. thaliana*, mientras que el clon recombinante de 600 pb presentó similitud con el gen *ERS1* identificado en otras plantas y frutos (Altschull *et al.*, 1990). Estos resultados muestran que en mango existe más de una isoforma de receptores de etileno, lo cual se esperaba porque en otros frutos se han identificado varias isoformas.

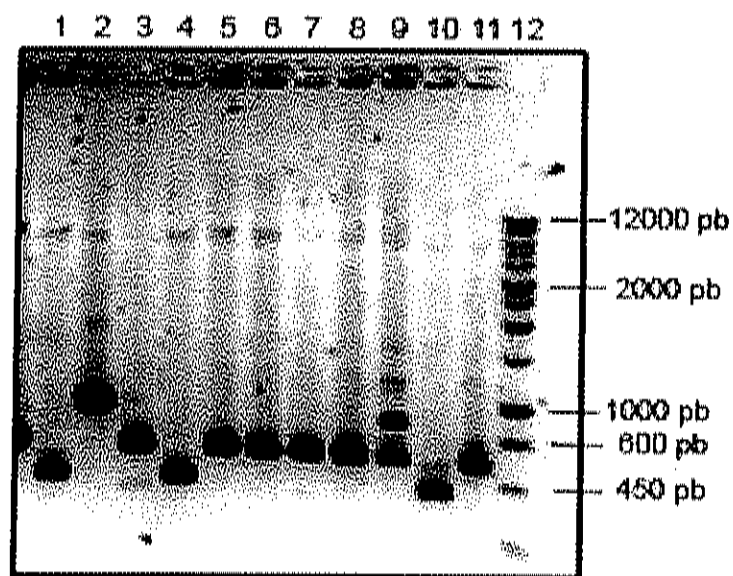


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los PCR de colonia de clones obtenidos con los iniciadores degenerados. Carriles 1-11 clones recombinantes de los receptores de etileno y Carril 12: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

Por otro lado, para la obtención de la región codificante completa del gen *ERS1* se sintetizó cDNA partiendo de RNA extraído de embriones de mango. En el análisis del RNA (Figura 10) se aprecian las dos bandas del rRNA, el cual es un indicador de la integridad del RNA y se puede utilizar en pasos posteriores. El cDNA se utilizó como molde en las reacciones de PCR utilizando combinaciones de los iniciadores diseñados, para obtener más fragmentos del gen *ERS1*, corriente arriba y corriente abajo del fragmento clonado.

La secuencia de los clones de *ERS1* obtenidos con estas amplificaciones fueron analizadas y se procedió a hacer un traslape de las secuencias nucleotídicas obtenidas resultando en un fragmento de 1173 pb. Una vez obtenido este fragmento se diseñaron iniciadores específicos ubicados en la región 5' y 3' para amplificar en una sola reacción el producto de 1173 pb. En la Figura 11 se observa la amplificación del fragmento de 1173 pb lo cual indica que los fragmentos obtenidos corresponden a un receptor de etileno, es decir que no son pedazos de varios de ellos. El fragmento de 1173 pb se clonó en el pCR2.1 y fue secuenciado como se describió anteriormente.

A partir de la secuencia nucleotídica se dedujo, mediante algoritmos bioinformáticos, que el fragmento de 1173 pb codifica para 391 aminoácidos. Ésta secuencia deducida de aminoácidos presenta porcentajes de identidad hasta de 76% con los receptores *ERS1* de frutos como: pera, durazno, maracuyá, melón, pérsimo y papaya (Altschull *et al.*, 1990). Sin embargo, el porcentaje de identidad con el receptor *ERS1* de la planta modelo *A. thaliana* fue de 69% y con el del fruto modelo *S. lycopersicum* (tomate) fue de 68% (Tabla 3). Estos porcentajes de identidad indican que el gen *ERS1* de mango es más similar a *ERS1* de los frutos tropicales como papaya y maracuyá y al *ERS1* de frutos templados como durazno, pera y melón; que al *ERS1* del tomate y de la planta modelo de estudio *A. thaliana*.

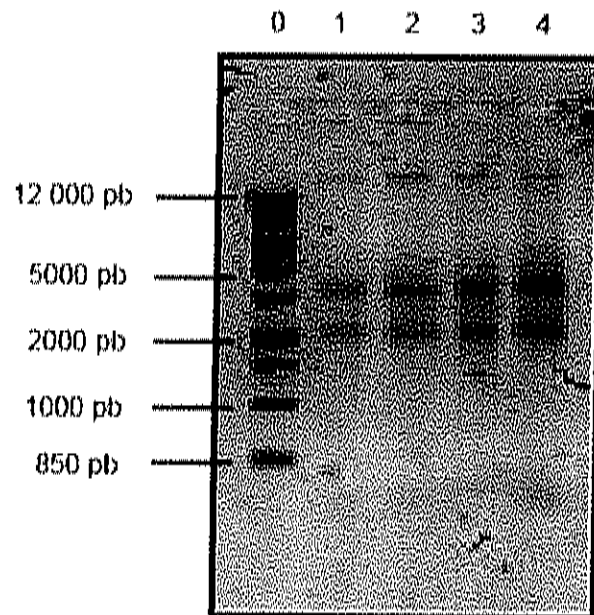


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de RNA extraído de embriones de mango. Carril 0: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder. Carriles 1-4: RNA extraído de embriones de mango.

