



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

**EFEECTO DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO EN
LA EXPRESIÓN DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA
DURANTE LA MADURACIÓN POSCOSECHA DE
MANGO CV. 'ATAULFO'**

Por:

Francisco Eliezer Sánchez Galván

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 2015



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

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO EN
LA EXPRESIÓN DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA
DURANTE LA MADURACIÓN POSCOSECHA DE
MANGO CV. 'ATAULFO'**

Por:

Francisco Eliezer Sánchez Galván

TESIS APROBADA POR LA

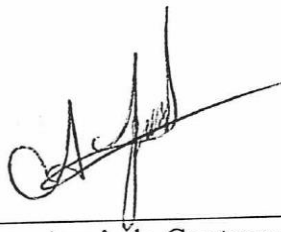
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de


MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

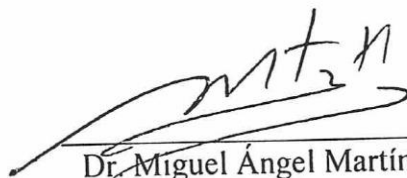
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Francisco Eliezer Sánchez Galván, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



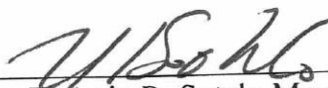
Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara
Directora de Tesis



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Asesora



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Asesor

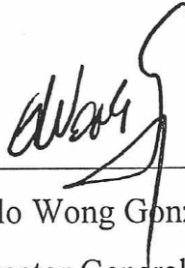


Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo
Asesor

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, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo económico prestado a lo largo del posgrado que me permitió dedicarme a la realización de mi tesis como estudiante de tiempo completo y financió los materiales necesarios para su conclusión por medio del proyecto #CB2012-01-178296.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.), institución que me dio conocimientos más profundos en el área de biología molecular, a la Coordinación de Tecnología en Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por el apoyo en la infraestructura y asesoría académica de su plantel docente y técnico. Especialmente a mis profesores de Bioquímica vegetal, Biología Molecular y Estadística. A la doctora Carmen Arminda Contreras por siempre mostrar disponibilidad en su horario para asesorías a lo largo de mi estancia en CIAD, a mi comité de tesis integrado por la doctora María Auxiliadora Islas Osuna y los doctores Miguel Ángel Martínez y Rogerio Sotelo por sus asesorías y comentarios enriquecedores a lo largo de la realización de este proyecto de tesis. Al Dr. Tomás Osuna Enciso de CIAD Culiacán, por su apoyo en la obtención de los frutos de mango utilizados en este trabajo.

A mis compañeros José María Anaya, Lucía Angulo, Deyanira Fimbres, Magda Pacheco y Mitzuko Dautt por la buena convivencia y buen ambiente de trabajo en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, especialmente a Magda por su asesoría técnica. Finalmente al resto de mis compañeros tanto de la coordinación como de otras coordinaciones, como Daniela Téllez, Idaly Morales, Aaron Santiaguin, Rosa Kancab, Alberto Jiménez, Damián López, Luz Vázquez y Elena Nohelí, también por el buen ambiente de compañerismo en CIAD.

DEDICATORIA

Agradezco a mis madres que me han apoyado para continuar adelante en mis estudios de posgrado y así poder seguir con mi formación académica, para poder ejercer mi profesión de manera ética y aportar un bien a la sociedad.

Dedico este trabajo de tesis a todas las personas que han hecho posible su realización, mis madres que siempre me han apoyado con tiempo, consejos y dinero para que no tenga problemas que me hagan desistir de mi formación académica, mi mamá Alicia y mama Julia que siempre se ha preocupado por mi salud y por que tenga las herramientas necesarias para seguir estudiando, como alimento, la laptop que me compraron al hacer mi tesis de licenciatura y el carro que me regalaron al entrar al posgrado.

A mis maestros de la Universidad de Sonora, sobre todos a los de bioquímica como el Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, la Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo y la Dra. Josafat Marina Ezquerra Bauer, que despertaron un gran interés por estos temas en mí. Al doctor Javier Castillo y Aldo Arvizu por su ayuda y conocimientos cuando realizaba mi tesis de licenciatura y sus recomendaciones y asesoría para entrar al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, en CIAD.

También agradezco a Sarai Taddei que se ha preocupado también por mi salud, por que siga adquiriendo conocimientos en mi maestría en CIAD, así como en mi formación académica futura, por tenerme paciencia y escucharme para que salga adelante en la realización de mi tesis y en todos los aspectos de mi vida.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 El Mango: Fruto de Importancia Económica	3
II.2 Mango cv. ‘Ataulfo’	4
II.3 El Mango y su Proceso de Maduración.....	4
II.3.1 Cambios en la Textura y Contenido de Azúcares	5
II.3.2 Características Organolépticas: Color, Olor y Acidez	6
II.3.3 Compuestos Antioxidantes y Fenólicos	7
II.4 Tratamiento Térmico en Frutos	8
II.4.1 Respuesta Fisiológica de los Frutos al Tratamiento con Calor	9
II.4.2 Sistemas Enzimáticos de Defensa	10
II.5 Glutación S-Transferasa en Plantas	12
II.5.1 Función y Características	13
II.5.2 GSTs en Frutos	14
II.5.3 Estudios de Expresión Génica	15
III. HIPÓTESIS.....	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1 Objetivo General.....	19
IV.2 Objetivos Específicos.....	19
V. MATERIALES Y METODOS	20
V.1 Obtención y Tratamiento Previo de la Muestra	20

CONTENIDO (Continuación)

	Página
V.2 Perfil de Expresión de los Genes de GST	20
V.2.1 Extracción de ARN total	21
V.2.2 Eliminación de ADN genómico	22
V.2.3 Síntesis de ADNc total	23
V.2.4 qPCR y Evaluación de Expresión de <i>GST</i>	23
V.3 Determinación de Actividad Enzimática GST Total.....	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
VI.1 Análisis de Secuencias y Diseño de Iniciadores	27
VI.2 Obtención de ADNc.....	30
VI.2.1 Aislamiento y Evaluación de la Integridad del ARN Total	30
VI.2.2 Evaluación y Síntesis de ADNc	32
VI.3 Evaluación y Análisis de la Expresión Relativa de <i>GST phi</i> y <i>tau</i> de Mango ...	33
VI.3.1 Efecto del Almacenamiento Poscosecha Sobre la Expresión Génica de <i>GST phi</i> y <i>tau</i> de Mango	34
VI.3.2 Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Sobre la Expresión Génica de <i>GST phi</i> y <i>tau</i> de Mango	36
VI.4 Evaluación del Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Sobre la Actividad GST Total Durante el Almacenamiento Poscosecha de Mangos cv. ‘Ataulfo’	44
VII. CONCLUSIÓN	47
VIII.REFERENCIAS.....	48

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación y cuantificación por qPCR de las GSTs clases <i>phi</i> y <i>tau</i>	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sistemas desintoxicantes de especies reactivas de oxígeno.	11
Figura 2. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de GST clase <i>tau</i>	28
Figura 3. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la GST clase <i>phi</i>	28
Figura 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GST clase <i>tau</i> de <i>Manguifera indica</i> L. cv. ‘Ataulfo’ con GSTs de otras especies.	29
Figura 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GST clase <i>phi</i> de <i>Manguifera indica</i> L. cv. ‘Ataulfo’ con GSTs de otras especies.	29
Figura 6. Residuos funcionales de las GSTs clase <i>tau</i> y <i>phi</i> de <i>Manguifera indica</i> L. cv. ‘Ataulfo’.....	30
Figura 7. Análisis electroforético del ARN extraído de mango testigo a diferentes días de almacenamiento poscosecha.	32
Figura 8. Análisis electroforético del ARN extraído de mango tratado a diferentes días de almacenamiento poscosecha.	32
Figura 9. Análisis electroforético del ADNc total de mango sometido a PCR.....	33
Figura 10. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase <i>tau</i> en mangos testigo de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha.....	34
Figura 11. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase <i>phi</i> en mangos testigo de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha.....	35
Figura 12. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase <i>tau</i> en mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha.	37
Figura 13. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase <i>phi</i> en mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha.	37
Figura 14. Alineamiento de GST <i>tau</i> 17 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AEE28571.1) con GST <i>tau</i> de mango ‘Ataulfo’.....	39
Figura 15. Alineamiento de GST <i>phi</i> 8 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AEC10880.1) con GST <i>phi</i> de mango ‘Ataulfo’.....	39