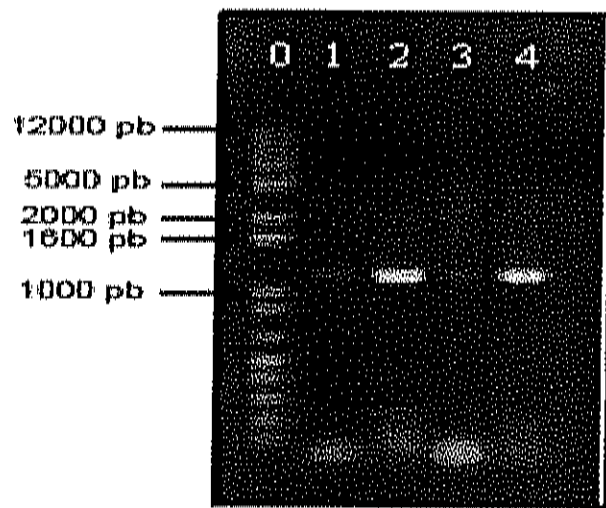


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del fragmento de 1173 pb del receptor *ERS1* obtenido a partir de cDNA de hueso de mango. Carril 0: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder. Carriles 1-4: fragmento de 1173 pb del gen receptor *ERS1*

Tabla 3. Porcentajes de identidad del fragmento del receptor *ERS1* de mango con *ERS1* de otros frutos climatéricos y la planta modelo *A. thaliana*

Fruto	Numero de acceso GeneBank	% de Identidad
<i>A. thaliana</i>	NM_129658	69
Tomate	U38666	68
Pera	AAL66197	72
Papaya	AF311942	75
Melón	AF037368	70
Maracuyá	AB015497	74
Pérsimo	AB164038	72
Durazno	AY061640	76

Al analizar la secuencia de aminoácidos deducida para *ERS1* se identificaron dominios presentes en otros receptores de etileno, tales como el dominio GAF y el de histidina cinasa (Figura 12). El dominio de histidina cinasa (HK) resultó ser un dominio híbrido (fusión de los dominios de la histidina cinasa y del regulador de respuesta), similar a los dominios encontrados en las proteínas *ATHK1*, *ETR1* y *ERS1* de *A. thaliana* y *HKRr* de *Catharantus roseus* (Figura 13) (Aizawa *et al.*, 2000; Urao *et al.*, 1999). El dominio de histidina cinasa se caracteriza por poseer los residuos His, Asn, Gly, Phe y Asn distribuidos en el dominio, mismos que están presentes en los receptores de la subfamilia-1 de *A. thaliana* y en *S. lycopersicum*. El fragmento clonado del gen *ERS1* de mango también presenta esta secuencia característica de aminoácidos, lo cual indica que debería tener actividad de histidina cinasa. Esto podría comprobarse experimentalmente sobreexpresando la proteína en levaduras, tal como se ha hecho con otros receptores de etileno de frutos y plantas (Klee y Tieman, 2002).