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- Figura 16. Alineamiento de GST *phi* 9 de *Arabidopsis thaliana* (NP_180643) con GST *phi* de mango ‘Ataulfo’ 41
- Figura 17. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *phi* en mangos testigo y sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha. 42
- Figura 18. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *tau* en mangos testigo y sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha. 43
- Figura 19. Actividad GST total de mangos testigo y sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha..... 44

RESUMEN

El mango, para ser comercializado es sometido a un tratamiento hidrotérmico (TH) para eliminar patógenos. Dicho tratamiento puede generar un estrés fisiológico que deriva en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las plantas poseen mecanismos para contrarrestar el estrés oxidativo, en los cuales intervienen compuestos y enzimas con capacidad antioxidante. Las glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas detoxificantes, y su sustrato, el glutatión reducido, es un antioxidante. Las GSTs han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de conjugarse con xenobióticos y facilitar la eliminación de compuestos tóxicos de las células. Sin embargo, las clases *phi* y *tau* también presentan actividad peroxidasa, pudiendo reducir hidroperóxidos de ácidos grasos que pueden ser producto del estrés térmico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del TH sobre la expresión de las GSTs *phi* y *tau*, así como la actividad enzimática GST total en mango 'Ataulfo' durante su maduración poscosecha. Los mangos se sometieron a un TH (46.1° C por 75 min.) y posteriormente fueron almacenados a 20° C. Se tomaron muestras a los días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento para extraer ARN total y sintetizar ADNc para evaluar el perfil de expresión de las GSTs *phi* y *tau* mediante PCR cuantitativo (qPCR). Para la medición de la actividad GST total se obtuvo un extracto enzimático de las mismas muestras y se midió la actividad GST utilizando GSH y CDNB como sustratos. Tanto GST *phi* como *tau* fueron estimuladas en su expresión a causa del TH los días 1, 5 y 7 de almacenamiento. En cuanto a la actividad GST total, se observó que TH aumenta de manera significativa la actividad transferasa los días 5 y 7 de almacenamiento poscosecha, sin embargo se observa un comportamiento diferente a los perfiles de expresión de GST *phi* y *tau* a lo largo del almacenamiento. La familia GST presenta gran divergencia y existe un alto grado de redundancia funcional entre clases y dentro de ellas. Sí bien las GSTs *phi* y *tau* de mango 'Ataulfo' tienen el residuo catalítico serina que les permite realizar la actividad

transferasa, es probable que éstas también actúen como peroxidasas dependientes de glutatión como protección contra el estrés oxidativo, cuando el fruto es sometido a TH.

Palabras clave: *Mangifera indica*, Glutatión S-Transferasa, Tratamiento hidrotérmico, Almacenamiento poscosecha, Expresión relativa, Actividad GST.

ABSTRACT

Mango fruit is subjected to a quarantine hot water treatment (HWT) to eliminate insects before being exported. This treatment may generate reactive oxygen species (ROS). Plants have mechanisms to counteract oxidative stress, in which compounds and enzymes with an antioxidant capacity are involved. The substrate of glutathione S-transferases (GSTs), glutathione, is a known antioxidant. GSTs have been widely studied for their capacity to conjugate reduced glutathione to xenobiotics and therefore remove toxic compounds from the cells. However, *tau* and *phi* classes also have peroxidase activity; they can reduce fatty acids hydroperoxides which may be the result of thermal stress. The study hereby is aimed to evaluate the effect of HWT on *tau* and *phi* GSTs expression and total GST enzyme activity in 'Ataulfo' mango during post-harvest ripening process. The mangos were treated by HWT (46.1 °C for 75 min.) and stored at 20 °C afterwards; samples were taken at days 1, 3, 5, 7 and 9 in order to extract total RNA and synthesize cDNA to evaluate the *tau* and *phi* GSTs expression profile by quantitative PCR (qPCR). An enzymatic extract of the same samples was obtained and the GST activity was measured using GSH and CDNB as substrates looking forward to have the total GST activity calculated. Both GSTs *phi* and *tau* were stimulated in their expression due to HWT at days 1, 5 and 7 of storage. Moreover, a significant increase in total GST activity by effect of HWT at 5 and 7 post-harvest storage days is observed. Nevertheless, a different behavior to the GST *phi* and *tau* expression profiles is revealed along storage by the total activity profile. A great divergence is shown by the GST family, having a high degree of functional redundancy amongst, as well as within classes. Despite of the fact that mango 'Ataulfo' *tau* and *phi* GSTs have the catalytic residue serine that allows them act like transferase, it is more than likely that they also act as dependent glutathione peroxidase to protect against oxidative stress as mango fruit is treated by HWT.

Key words: *Mangifera indica*, Glutathione S-Transferase, Hot water treatment, Post-harvest storage, Relative expression, GST activity.

I. INTRODUCCIÓN

Durante su proceso de maduración, los frutos llevan a cabo reacciones bioquímicas que alteran su composición. Dichas reacciones van acompañadas de cambios fisiológicos tales como cambios en la textura, desarrollo de color, olor y sabor, que hacen atractivo al fruto para su consumo. El mango (*Mangifera indica* L.) en su estado maduro posee características organolépticas que lo han convertido en un fruto de gran importancia comercial. La composición química del mango no solo varía de acuerdo al grado de madurez, también influye la variedad (Tharanathan et al., 2006). Una vez que el mango alcanza el climaterio respiratorio, el ablandamiento se acelera, por acción de enzimas que degradan la pared celular (Sergent, 1999). Este proceso de pérdida de firmeza comienza en el interior del mesocarpio cerca de la semilla y sigue un comportamiento progresivo hacia el exterior (Litz, 2009). Además el contenido de azúcares en pulpa aumenta proporcionándole al fruto su sabor dulce (Tharanathan et al., 2006).

En general, en las etapas poscosecha del mango, el contenido de vitamina C, flavonoides y demás compuestos fenólicos, sigue aumentando, hasta llegar a las etapas finales de la madurez comercial, donde se observa un decremento de todos los compuestos mencionados anteriormente y por ende de su capacidad antioxidante. Sin embargo este comportamiento no aplica para todas las especies de mango, incluso varía entre cultivares de la misma especie (Sulaiman y Ooi, 2012). El mango variedad 'Ataulfo' es una fuente rica en ácido ascórbico, β -caroteno y compuestos fenólicos, los cuales aumentan durante su maduración, siendo capaces de actuar sinérgicamente y con una alta capacidad antioxidante (Palafox-Carlos et al., 2012a; Palafox-Carlos et al., 2012c). Estas características, hacen del mango 'Ataulfo' un fruto muy atractivo y de gran importancia económica.

Los frutos de mango destinados a la exportación requieren ser sometidos a un tratamiento térmico contra las larvas de insectos (Kim et al., 2007). Los tratamientos térmicos poscosecha conducen a una alteración de la expresión génica y la maduración puede ser demorada o interrumpida (Paull y Jung, 2000). Los tratamientos hidrotérmicos, como a los que el mango es sometido, conducen a la acumulación de proteínas con funciones de tolerancia al estrés oxidativo como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), entre otras (Lurie y Pedreschi, 2014).