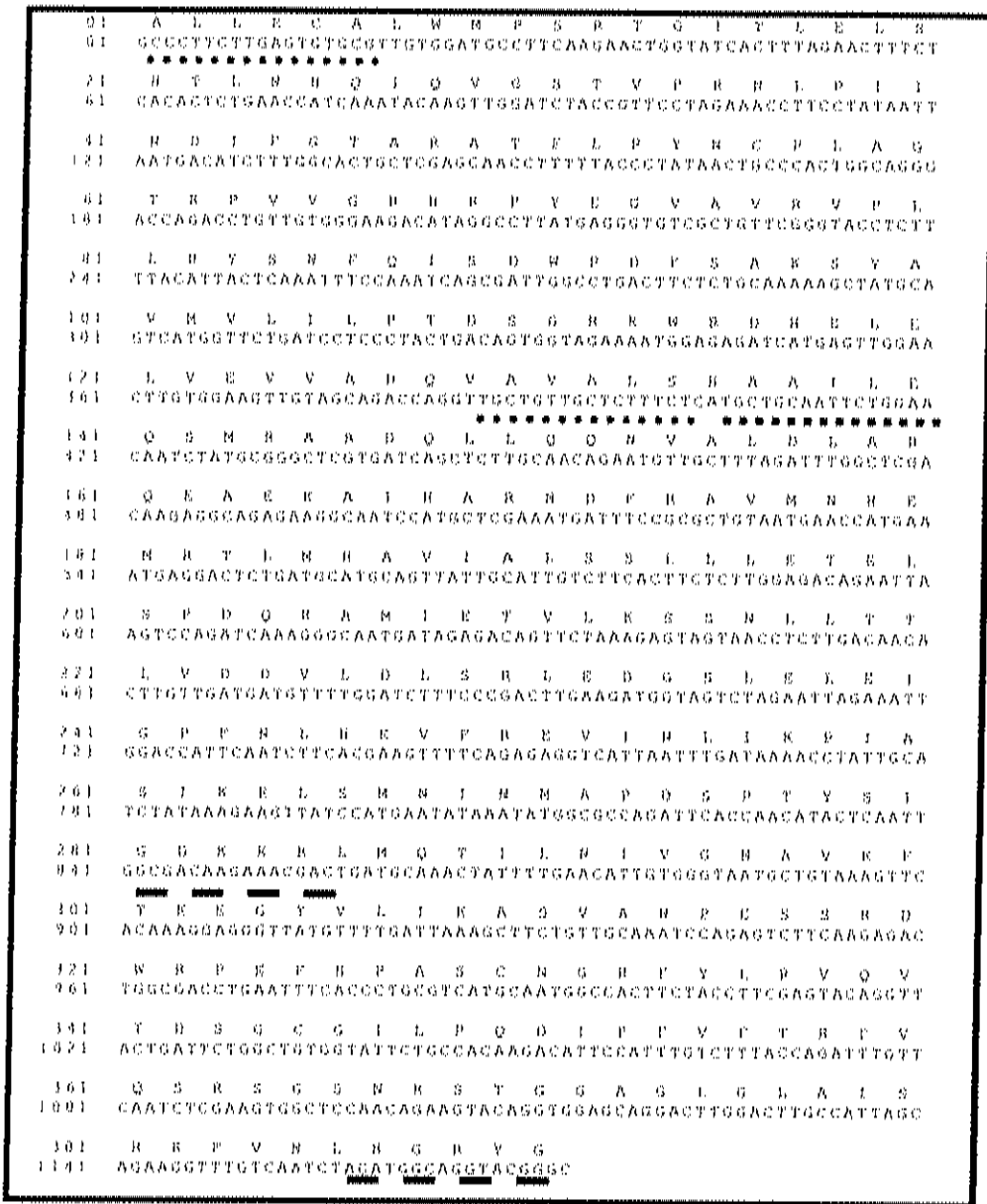


Figura 12. Secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos deducida del fragmento clonado (*ERS1*). El inicio y final del dominio GAF se indica con la línea (.....). El inicio del dominio híbrido de histidina cinasa se indica con la línea (-.....-). El inicio y final del dominio HATPasa con la línea (— — —).

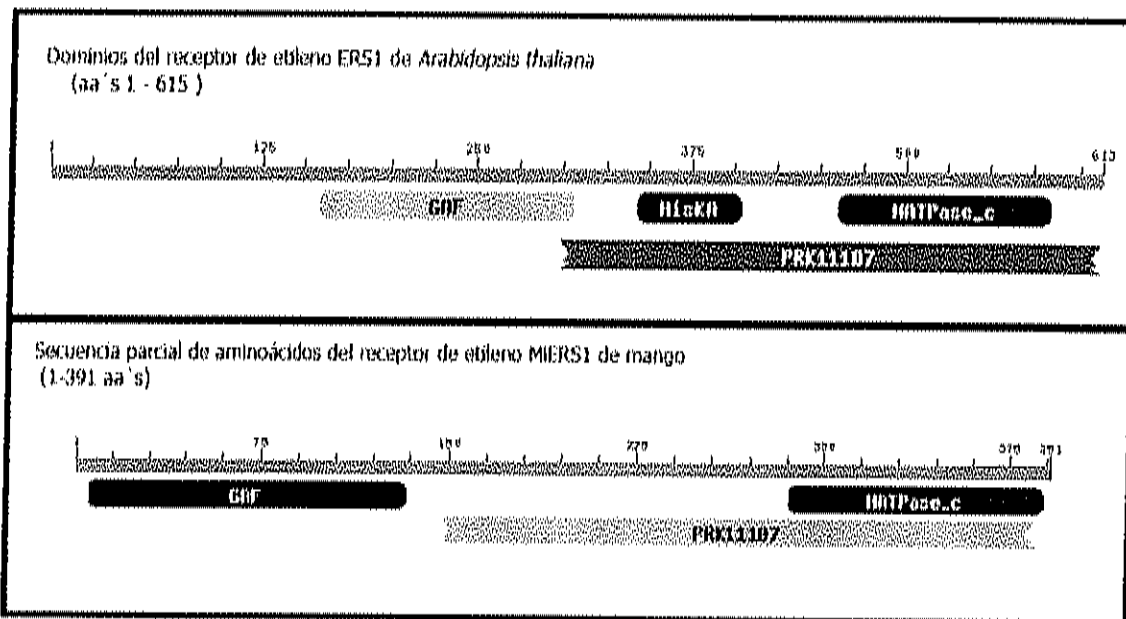


Figura 13. Predicción de dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de ERS1 de mango 'Kent'. GAF: el dominio de unión de GMP cíclico; HATPase-c: dominio de unión de ATP; PRK11107: dominio híbrido de histidina cinasa.