La enzima glutatión-S-transferasa (GST) en plantas es una enzima involucrada en la detoxificación y transporte de compuestos xenobióticos y endógenos, tanto al exterior de la célula como a determinados organelos (Dixon et al., 2009; Kumar et al., 2012; Mohsenzadeh et al., 2011). La superfamilia de la GST se divide en diferentes clases; las clases *phi* y *tau* son exclusivas de organismos vegetales (Kumar et al., 2012) y son las más abundantes (Chi et al., 2011; Dixon y Edwards, 2010; Dixon et al., 2009; Kumar et al., 2012; Liu et al., 2013; Mohsenzadeh et al., 2009; Zhikun et al., 2008). Estas clases están implicadas principalmente en el metabolismo de xenobióticos, por lo que están relacionadas con una alta tolerancia al estrés causado por la presencia de herbicidas (Liu et al., 2013). Además de su función detoxificante, un gran número de GSTs *phi* y *tau* tienen la capacidad de catalizar la reducción de hidroperóxidos, ayudando a contrarrestar los efectos de un estrés oxidativo (Dixon y Edwards, 2010; Dixon et al., 2009; Dixon et al., 2010).

Se ha observado que la expresión a nivel génico de GSTs de plantas, principalmente las clases *phi* y *tau*, ha sido inducida por estrés del tipo abiótico como, metales pesados, frío, sequía y estrés salino (Chi et al., 2011; Csiszár et al., 2014; Jain et al., 2010; Kumar et al., 2012; Wang et al., 2013). Además, su expresión también se ha visto estimulada en presencia de moléculas relacionadas con un estrés oxidativo, como peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y aldehídos insaturados (derivados de la peroxidación de lípidos) (Fujita y Hossain, 2003; Liu et al., 2013). Sin embargo no hay estudios de expresión génica de GSTs en respuesta a un estrés del tipo térmico. Para conocer el efecto del tratamiento por calor en estas enzimas, en este trabajo se evaluó la expresión de las GST clases *phi* y *tau* de mango ‘Ataulfo’ sometido a tratamiento hidrotérmico a lo largo de su proceso de maduración poscosecha.

II. ANTECEDENTES

II.1 El Mango: Fruto de Importancia Económica

El mango (*Mangifera indica* L.) es originario de la región Indobirmana, sin embargo actualmente se cultiva en casi todos los agroecosistemas tropicales y subtropicales del mundo. Debido a su capacidad de adaptación a diferentes condiciones adversas es uno de los frutos con mayor distribución en el país. La FAO reporta que del total mundial de producción de mango, mangostanes y guayabas, la región asiática aportó un 76% en 2013, seguido de la región del continente americano con un 12%. México es el quinto productor mundial (6.4%) superado por India (60.9%), China (15.1%), Tailandia (10.6 %) e Indonesia (7 %) (FAOSTAT, 2008); sin embargo es el principal exportador de mango con poco más de 20% de las exportaciones mundiales (Infante et al., 2011).

Del total de mango producido en México durante el año 2013, la mayor parte (65%) se destinó a comercialización, un 19% se destinó a la exportación, mientras que cerca de un 16% fue a la industria. El principal destino para la exportación fueron los Estados Unidos de América (87%), y ésta se ha incrementado un 7% anual en los últimos años. En términos monetarios la SAGARPA reporta que durante 2013, el valor de las exportaciones de mango mexicano se incrementó 16%, vendiéndose 273 millones 491 mil dólares a un total de 22 países (SIAP-SAGARPA, 2014). Los estados de Guerrero, Nayarit, Sinaloa, Chiapas, Oaxaca, Michoacán y Veracruz son las principales entidades productoras de mango en México, las cuales concentraron en 2012 el 87.7% del volumen de la producción (SIAP-SAGARPA, 2014). Sin embargo la región noroeste integrada por Baja California Sur, Sonora, Colima, Nayarit y Sinaloa exporta el 50% del total de mango exportados en el país, siendo los últimos tres estados los de mayor aporte en la región (Empaque de Mangos del C.I.P., 2009).

De las seis variedades que concentran el 90% del volumen y valor de producción total del país ('Ataulfo', 'Manila', 'Tommy', 'Haden', 'Kent' y 'Keitt'), las variedades más producidas en la región noroeste son la variedad 'Kent' (23.9%), delante de las variedades 'Tommy Atkins' (18.6%) y 'Ataulfo' (14.1%) (Empaque de Mangos del C.I.P., 2009; SIAP-SAGARPA, 2014).

II.2 Mango cv. 'Ataulfo'

El mango 'Ataulfo' al igual que otros frutos de color amarillo, son una excelente fuente de β -caroteno (vitamina A) y también es rico en vitamina C con trazas de vitaminas E, B y K (Sultana et al., 2012). Diversos estudios han mostrado que el mango 'Ataulfo' tiene un mayor contenido de ácido ascórbico (125.4 ± 6.4 mg por 100 g de pulpa), compuestos fenólicos (109.3 ± 14.8 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de pulpa), β -caroteno (26.1 ± 4.4 mg por kg de peso fresco) y una alta capacidad antioxidante, entre diversas variedades de mango tales como 'Tommy Atkins', 'Keitt', 'Kent' y 'Haden' (Manthey y Perkins-Veazie, 2009; Sulaiman y Ooi, 2012). La alta capacidad antioxidante del mango 'Ataulfo' se ha asociado a su alto contenido de ácidos fenólicos (clorogénico, gálico, protocatéico y vanílico) (Palafox-Carlos et al., 2012a).

Durante su maduración, el mango 'Ataulfo' sigue un patrón climatérico, donde se observa una menor producción de CO_2 en un estado inmaduro; además en las etapas intermedias se registra una tasa de respiración tres veces mayor que en el fruto verde, etapas donde se observa el pico de etileno y la máxima producción de CO_2 (Palafox-Carlos et al., 2012b). Otros cambios observados en mango 'Ataulfo' a través de su maduración, son la pérdida de firmeza, el cambio de pH, el aumento de sólidos solubles totales y ácidos fenólicos, así como el cambio en el color de la cáscara, el cual pasa de verde a amarillo (Sulaiman y Ooi, 2012).

II.3 El Mango y su Proceso de Maduración

El mango es un fruto de comportamiento climatérico, y como tal su maduración es causada por efecto de la cascada de reacciones desencadenadas inicialmente por los

receptores transmembranales de etileno. Durante la maduración del mango, la tasa de respiración se incrementa hasta llegar a un pico máximo (pico climatérico), para después iniciar la etapa de senescencia (Baraona y Sancho, 2000). Como fruto climatérico el fruto de mango en un estado inmaduro produce etileno en niveles muy bajos ($< 0.1 \mu\text{L}/\text{Kg}/\text{h}$), el cual se incrementa en gran medida durante la maduración o climaterio, consecuencia del fenómeno de síntesis autocatálitica (Litz, 2009; Sergent, 1999). Durante este periodo el fruto experimenta una serie de cambios bioquímicos tales como un aumento de los sólidos solubles, compuestos fenólicos y carotenoides, así como la disminución de la acidez y degradación del almidón. Todas estas reacciones conducen al desarrollo del color, textura, olor y sabor característicos del fruto, una vez alcanzada la madurez comercial (Tharanathan et al., 2006).

II.3.1 Cambios en la Textura y Contenido de Azúcares

Los cambios en la textura durante la maduración del mango (ablandamiento) son producto de modificaciones de la pared celular y los compuestos pécticos, tales como la solubilización del pectato de calcio, desencadenada por el incremento de las actividades de enzimas poligalacturonasas y celulasas, entre otras (Litz, 2009; Sergent, 1999). Se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de poligalacturonasa, fosfoenolpiruvato y los tejidos blandos en vías de maduración (Sergent, 1999). Los procesos de degradación causantes de la pérdida de firmeza inician en la pulpa (mesocarpio), y avanzan desde el interior (tejido cercano a la semilla) hacia el exterior (Litz, 2009). El mesocarpio de mango contiene principalmente agua, carbohidratos, ácidos orgánicos, grasas, minerales, pigmentos, taninos, vitaminas y compuestos del sabor. En cuanto a azúcares, la glucosa, fructosa y sacarosa, son los mayormente encontrados (Tharanathan et al., 2006). En las primeras etapas del desarrollo del fruto no se observan cambios sistémicos en el contenido de azúcares. Durante el crecimiento y maduración de los mangos hay un aumento de los sólidos insolubles en alcohol así como de almidón (Tharanathan et al., 2006). Al iniciar el proceso de maduración los polisacáridos solubles en agua aumentan, y en etapas finales se presenta un descenso en el contenido de almidón conforme aumenta el contenido de azúcares, tanto reductores como no reductores, en pulpa (Litz, 2009).