Los dominios híbridos de histidina cinasa-regulador de respuesta han sido identificados tanto en procariontes (bacterias) como en eucariontes (plantas, levaduras y hongos) y se ha encontrado que su secuencia de aminoácidos es muy conservada. Según Cock y Whitworth (Cock y Whitworth, 2007), la presencia de los híbridos de histidina cinasas se debe a las múltiples hélices transmembranales que presenta la proteína y esta fusión incrementa la velocidad y eficiencia de la transducción de la señal, misma que en los receptores de etileno pudiera ser requerida para las respuestas inmediatas de la planta a diversos factores bióticos y abióticos que promuevan un incremento en la síntesis de la hormona.

Falta clonar la secuencia del dominio de unión a etileno del gen *ERS1* de mango para tener la secuencia nucleotídica del gen completo y de aminoácidos de la proteína ERS1. Es factible que al obtenerse la secuencia completa del gen, se incremente la identidad del gen *ERS1* de mango con los genes *ERS1* de otros frutos, puesto que el dominio de unión a etileno también está muy conservado entre los integrantes de esta familia de receptores (Schaller y Bleecker, 1995). Utilizando la técnica de amplificación rápida de extremos (RACE, por sus siglas en inglés) se intentó amplificar, sin éxito, los extremos 5' y 3' del gen *ERS1* de mango. Posteriormente se encontró que los niveles de expresión de este gen son muy bajos en los frutos de mango.

Expresión de los genes *ETR1* y *ERS1* de mango

Para tratar de entender la función de los receptores de etileno *ETR1* y *ERS1* en la maduración de frutos de mango, se evaluaron los niveles de expresión en los 4 estados de desarrollo (106, 122, 189 DDF y MC*). Los valores de expresión fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo que codifica para la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*GADPH*, por sus siglas en inglés) obtenido en una genoteca creada en el laboratorio anteriormente. En mangos cosechados a los 106, 122 y 189 DDF, la expresión

de *ETR1* fue similar con valores relativos de 0.6 a 1.1. Sin embargo, en mangos en estado de madurez comercial (MC*) la expresión de *ETR1* se incrementó más de dos veces que en las otras 3 etapas (Figura 14).

Los resultados de expresión diferencial de *ETR1* de mango, difieren con lo reportado para otros frutos climatéricos, en los cuales la expresión de *ETR1* fue similar en distintas etapas de crecimiento y maduración, como el durazno (*Prunus persica*), manzana (*Malus doméstica*), pèrsimo (*Diospyus kaki*), tomate (*Solanum lycopersicum*), pera (*Pyrus communis*) y el fruto de la pasión (*Passiflora edulis*) (Bassett *et al.*, 2002; Lashbrook *et al.*, 1998; Mita *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2007; Rasori *et al.*, 2002), por lo que se ha considerado al gen *ETR1* como un gen constitutivo en los frutos mencionados.

Por otro lado, los resultados de la expresión de *ETR1* en mango, son similares al patrón de expresión reportado para el gen *CmETR1* en melón (*Cucumis melo*) y para *ETR1* en mango 'Ataulfo' (*Mangifera indica L.*). En ambos frutos los niveles de expresión de *ETR1* varían durante todo el desarrollo del fruto, siendo el incremento más evidente en las etapas de madurez fisiológica y madurez comercial, en las cuales se incrementa la síntesis de etileno en el fruto (Gómez-Lim, 1992; Gutierrez-Martínez *et al.*, 2001; Sato-Nara *et al.*, 1999). Así los resultados obtenidos sugieren que la expresión de *ETR1* de mango pudiera estar relacionada con la cantidad de etileno presente en el fruto y que la expresión de este gen estaría estrechamente relacionada con la regulación de la producción de etileno al inicio de la maduración.

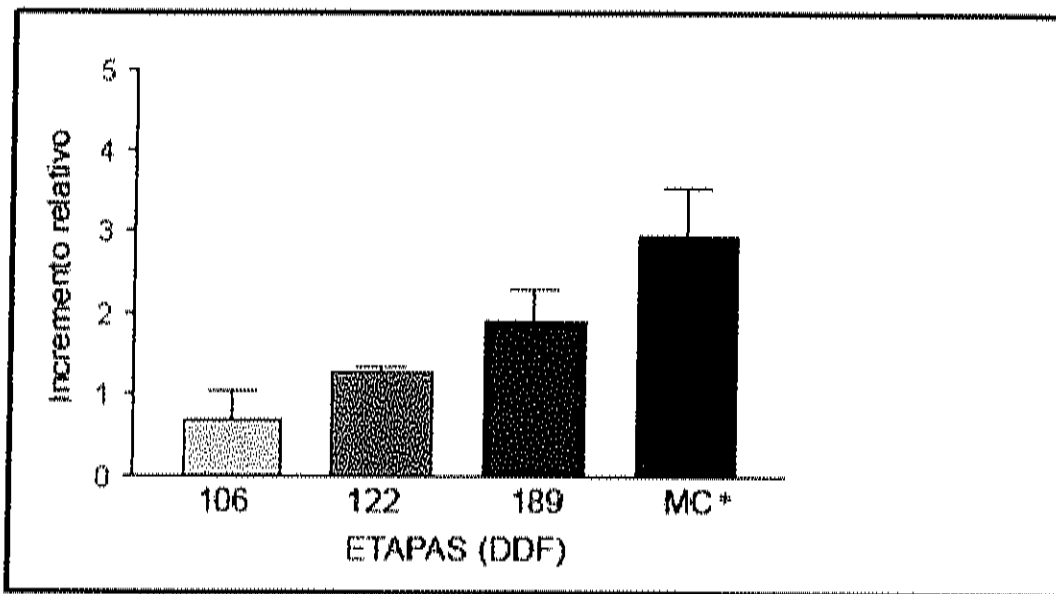


Figura 14. Expresión del gen que codifica para el receptor de etileno ETR1 de mango en 4 etapas de desarrollo. La medición se evaluó por triplicado, graficándose el promedio y el error estándar.

Los resultados de la expresión de *ERS1* en mango se muestran en la Figura 15. Los niveles de expresión fueron muy bajos comparados con los niveles de expresión de *ETR1*. En mangos de 106 DDF, los niveles relativos de expresión evaluados para *ERS1* fueron de 0.05 y en los mangos recolectados a los 122 y 189 DDF, los valores de expresión disminuyeron a valores de 0.01 y 0.03, respectivamente. En la etapa de madurez comercial se observó el valor máximo de expresión para *ERS1* (0.45), el cual aumentó casi 10 veces comparado con los valores de expresión en las otras tres etapas del desarrollo.

El-Sharkawy y colaboradores (El-Sharkawy *et al.*, 2003) reportaron que al analizar la expresión de *ERS1* en frutos de melón y pèrsimo, en etapas de elongación y de inicio de maduración se observó un patrón de expresión parecido al encontrado para *ERS1* en mango. En las primeras etapas de crecimiento, los niveles de expresión se mantuvieron constantes, se incrementaron al inicio del proceso de maduración, sugiriendo que el perfil de expresión se encuentra relacionado con la cantidad de etileno presente en los frutos analizados (El-Sharkawy *et al.*, 2003; Fernandez-Otero *et al.*, 2007; Sato-Nara *et al.*, 1999). Al comparar los niveles de expresión de *ETR1* y *ERS1* de mango, se observó que *ETR1* se expresó 3.5 veces mas que *ERS1*, observándose que el nivel mínimo en la expresión de *ETR1* correspondió al nivel máximo de expresión del gen *ERS1*.

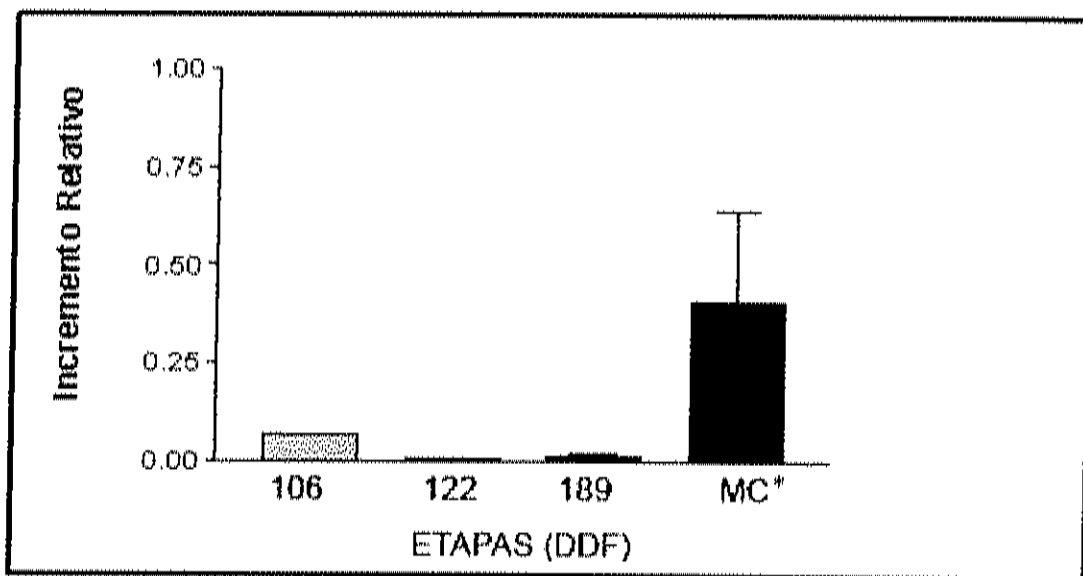


Figura 15. Expresión del gen que codifica para el receptor de etileno ERS1 de mango en las 4 etapas de desarrollo. La medición se evaluó por triplicado, graficándose el promedio y el error estándar.