II.3.2 Características Organolépticas: Color, Olor y Acidez

Una característica intrínseca de los frutos maduros es su pigmentación colorida. El desarrollo de color del mango es ocasionado por una degradación de componentes de los plástidos, principalmente clorofila, al mismo tiempo que aumenta la acumulación de carotenoides y pigmentos fenólicos (flavonoides y antocianinas) (Anaya et al., 2001). Durante este proceso, los cloroplastos se transforman en cromoplastos que contienen pigmentos de color amarillo o rojo (Litz, 2009). En cáscara hay una fuerte degradación de la clorofila y en pulpa su presencia se vuelve insignificante cuando el fruto alcanza la madurez comercial (Tharanathan et al., 2006). En cuanto a carotenoides totales y β -caroteno estos aumentan gradualmente a medida que los frutos se acercan a la madurez fisiológica y comercial (Tharanathan et al., 2006).

La mayoría de los cultivares de mango presentan una pérdida de su color verde, haciéndose presentes en cáscara tonalidades amarillas, anaranjadas y rojas; sin embargo, algunos cultivares retienen el color verde en la fruta madura (Litz, 2009; Sergent, 1999). Tal es el caso de las variedades 'Keitt' y 'Amelie' (colores verdes), mientras que 'Ataulfo' y 'Manila Super' presentan color amarillo, y 'Haden', 'Tommy Atkins' e 'Irwin' son de coloración roja (Ortiz et al., 2002). En mango 'Mahajanaka', 'Sunset', 'Tommy Atkins' y 'Haden' el color rojo de la cáscara se debe a las antocianinas (Berardini et al., 2005a; Berardini et al., 2005b; Kobkiat et al., 2011), mientras que en mango 'Ataulfo' el color amarillo es proporcionado principalmente por los carotenos. Los frutos rojos y amarillos presentan una alta actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) (Kanyarat et al., 2010). La luz y los azúcares son dos factores que en las plantas estimulan la actividad de PAL, que es una enzima precursora en la síntesis de flavonoides (Kanyarat et al., 2010; Kobkiat et al., 2011).

Durante el desarrollo del fruto la acidez tiende a aumentar, hasta alcanzar un pico y posteriormente disminuir hasta que el fruto está listo para ser cosechado. Posteriormente, en la etapa post-climaterio, la acidez continua con la misma tendencia hacia la baja, registrando una acidez total (como ácido cítrico) que varía desde 0.13% hasta 0.71% (Sergent, 1999; Tharanathan et al., 2006). Los ácidos orgánicos influyen en la respiración del fruto y como componentes del sabor. Los ácidos predominantes encontrados en la fruta madura son el ácido cítrico, succínico,

málico y tartárico, siendo el primero el que se ha encontrado en mayor proporción (Litz, 2009). También se ha reportado la presencia de ácido oxálico, succínico, pirúvico, adípico, galacturónico, glucurónico y mícico (Tharanathan et al., 2006).

Otra característica indicadora también de la madurez comercial del fruto del mango es el desarrollo de olor, el cual se debe a compuestos tipo éster y carbonilos específicos dependiendo de las variedades (Tharanathan et al., 2006). Los principales compuestos volátiles en mango son los terpenos, también se ha encontrado que compuestos fenólicos o taninos, aldehídos, cetonas, aceites esenciales, alcoholes y esterres están asociados al aroma desprendido por el fruto (Sergent, 1999).

II.3.3 Compuestos Antioxidantes y Fenólicos

Los mangos son fuentes ricas en antioxidantes como la vitamina C, compuestos fenólicos y carotenoides. La cáscara y semilla de mango son ricas en galatos, galotaninos, glucósidos de xantonas, flavonoles, ácido ascórbico, carotenoides y derivados de benzofenona (Berardini et al., 2005b; Sultana et al., 2012). Berardini y cols. (2005) identificaron un gran número de flavonol O- y xantonas C-glicósidos en cáscara de 14 variedades de mango, principalmente en la variedad 'Tommy Atkins', y en cultivares de cáscara color rojo encontraron antocianinas (Berardini et al., 2005a; Berardini et al., 2005b). En pulpa de mango también se han encontrado presentes ácido ascórbico, carotenoides y compuestos fenólicos, por lo que también es considerada una fuente rica en antioxidantes. Comparada con la cáscara y semilla, los niveles de compuestos fenólicos en pulpa son menores, con excepción de altas concentraciones de galotanino y otros varios polifenoles de menor ocurrencia (Manthey y Perkins-Veazie, 2009). En el cultivar 'Uba' la pulpa registra una concentración de compuestos fenólicos 4.6 y 7.3 veces menor que en semilla y cáscara respectivamente (Ribeiro et al., 2008). Los principales compuestos fenólicos encontrados en la pulpa de varios cultivares de mango, son manguiferina, isomanguiferina, ácido gálico, ácido *m*-digálico, ácido elágico, quercetina 3-O-galactósido y quercetina 3-O-glucósido (Sulaiman y Ooi, 2012).

Durante la maduración del mango, los compuestos fenólicos generalmente sufren un descenso tanto de su actividad antioxidante como de su contenido (Maciel et al.,

2011). Sin embargo Sulaiman y Ooi (2012) encontraron que en cuanto a contenido total de fenoles la tendencia a la baja o a la alza variaba según el cultivar, y en algunos de ellos incrementaban sus niveles de fenoles al pasar del estado verde-maduro al maduro. En cuanto al contenido de vitamina C, encontraron que todos los mangos verde-maduros tenían mayor contenido que los maduros. Particularmente en mango 'Keitt', se ha reportado que el contenido de ácido ascórbico disminuye alrededor de un 50% desde el desarrollo inicial hasta la completa madurez del fruto (Gómez y Lajolo, 2008).

II.4 Tratamiento Térmico en Frutos

Al igual que muchos frutos, el mango para ser comercializado es sometido a un tratamiento térmico con el fin de eliminar huevecillos de insectos como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Existen tres métodos diferentes de tratamientos térmicos: Agua caliente, vapor caliente y aire caliente, siendo el tratamiento con agua caliente, comúnmente conocido como tratamiento hidrotérmico, el que se aplica al mango en huertos comerciales. El tratamiento hidrotérmico (TH) además de ser eficaz en contra de los huevecillos de la mosca de la fruta, también controla hongos patógenos, ya que las esporas o infecciones se localizan en la superficie o en las primeras capas celulares de la cáscara (Lurie, 1998). Para el control de patógenos se requiere una exposición al agua caliente de pocos minutos y temperaturas mayores a 50 °C, mientras que para el control de insectos, los tiempos de inmersión se elevan a 1 h o más, pero las temperaturas deben estar por debajo de 50 °C. Lo anterior debido a que los insectos se pueden localizar más hacia el interior del fruto (Lurie, 1998).

Los tratamientos térmicos poscosecha pueden modificar las respuestas de los frutos al estrés por frío, inducir el fenómeno de tolerancia cruzada y mantener su calidad durante el almacenamiento (Lurie y Pedreschi, 2014). Una vez aplicados, éstos alteran la expresión génica, lo cual demora, interrumpe o promueve la maduración del fruto, afectando la textura, el sabor, la tasa de respiración y la producción de etileno y compuestos volátiles.

II.4.1 Respuesta Fisiológica de los Frutos al Tratamiento con Calor

El tratamiento con calor en frutos, como una forma de estrés térmico, puede ocasionar una respuesta encaminada a contrarrestar los posibles daños que se pueden presentar en el fruto. En el caso del mango, durante el proceso de maduración de los frutos cosechados en su estado verde-maduro, la piel desarrolla pigmentos amarillos o rojos. Cuando se aplica un tratamiento térmico, se ha reportado que se acelera la coloración amarilla de la piel del fruto y en algunos casos, mejora la uniformidad de desarrollo de color. En cultivares como ‘Tommy Atkins’, ‘Keitt’ y ‘Palmer’, también se ha encontrado que se acelera el ablandamiento del fruto. Aunque hasta el momento los mecanismos por los cuales se acelera la maduración del fruto del mango no se esclarecen, es muy probable que los tratamientos térmicos promuevan la síntesis acelerada de los carotenoides, la degradación de la clorofila (por clorofilasa) y la degradación de la pared celular por enzimas tales como poligalacturonasa (Jacobi et al., 2001).

Una respuesta fisiológica al tratamiento térmico es el aumento en la tasa respiratoria y los cambios en la síntesis de etileno del fruto. En un estudio realizado en frutos de mango en estado verde-maduro, un tratamiento con aire caliente a temperaturas de 46 °C a 48 °C durante 3 a 5 horas aumentó drásticamente la tasa de respiración durante el tratamiento. Posteriormente en almacenamiento poscosecha a 20 °C, la producción de CO₂ aumentó siendo mayor a la de los frutos testigo por un periodo de 4 a 6 días, para después caer por debajo de los frutos testigos (Mitcham y McDonald, 1993). La síntesis de etileno es uno de los principales procesos que resulta afectado por la aplicación del calor, ya que es inhibida reversiblemente a temperaturas altas. La conversión del precursor 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) a etileno (C₂H₄) es aparentemente muy susceptible por encima de 30 °C. En frutos como manzana y tomate se ha reportado que temperaturas mayores a 35 °C causan una acumulación en el contenido de ACC endógeno y una reducción en la producción de etileno (Paull y Jung, 2000).

En mango cultivar ‘Nam Dokmai’, Ketsa y cols. (1999) al someter al fruto a un tratamiento térmico largo a 38 °C y luego ser transferido a 20 °C, encontraron que alcanzaron su pico de producción de etileno dos días después del almacenamiento

poscosecha, que los frutos testigo (almacenados a 25 °C). En la variedad ‘Tommy Atkins’ se encontró que después de un tratamiento con vapor caliente, éste sufrió una inactivación en la producción de etileno, sin embargo a los tres días del tratamiento, la producción de etileno es recuperada y el proceso de maduración continúa con normalidad (Jacobi et al., 2001). En cuanto al efecto del TH sobre la capacidad antioxidante y los niveles de compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, en cultivar ‘Tommy Atkins’ no se encontró un efecto negativo del TH sobre la capacidad antioxidante y los niveles de compuestos fenólicos (Kim et al., 2007). La reducción de esta capacidad y de los niveles de compuestos fenólicos fue atribuida al efecto de la maduración. Es importante mencionar que a diferencia del mango ‘Tommy Atkins’, el cultivar ‘Ataulfo’ sí registra un aumento en su capacidad antioxidante y compuestos fenólicos a lo largo de su maduración (Palafox-Carlos et al., 2012b), por lo que los efectos del tratamiento hidrotérmico podrían ser diferentes.

La síntesis de etileno desencadena una serie de reacciones que conducen a los cambios observados durante la maduración de los frutos, si esta se ve afectada, también se alteran una gran variedad de reacciones. Por otra parte, el estrés por calor afecta la estabilidad de varias proteínas y por ende, la eficiencia enzimática de las reacciones, causando un desbalance celular que termina en la acumulación de sustancias tóxicas que tienen que ser eliminadas de la célula.

II.4.2 Sistemas Enzimáticos de Defensa

Como respuesta a los diferentes tipos de estrés, incluido el estrés por calor, las plantas han desarrollado sistemas de defensa, que involucran a proteínas protectoras, moléculas antioxidantes y complejos enzimáticos que actúan en la eliminación de los compuestos tóxicos formados durante el metabolismo celular. Dentro de estos compuestos tóxicos se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales pueden ser iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto orgánicos como inorgánicos. Las ROS modifican el equilibrio redox alterando las funciones celulares normales. La forma de contrarrestar el estrés oxidativo causado por calor, es el aumento de los procesos antioxidantes (Figura 1). Cuando la exposición a altas temperaturas es por un tiempo corto, como en el caso del TH, los

cambios pueden ocurrir inmediatamente después de finalizado el tratamiento e implican la acumulación de proteínas relacionadas al estrés y defensa, incluyendo las proteínas de choque térmico ó *heat shock proteins* (HSPs), proteínas de resistencia a patógenos (RPs), dehidrininas, enzimas antioxidantes y compuestos fenólicos (Lurie y Pedreschi, 2014).

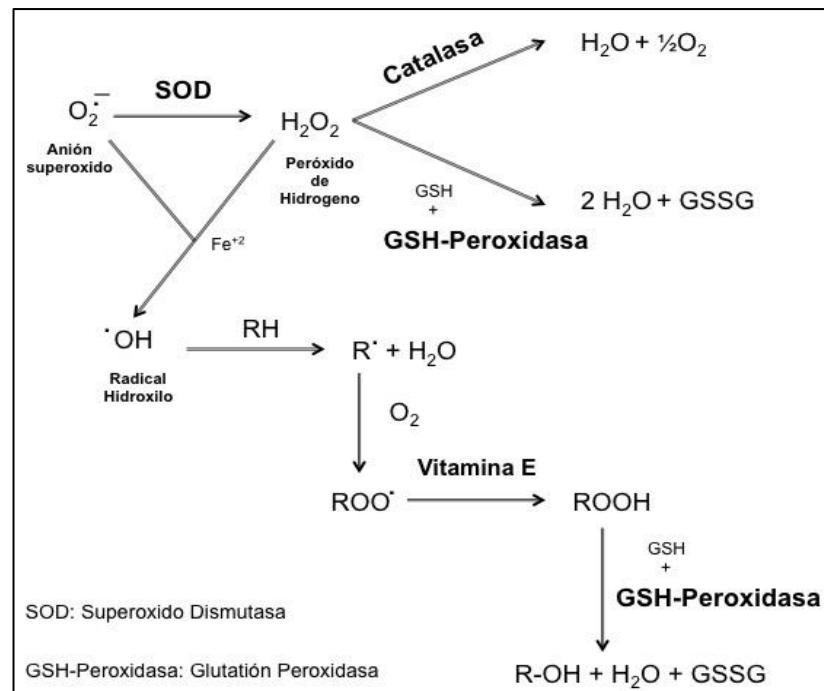


Figura 1. Sistemas desintoxicantes de especies reactivas de oxígeno.

Los sistemas antioxidantes involucrados en la resistencia al estrés en plantas involucran a las enzimas: Ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), dehidroascorbato reductasa (DHAR), ferredoxina (Fd), glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), glutatión peroxidasa (GPOX) y superóxido dismutasa (SOD) (Wahid et al., 2007). Mientras algunas enzimas como SOD y CAT inactivan directamente las ROS, otras enzimas como las Glutatión peroxidasas, se valen de moléculas con capacidad antioxidante como glutatión para reducir hidroperóxidos. Por otra parte algunas enzimas como ferredoxina reductasa, APX, GR y DHAR, re-activan moléculas con capacidad antioxidante, pasándolas de su estado oxidado al reducido. Estas enzimas se han estudiado en plantas y diversos frutos, donde se ha visto su participación en respuesta al estrés, por ejemplo la

sobreexpresión de SOD en plantas mejora la tolerancia al estrés oxidativo ya sea reduciendo H_2O_2 u oxidando agentes reductores tóxicos. En otros casos la transformación de células vegetales para expresar enzimas antioxidantes como GR, tiorredoxina (TRX) y DHAR, también ha mejorado la tolerancia al estrés oxidativo (Le Martret et al., 2011).

Como respuesta al estrés por calor en frutos, Lurie y Pedreschi (2014) reportan que en tomate, después de un tratamiento con aire caliente (HAT), las actividades de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y APX se ve incrementada. De igual manera en durazno después de ser sometido a un TH y un tratamiento con aire caliente se detectaron proteínas relacionadas con el estrés oxidativo como APX y DHAR, las cuales fueron abundantes entre los días 1 y 3 después de los tratamientos (Lurie y Pedreschi, 2014). La DHAR es clasificada como una enzima de la familia GST (Glutación S-Transferasa), sin embargo en su sitio activo el residuo serina, típico de las GSTs que realizan reacciones de conjugación como las clases *phi* y *tau*, es sustituido por una cisteína (Dixon et al., 2010). La enzima DHAR tiene un papel importante en las plantas cuando se encuentran bajo estrés oxidativo ya que por su actividad reductasa es activa en el ciclo del ácido cítrico (Dixon y Edwards, 2010; Dixon et al., 2011; Dixon et al., 2009).