CONCLUSIONES

Se logró clonar un fragmento de 1173 pb del receptor de etileno ERS1 de mango a partir de cDNA. Este fragmento codifica para 391 aminoácidos, su secuencia presenta un porcentaje de identidad de 69 % con el homólogo de la planta modelo *A. thaliana* y alrededor del 73 % con ERS1 de otros frutos climatéricos como pera, papaya, durazno y fruto de la pasión. El fragmento del receptor amplificado presenta un dominio GAF, un dominio híbrido de histidina cinasa que contiene el núcleo catalítico de actividad de histidina cinasa y el dominio regulador de respuesta, los cuales también están presentes en los receptores de etileno caracterizados en otras plantas y frutos.

La expresión de los genes que codifican para los receptores de etileno ETR1 y ERS1 varía durante el desarrollo del mango 'Kent'. El gen *ERS1* de mango presentó un patrón de expresión similar al *ERS1* de otros frutos climatéricos. En ambos genes la expresión se incrementó durante el desarrollo, siendo mayor la expresión de *ETR1*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A. y O'Connell, P.O. (2002). Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2073-2087.
- Aizawa, S.I., Harwood, C.S. y Kadner, R.J. (2000). Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *The Journal of Bacteriology*. 182: 1459-1471.
- Akamine, E. y Goo, T. (1973). Respiration and ethylene production during ontogeny of fruit. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 98: 381-383.
- Altschull, S.F., Gish, G., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Aravind, L. y Ponting, C.P. (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in Biochemical Science*. 22: 458-459.
- Avilán, L., Rodríguez, M. y Ruiz, J. (1998). Cosecha. El Cultivo del Manguero en Venezuela. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Editorial FONAIAP, Maracay, Venezuela, 185-196.
- Bassett, C.L., Artlip, T.S. y Callahan, A.M. (2002). Characterization of the peach homologue of the ethylene receptor, PpETR1, reveals some unusual features regarding transcript processing. *Planta*. 215: 679-688.
- Bleecker, A.B., Esch, J.J., Hall, A.E., Rodríguez, F.I. y Binder, B.M. (1998). The ethylene-receptor family from *Arabidopsis*: structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 353: 1405-1412.

- Bleecker, A.B. y Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 16: 1-18.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bramley, P.M. (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2107-2113.
- Brummell, D. (2005). Regulation and genetic manipulation of ripening in climacteric fruit. *Stewart Postharvest Review*. 3: 1-19.
- Brummell, D., Dal Cin, V., Crisosto, C. y Labavitch, J. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2029-2039.
- Brummell, D.A., Howie, W.J., Ma, C. y Dunsmuir, P. (2002). Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin. *Postharvest Biology and Technology*. 25: 209-220.
- Chen, Y.F., Randlett, M.D., Findell, J.L. y Schaller, G.E. (2002). Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 19861-19866.
- Cock, P.J. y Whitworth, D.E. (2007). Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 2355-2357.
- Czarny, J.C., Grichko, V.P. y Glick, B.R. (2006). Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants. *Biotechnology Advances*. 24: 410-419.

- Dal Cin, V., Danesin, M., Boschetti, A., Dorigoni, A. y Ramina, A. (2005). Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borck). *Journal of Experimental Botany*. 56: 2995-3005.
- Diaz-Sobac, R., De La Cruz, J., Vazquez-Luna, A. y Beristain, C.I. (1997). Evaluation of softening and associated enzyme activities during the ripening of coated 'Manila' mangoes. *Journal of Horticultural Science*. 72: 749-753.
- Edwards, R. y Gatehouse, J.A. (1999). Secondary metabolism. Chapter 8. In : *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. P.J. Lea y Leegoo R.C. Editorial Wiley, 2nd. Edition. West Sussex, England. p: 193-218.
- El-Sharkawy, I., Jones, B., Lelièvre, J.M. y Latché, A. (2003). Isolation and characterization of four ethylene receptor elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement. *Journal of Experimental Botany*. 54: 1615-1625.
- EMEX, A. (2006). Empacadoras de Mango de Exportación, A.C. <http://www.mangoemex.com/> (julio de 2007).
- Fernandez-Otero, C.I., de la Torre, F., Iglesias, R., Rodríguez-Gacio, M.C. y Matilla, A.J. (2007). Stage and tissue-expression of genes involved in the biosynthesis and signalling of ethylene in reproductive organs of damson plum (*Prunus domestica* L. subsp. insilitia). *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 199-208.
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 725-749.
- Gómez-Lim, M. (1992). Mango fruit ripening: Physiology and molecular biology. IV International Mango Symposium 341: 484-499.