II.5 Glutación S-Transferasa en Plantas

Las glutatión S-transferasas (GSTs, E.C. 2.5.1.18) son enzimas que desintoxican compuestos endobióticos y xenobióticos mediante la unión covalente de glutatión (GSH) a un sustrato hidrofóbico, formando un glutatión S-conjugado menos reactivo y más polar. Algunas funciones de las GSTs en plantas son la desintoxicación de herbicidas y toxinas naturales, transducción de señales, protección contra ROS causadas por el ozono, metales pesados y xenobióticos, además de un papel poco caracterizado en la tolerancia al estrés en general (Dixon et al., 2009; Mohsenzadeh et al., 2011). En plantas las GSTs se agrupan en seis clases basándose en similitudes en su secuencia, organización genética y residuos en su sitio activo; son nombradas, *phi* (F), *tau* (U), *theta* (T), *zeta* (Z), *lambda* (L) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) (Dixon et al., 2009).

II.5.1 Función y Características

Las GSTs poseen un sitio activo que une y activa catalíticamente al grupo tiol del GSH, cuando este se encuentra muy próximo a pequeños ligandos hidrofóbicos. Para que la GST conjugue GSH debe conservar el residuo serina dentro del sitio activo, ya que este promueve la formación del anión tiolato de GSH. En algunos miembros de la familia GST (clases *lambda* y DHAR) ésta serina se sustituye con una cisteína, la cual promueve reacciones de intercambio disulfuro entre moléculas de glutatión (GSH) en lugar de la formación de un complejo S-conjugado, actuando de forma monomérica (Dixon et al., 2010). Se ha encontrado que las GSTs clases *phi* y *tau* actúan como dímeros al conjugar glutatión, y solo pueden dimerizarse entre subunidades de la misma clase; sin embargo, la secuencia de aminoácidos de las subunidades puede variar en gran parte a pesar de ser de la misma clase (Zhikun et al., 2008).

En plantas las GSTs clases *phi* y *tau*, son las que se encuentran en mayor proporción, y se han asociado a la resistencia contra herbicidas conjugando glutatión con estos compuestos, catalizando un ataque nucleofílico del azufre de la cisteína del glutatión a un sitio electrófilo presente en la molécula tóxica. Las GSTs son inducidas por diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos, y en plantas son importantes en la protección contra los daños oxidativos. Las GSTs *tau* unen selectivamente derivados de ácidos grasos glutationilados y oxidados, por lo que se puede esperar que intervenga en el transporte celular de estos derivados de ácidos grasos, así como de moléculas reactivas como las oxilipinas (derivados de ácidos grasos que regulan respuestas vegetales debidas a estrés por ataques de patógenos o pesticidas) (Dixon y Edwards, 2010). Además, muchas GSTs *phi* y *tau* presentan actividad glutatión peroxidasa, reduciendo los hidroperóxidos orgánicos a sus respectivos alcoholes, ayudando contra el estrés oxidativo (Dixon y Edwards, 2010; Dixon et al., 2009; Dixon et al., 2010). En calabaza diversos aldehídos incluidos los α,β -aldehídos insaturados (producto de la peroxidación de lípidos en plantas), indujeron una mayor actividad GST total, así como mayor presencia de tres GSTs clase *tau* específicas (Fujita y Hossain, 2003).

Mohsenzade y cols. (2011) reportaron que la DHAR es co-inducida con las GST clases *phi* y *tau* en cereales. En cloroplastos de tabaco al expresar genes de GST y

DHAR, se han observado alteraciones en el metabolismo de antioxidantes y una mejora en la tolerancia al estrés abiótico (Le Martret et al., 2011). En soya GH2/4 es una proteína que inicialmente fue identificada como proteína de choque térmico, la cual se nombró Gmhsp26-A, posteriormente en base a su secuencia se clasificó como una GST clase *tau*, que conjugó 1-cloro 2,4 dinitrobenzono (CDNB) a glutatión (Ulmasov et al., 1995). El compuesto CDBN es el sustrato modelo para medir la actividad transferasa de GST. En *Arabidopsis* todas las GST clase *tau* y la mayoría de la clase *phi*, no solo presentan esta actividad, si no que muestran la más alta afinidad a este sustrato entre todas las demás clases (Dixon y Edwards, 2010).

Diversos estudios han encontrado que las GSTs clases *phi* y *tau* tienen la capacidad de unir y transportar flavonoides (Ayala et al., 2014; Gomez et al., 2011; Goodman et al., 2004; Mueller et al., 2000; Sun et al., 2012; Zhao y Dixon, 2009). En *Arabidopsis thaliana* se sugiere que la GST *phi* puede estar implicada en la unión y transporte de compuestos relacionados con la defensa en las plantas, ya que se ha encontrado que unen a la fitoalexina, derivado del indol camalexina, y al flavonol quercitina-3O-ramnósido (Kumar et al., 2012; Liu et al., 2013).

II.5.2 GSTs en Frutos

En organismos vegetales podemos encontrar a la enzima GST localizada en diversos tejidos como hoja, raíz y fruto; de igual manera se ha encontrado en etapas que van desde la embriogénesis temprana, germinación, crecimiento, desarrollo vegetativo y senescencia, así como en la etapa de maduración de los frutos (Gong et al., 2005; Jain et al., 2010; Wang et al., 2013). Estas enzimas han sido estimuladas por fitohormonas que se encuentran en todas las etapas descritas anteriormente, relacionadas a la elongación celular como auxina, al desarrollo vegetativo como el ácido abscísico, así como hormonas relacionadas a la maduración de los frutos como el etileno (Chi et al., 2011; Gong et al., 2005; Jain et al., 2010; Kumar et al., 2012; Shi et al., 2014; Wang et al., 2013). Sin embargo el papel de las GSTs en cada etapa ontogénica particular no ha sido aún esclarecido.

En frutos de pera los genes *PpGST1* y *PpGST2*, correspondientes a una proteína GST *phi* y *tau* respectivamente, fueron expresados en respuesta ácido salicílico, auxina,

glucosa, así como también en tejido enfermo (Shi et al., 2014). En raíces de árbol de banana, dos genes correspondientes a GSTs de la clase *tau* (*MaGSTU1* y *MaGSTU3*) fueron regulados por estrés abiótico (frío, salinidad y sequía); un gen de la clases *phi* y *lambda* (*MaGSTF1* y *MaGSTL1*) fueron regulados por moléculas señalizadoras tales como ácido abscísico, etefón, metil jasmonato y ácido salicílico. En estudios de localización por tejido, detectaron los mismos 4 genes anteriores expresados también en fruto (Wang et al., 2013).

En Chile (*Capsicum annuum*) y vid (*Vitis vinifera*) se ha encontrado evidencia que apoya la implicación de GSTs clases *phi* y *tau* en la ligación y el transporte vacuolar de flavonoides como las antocianinas, e incluso se ha descubierto que algunos genes de GST muestran un perfil transcripcional similar a los genes de la ruta biosintética de los flavonoides (*PAL*, *CHS*, *DFR* y *UFGT*) (Aza et al., 2013; Castellarin et al., 2007; Conn et al., 2008; Kitamura et al., 2012). También en Chile los genes *F3'5'H*, *DFR*, *UFGT*, y *GST* están regulados transcripcionalmente durante el desarrollo del fruto (Aza et al., 2013); cabe destacar que de los genes anteriormente descritos, GST no pertenece a la ruta biosintética de los flavonoides.

II.5.3 Estudios de Expresión Génica

Diversos estudios han mostrado cambios en los niveles de expresión de GSTs de plantas al ser sometidas a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico. Comportamientos que van desde (1) un aumento en la expresión bajo condiciones de estrés, (2) la expresión de GSTs no expresadas comúnmente en condiciones normales, pero sí bajo un tratamiento, (3) GSTs altamente específicas en respuesta a un sólo tipo de estrés determinado ó (4) la expresión reducida de algunas GST bajo determinados tipos de estrés (Chi et al., 2011; Csiszár et al., 2014; Jain et al., 2010; Kumar et al., 2012; Liu et al., 2013; Sappl et al., 2009; Wang et al., 2013).

En arroz (*Oryza sativa*) se ha estudiado el efecto de diversos tipos de estrés en la expresión de las GST. El genoma de arroz cuenta con 79 genes correspondientes a GSTs, con duplicaciones en tándem (Jain et al., 2010). Análisis de microarreglos en estos genes de arroz han revelado que existen patrones de expresión específicos por tejido, órgano y etapa del desarrollo. Además un gran número de genes GST son

comúnmente regulados por hormonas, estrés biótico y abiótico. Otro organismo donde se estudiaron las GSTs codificadas en su genoma, fue *Physcomitrella patens* (musgo utilizado como organismo modelo para estudio de evolución vegetal), donde se encontró que de 37 genes GST identificados en su genoma, 23 genes se expresaron durante su crecimiento, tanto en condiciones normales como bajo diversos tipos de estrés como H₂O₂, salinidad, ácido salicílico y atrazina (Liu et al., 2013). En células de *Arabidopsis* expuestas a moléculas señalizadoras (ácido salicílico, H₂O₂, flagelina y quitina), y a hipoxia y frío (como estrés abiótico), el 92% de los genes de GSTs estudiados aumentaron su expresión por al menos un tratamiento (Sappl et al., 2009).

Dentro de la superfamilia de GSTs en arroz, la clase *tau* es la más estimulada bajo situaciones de estrés, seguida por la clase *phi*, ambas mostrando expresión diferencial durante varios tipos de estrés abiótico (Jain et al., 2010). La clase *tau* de sorgo fue estudiada por Chi y cols. (2011), quienes probaron el efecto de estrés abiótico (frío, PEG o alta salinidad). La investigación encontró que de los 43 genes *tau* estudiados, 35 genes (81%), fueron regulados por uno o varios de los tipos de estrés abióticos probados. En células de *Arabidopsis* se encontró que cuatro GSTs *tau* (*AtGSTU1*, *AtGSTU3*, *AtGSTU12*, *AtGSTU25*), se expresaron solo bajo un tipo de estrés específico, mientras que *AtGSTF8* y *AtGSTU7* fueron inducidos por múltiples tipos de estrés, sin embargo su expresión aumentó en gran medida en presencia de H₂O₂ (Sappl et al., 2009).

En cuanto a las GSTs de clase *phi* en *Physcomitrella patens*, de los 10 genes GSTs *phi* probados, nueve genes se expresan en respuesta a H₂O₂, y dos (*PpGSTF2* y *PpGSTF6*) se expresan sólo en respuesta a tratamiento con peróxido. Otros genes como *PpGSTF7*, que no fue detectado en condiciones normales pero si bajo todos los tipos de estrés probados, muestra la respuesta más alta hacia H₂O₂, mientras que *PpGSTF5*, el cual se expresa a un nivel muy bajo en ausencia de tratamientos, ve aumentada su expresión en gran medida bajo el efecto de H₂O₂ (Liu et al., 2013).

En plantas con frutos como banana y tomate, también se han estudiado los cambios en la expresión, así como la localización de las GSTs bajo estrés biótico, abiótico y bajo tratamientos con fitohormonas (Csiszár et al., 2014; Wang et al., 2013). En banana Wang y cols. en 2013, estudiaron cinco genes (*MaGSTU1*, *MaGSTU2*,

MaGSTU3, *MaGSTF1* y *MaGSTL1*), los tres genes *tau* fueron estimulados ante estrés del tipo abiótico (sequía, frío y salinidad). El gen *MaGSTU3* fue detectado en raíz, pseudotallo, hoja, flor y fruto con los más altos niveles en este último tejido, mientras los otros dos genes solo se detectaron en algunos de estos tejidos. Por otra parte, en tomate se encontró que dos genes codificantes de GST clase *tau* (*SIGSTU23*, *SIGSTU26*) fueron regulados bajo estrés salino, al igual que otros genes codificantes de GSTs de otras clases tales como *lambda*, *theta*, *zeta* y DHAR (Csiszár et al., 2014). De los anteriores, los dos genes tipo *tau* fueron regulados en hojas y el resto se expresó en raíces. Al igual que los genes *tau*, *SIGSTF4* (gen de GST tipo *phi*) fue regulado en hoja, pero éste en respuesta a ácido salicílico. En nuestro grupo de trabajo, recientemente se cuenta con un transcriptoma de mango ‘Ataulfo’ realizado a partir de mangos en etapa de madurez fisiológica y madurez comercial, que fueron sometidos a TH (Dautt-Castro et al., 2015). La respuesta al estrés producto de este TH, de los genes correspondientes a las clases más abundantes de GST en vegetales (*phi* y *tau*), se presenta en este trabajo.

III. HIPÓTESIS

La expresión de los genes codificantes de las enzimas GSTs clases *phi* y *tau*, así como la actividad GST se estimulará en respuesta al tratamiento hidrotérmico durante la maduración poscosecha de mango (*Mangifera indica* L.) cv. 'Ataulfo'.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del tratamiento hidrotérmico sobre la actividad de GST y la expresión génica de las clases *phi* y *tau*, durante la maduración poscosecha de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. ‘Ataulfo’.

IV.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión génica de GST clases *phi* y *tau* en mesocarpio de mango de diferentes estados de maduración poscosecha sometido a tratamiento hidrotérmico.
2. Determinar la actividad enzimática de GST en mesocarpio de mango de diferentes estados de maduración poscosecha sometido a tratamiento hidrotérmico.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1 Obtención y Tratamiento Previo de la Muestra

Se utilizaron dos lotes de mangos en estado de madurez fisiológica (verde) del cultivar 'Ataulfo' provenientes de una huerta comercial de Escuinapa, Sinaloa. Un lote de mangos se sometió a tratamiento hidrotérmico en las instalaciones de la empacadora, a 46.1 °C por 65 minutos y el otro lote de mangos no se trató. Los dos lotes se recogieron en la empacadora y se transportaron al laboratorio donde se almacenaron a 20 °C. Se obtuvieron muestras de mesocarpio (pulpa) de mango, por triplicado, a diferentes días de almacenamiento poscosecha, desde la madurez fisiológica hasta la madurez comercial (días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento). Las muestras se cortaron en trozos con un cuchillo de acero inoxidable tratado con RNAzap (Sigma-Aldrich). Una muestra de aproximadamente 20 g de pulpa se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino. Esta muestra fue almacenada a -80 °C y se utilizó posteriormente para la extracción de ARN total. Por otra parte, una porción igual de muestra cortada en trozos, se congeló con nitrógeno líquido y almacenó en bolsas de plástico a -80 °C para utilizarse en la determinación de actividad enzimática.

V.2 Perfil de Expresión de los Genes de GST

La determinación del perfil de expresión génica de las GSTs durante el proceso de maduración poscosecha del mango, se realizó mediante un análisis de expresión relativa por PCR cuantitativa (qPCR). Para lo anterior primero se realizó una extracción de ARN total a partir de mesocarpio de mango por el método de López-Gómez y Gómez-Lim (1992). Posteriormente el ARN extraído se sometió a un proceso de eliminación de ADN genómico y se utilizó para la síntesis de ADN complementario (ADNc). Finalmente se empleó este ADNc como templado para la

amplificación y cuantificación de los transcritos correspondientes a las GSTs de cada clase a evaluar, por medio de una reacción de PCR en tiempo real.