- Grefen, C. y Harter, K. (2004). Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*, 219: 733-742.
- Grierson, D. y Tucker, G. (1983). Timming of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. *Planta*, 157: 174-179.
- Gross, K. (1982). A rapid and sensitive method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *HortScience*, 17: 933-934.
- Guo, H. y Ecker, J.R. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 40-49.
- Gutierrez-Martínez, P. López-Gómez, R. y Gómez-Lim, M.A. (2001). Identification of an ETR-1 homologue from mango fruit expressing during fruit ripening and wounding. *Journal of Plant Physiology*, 158: 174-179.
- Hendry, G.A.F. (1999). Plant pigments. Chapter 9. In: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. P.J. Lea y Leegood R.C. Editorial Wiley, 2nd. Edition. West Sussex, England. p: 219-234.
- Islas-Osuna, M., Silva-Moreno, B., Caceres-Carrizosa, N., Garcia-Robles, J., Sotelo-Mundo, R. y Yepiz-Plascencia, G. (2006). Editing of the grapevine mitochondrial cytochrome b mRNA and molecular modeling of the protein. *Biochimie*, 88: 431-435.
- Jiang, Y. y Fu, J. (2000). Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regulation*, 30: 193-200.
- Kader, A.A. (2002). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Oakland, California, University of California. Third edition. 536 p.

- Kader, A.A. (2003). A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). *HortScience*. 38: 1004-1008.
- Kepeczynski, J., Bihun, M. y Kepeczynska, E. (2003). The release of secondary dormancy by ethylene in *Amaranthus caudatus* L. seeds. *Seed Science Research*. 13: 69-74.
- Kepeczynski, J. y Kepeczynska, E. (2005). Manipulation of ethylene biosynthesis. *Acta Physiologiae Plantarum*. 27: 213-220.
- Ketsa, S., Chidtragool, S., Klein, J. y Lurie, S. (1999). Firmness, pectin components and cell wall hydrolases of mango fruits following low-temperature stress. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 74: 685-689.
- Klee, H. y Tieman, D. (2002). The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum*. 115: 336-341.
- Klee, H.J. (2002). Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2057-2063.
- Konica Minolta. (2003) Comunicación precisa de los colores. Konica Minolta Sensing, INC. Control del color de la percepción a la instrumentación. Osaka, Japón. 45p.
- Kuroda, S., Hirose, Y., Shiraishi, M., Davies, E. y Abe, S. (2004). Co-expression of an ethylene receptor gene, *ERS1*, and ethylene signaling regulator gene, *CTR1*, in *Delphinium* during abscission of florets. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 745-751.
- Lalef, H.J.D., Singh, Z. y Tan, S.C. (2003). The role of ethylene in mango fruit aroma volatiles biosynthesis. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 78: 485-496.

- Lashbrook, C.C., Tieman, D.M. y Klee, H.J. (1998). Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant Journal*. 15: 243-252.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. y Reisch, B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species. *Plant Molecular Biology*. 12: 6-13.
- Lohani, S., Trivedi, P. y Nath, P. (2004). Changes in activity of cell wall hydrolases during ethylene-inducing ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology*. 31: 119-126.
- López-Gómez R. y Gómez-Lim, M. (1992). Changes in mRNA and protein synthesis during ripening in mango fruit. *Journal of Plant Physiology*. 141: 82-87.
- Ma, B., Cui, M.L., Sun, H.J., Takada, K., Mori, H., Kamada, H. y Ezura, H. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant Physiology*. 141: 587-597.
- Mita, S., Kawamura, S. y Asai, T. (2002). Regulation of the expression of a putative ethylene receptors, PeERS2, during the development of passion fruit (*Passiflora edulis*). *Physiologia Plantarum*. 114: 271-280.
- Mita, S., Kawamura, S., Yamawaki, K., Nakamura, K. y Hyodo, H. (1998). Differential expression of genes involved in the biosynthesis and perception of ethylene during ripening of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant and Cell Physiology*. 39: 1209-1217.
- Mitcham, E. y McDonalds, R. (1992). Cell wall modification during ripening of 'Keitt' and 'Tommy Atkins' mango fruits. *The American Society for Horticultural Science*. 117: 919-924.

- Napier, R. (2004). Plant hormone binding sites. *Annals of Botany (Lond)*. 93: 227-233.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J.K., Kubo, Y., Bennett, K.A., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latche, A., Pech, J.C. y Bennett, A.B. (2007). Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*. 58: 1281-1290.
- Notredame, C., Higgins, J. y Heringa, J. (2000). T-coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology*. 302: 205-217.
- Owino, W., Ambuko, J. y Mathooko, F.M. (2005). Molecular basis of cell wall degradation durin fruit ripening and senescence. *Stewart Postharvest Review*. 3: 1-10.
- Pang, J.H., Ma, B., Sun, H.J., Ortiz, G.I., Imanishi, S., Sugaya, S., Gemma, H. y Ezura, H. (2007). Identification and characterization of ethylene receptor homologs expressed during fruit development and ripening in persimmon (*Diospyrus kaki* Thumb.). *Postharvest Biology and Technology*. 44: 195-203.
- Prasanna, V., Prabha, T.N. y Tharanathan, R.N. (2004). Multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L. cv Alphonso) fruit. *Food Chemistry*. 95: 30-36.
- Prasanna, V., Yashoda, H.M., Prabha, T.N. y Tharanathan, R.N. (2003). Pectic polysaccharides during ripening of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83: 1182-1186.

- Pressey, R. y Avants, J.K. (1976). Pear polygalacturonase. *Phytochemistry*. 15: 1349 -1351.
- Qu, X. y Schaller, G. (2004). Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. *Plant Physiology*. 136: 2961-2970.
- Rasori, A.,Ruperti, B.,Bonghi, C.,Tonutti, P. y Ramina, A. (2002). Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2333-2339.
- Rodriguez, F.,Esch, J.,Hall, A.,Binder, B.,Schaller, G. y Bleecker, A. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science*. 283: 996-998.
- Roe, B. y Bruemmer, J. (1981). Changes in pectin substances and enzymes during ripening and storage of 'Keitt' mangos. *Journal of Food Science*. 46: 186-189.
- Ruijter, J.M. (2006). LinRegPCR: analysis of real time PCR data [computer program]. Amsterdam, the Netherlands. Department of Anatomy and Embriology, Academical Medical Center. p 1-12.
- Sakai, H.,Hua, J.,Chen, Q.G.,Chang, C.,Medrano, L.J.,Bleecker, A.B. y Meyerowitz, E.M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 5812-5817.
- Salunkhe, D. (1995). *Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage, and Processing*. CRC Press. p 123-158.

- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring harbor Laboratory Press. N.Y. Cold Spring Harbor. New York. Vol 3. Apendix A1.7.
- Sanger, F.,Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1997). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Acedemy of Sciences. 74: 5436-5467.
- Sato-Nara, K.,Yuhashi, K.,Higashi, K.,Hosoya, K.,Kubota, M. y Ezura, H. (1999). Stage-and Tissue-Specific Expression of Ethylene Receptor Homolog Genes during Fruit Development in Muskmelon. Plant Physiology. 120: 321-330.
- Schaller, G. y Kieber, J.J. (2002). Ethylene. American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book. 1-17.
- Schaller, G.E. y Bleecker, A.B. (1995). Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. Science. 270: 1809-1811.
- Tanase, K. y Ichimura, K. (2006). Expression of ethylene receptors DI-ERS1-3 and DI-ERS2, and ethylene response during flower senescence in *Delphinium*. Journal of Plant Physiology. 163: 1159-1166.
- Tharanathan, R.,Yashoda, H. y Prabha, T. (2006). Mango (*Mangifera indica* L.), " The King of Fruits"- An Overview. Foods Reviews International. 22: 95-123.
- Thiman, K.V. (1980). Senescense in plants. CRC. Boca Raton, Florida, USA. p 131-156.

- Trainotti, L., Pavanello, A. y Casadoro, G. (2005). Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climateric fruits? *Journal of Experimental Botany*. 56: 2037-2046.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. y Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell*. 11: 1743-1754.
- Wang, Y. y Kumar, P.P. (2007). Characterization of two ethylene receptors PhERS1 and PhETR2 from petunia: PhETR2 regulates timing of anther dehiscence. *Journal of Experimental Botany*. 58: 533-544.
- Watada, H. y Massie, D. (1981). A compact automatic system for measuring CO₂ and C₂H₄ evolution by harvest horticultural crops. *HortScience*. 19: 39-41.
- Yahyaoui, F., Wongs-Aree, C., Latche, A., Hackett, R., Grierson, D. y Pech, J. (2002). Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *European Journal of Biochemistry*. 269: 2359-2366.
- Yashoda, H.M., Prabha, T. y Tharanathan, R. (2006). Mango ripening: changes in cell wall constituents in relation to textural softening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 713-721.
- Yau, C.P., Wang, L., Yu, M., Zee, S.Y. y Yip, W.K. (2004). Differential expression of three genes encoding an ethylene receptor in rice during development, and in response to indole-3-acetic acid and silver ions. *Journal of Experimental Botany*. 55: 547-556.

- Zambrano, J., Briceño, S., Méndez, C., Manzano, J. y Castellanos, E. (1995). Cambios en la maduración de frutos de mango cubiertos con ceras, durante el almacenamiento. *Agronomía Tropical*. 47: 5-15.
- Zhou, G.Y., Cao, W.H., Cao, Y.R., Liu, J., Hao, Y.J., Zhang, J.S. y Chen, Y.S. (2006). Roles of ethylene receptor NTHK1 domains in plant growth, stress response and protein phosphorylation. *Letters of Federation of European Biochemical Societies*. 580: 1239-1250.