V.2.1 Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN, se utilizaron las muestras molidas de mesocarpio previamente congeladas con nitrógeno líquido. Se siguió el método de López-Gómez y Gómez-Lim (1992), partiendo de 0.5 g de tejido congelado, el cual se homogeneizó con 1 mL de solución amortiguadora de lisis (SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 1%, EDTA 50 mM y Tris base 150 mM, con un pH ajustado a 7.5 con ácido bórico 1 M) a temperatura ambiente.

El homogeneizado se sometió a vórtice por un minuto y rápidamente se agregaron 250 μ L de etanol absoluto, seguido de un vórtice por 30 segundos y posteriormente 110 μ L de acetato de potasio 5 M para finalmente someterlo a vórtice por 1 minuto. Se agregaron 700 μ L de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1) y se centrifugó a 20,000 x g por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa, se agregaron 500 μ L de una solución de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugó 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se agregaron 700 μ L de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y el ARN se precipitó con LiCl (3 M concentración final) a -20 °C durante toda una noche.

Al día siguiente el ARN se recuperó por centrifugación (20,000 x g durante 10 min a 4 °C), se descartó sobrenadante y el ARN precipitado (pellet) se lavó dos veces con etanol al 75% centrifugando a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C, para finalmente ser re-suspendido en 30 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). El ARN se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) para obtener la concentración de ARN, así como la relación de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm, para verificar el grado de contaminación por polisacáridos, compuestos fenólicos y/o proteínas. También se revisó la integridad mediante electroforesis en agarosa al 1% conteniendo formaldehído como agente desnaturizante. En la electroforesis se utilizó una solución de MOPS 1X (Sambrook y Russell, 2001) a 40 volts durante una

hora, y se observó por tinción con Gel Red (Biotium), utilizando un sistema fotodocumentador BIO-RAD Gel Doc™ EZ Imager.

V.2.2 Eliminación de ADN Genómico

El ARN íntegro y con alto grado de pureza (relaciones 260/280 y 260/230 nm > 1.8) se sometió a un proceso de eliminación de ADN genómico, para ello se incubó una reacción con el ARN a limpiar, 2.5 U de enzima DNasa I por µg de ARN y 5 µL de buffer de incubación 10X, la reacción se llevó a un volumen final de 50 µL con agua tratada con DEPC. La incubación se realizó a 35 °C por 23 minutos, pasado el tiempo de incubación se agregaron 2 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 µL de EDTA 0.5 M pH 8.0, para detener la reacción, y se aforó la mezcla a 100 µL. Posteriormente se agregaron 100 µL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 para la eliminación de proteína, y se centrifugó a 12,000 x g por 6 minutos a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y transfirió a un tubo nuevo, añadiendo 300 µL de etanol absoluto frío y 10 µL de acetato de amonio 5 M, para precipitar el ARN a -20 °C por 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 13,000 x g por 20 minutos y el precipitado se lavó con 250 µL de etanol al 70%, centrifugando a 13,000 x g por 1 minuto. Finalmente se resuspendió el pellet en 13 µL de agua tratada con DEPC.

Para comprobar que el proceso de eliminación de ADN genómico fue eficiente, se realizó una amplificación por PCR usando como templado 1 µL del ARN sometido al proceso de limpieza. La mezcla de reacción constaba de 6 µL de Go taq® Green Master Mix 2X (Promega) y 0.5 µL de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido GAPDH (10µl), que hibridan en una región del gen *GAPDH* de mango 'Ataulfo'. La reacción se llevó a un volumen final de 12 µL con agua miliQ. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Una fase de desnaturalización inicial (94 °C por 5 minutos), después siguieron 35 ciclos que consistieron en una desnaturalización (94 °C por 60 segundos), después la alineación (55 °C por 30 segundos), luego una extensión (72 °C por 60 segundos) y terminó con una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la electroforesis se utilizó buffer TBE (Sambrook y Russell, 2001), a 80 volts durante 45 minutos y se observó por tinción

con Gel Red (Biotium), por medio de un sistema fotodocumentador BIO-RAD Gel Doc™ EZ Imager.

V.2.3 Síntesis de ADNc Total

Para la síntesis de ADNc se partió de 5 µg de ARN total previamente extraído y libre de ADN genómico, se utilizó el sistema comercial *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este protocolo consta de una fase de desnaturalización y alineamiento a 65 °C por 5 minutos, de una mezcla que contiene al ARN templado, un iniciador (oligo dT, iniciador gen-específico ó iniciador al azar) y los dNTP's, después se coloca la mezcla en hielo por lo menos un minuto. Para la síntesis de la cadena sencilla de ADN se empleó un iniciador oligo (dT) más 10 µL de la mezcla de reacción para síntesis de ADNc, y se incubó la reacción a 50 °C por 50 minutos. Una vez pasado este tiempo, se sometió la reacción a una fase de terminación a 85 °C durante 5 minutos. Posteriormente para remover los híbridos ARN:ADN se añadió 1 µL RNasa H, incubando la reacción a 37 °C por 20 minutos. Para comprobar la síntesis de ADNc se realizó una amplificación por PCR con las mismas condiciones que las utilizadas para comprobar la eliminación de ADN genómico, con la única diferencia de que el templado fue 1 µL de una dilución 1:10 del producto de síntesis de ADNc. Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE, a 80 volts durante 45 minutos, y se observó por tinción con Gel Red (Biotium).

V.2.4 qPCR y Evaluación de la Expresión de *GST*

En la evaluación de la expresión por medio de qPCR, se utilizaron iniciadores específicos (Tabla 1) para las secuencias de *GST phi* y *tau* a evaluar, los cuales fueron diseñados en base a un análisis de secuencias (ClustalW2) (Larkin et al., 2007), donde se alinearon las secuencias nucleotídicas de *GST phi* y *tau* para seleccionar regiones no conservadas entre ambas secuencias y así obtener productos de amplificación específicos de cada gen.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó una mezcla comercial iQ™ SYBR® Green Supermix 2X (BIO-RAD), en reacciones de 20 µL de volumen total, de acuerdo a las instrucciones del proveedor, y la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Step-One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). La mezcla de reacción contenía 4 ng de ADNc como templado y 1 µL de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido específicos (5 µM) para cada clase a evaluar (Tabla 1). Se hicieron pruebas de rango dinámico para cada gen de interés y el normalizador (*GAPDH*), utilizando para las reacciones 100, 20, 4, 0.8 y 0.16 ng de ADNc, con el objetivo de evaluar la eficiencia de amplificación para cada uno de los pares de iniciadores que se utilizaron y verificar que se encuentren en un rango de entre el 90 y 100 % de eficiencia. Lo anterior para tener la certeza de que tanto el gen de interés como normalizador, se amplifican con la misma eficiencia y, por lo tanto, son comparables entre sí. La curva estándar se representó gráficamente calculando el Log_{10} de la concentración de ADNc utilizada en cada dilución contra los valores Ct (número de ciclos) obtenidos. El valor Ct indica el ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia generada se eleva por encima del umbral o punto de cruce del producto amplificado. Cuanto más ADNc específico contenga el material de partida, menor será el Ct. La correlación entre la fluorescencia y la cantidad de producto amplificado, permite la cuantificación exacta de moléculas amplificadas en un amplio rango dinámico, y al mismo tiempo conserva la sensibilidad y especificidad de los ensayos convencionales de PCR de punto final (Nolan et al., 2006). La expresión relativa se calculó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando *GAPDH* como gen normalizador. Finalmente, los datos se analizaron realizando análisis de varianza para buscar diferencias significativas en el perfil de expresión, tanto a lo largo del almacenamiento poscosecha como por efecto del tratamiento hidrotérmico.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación y cuantificación por qPCR de las GSTs clases *phi* y *tau*.

Nombre	Secuencia	Bases	% GC ^a	Tm °C ^b	Amplicón pb ^c
MiGSTFFW3	5'- GCT TGG ACA AGT TCT GGA CG -3'	20	55	56.2	106
MiGSTFRV3	5'- CTG TGT GAA GGG AAG ATG AC -3'	20	50	52.9	
MiGSTUFW1	5'- GTC CCT CCA TTC TTC CTT CC -3'	20	55	54.9	112
MiGSTURV1	5'- CCT TGA GCA CTC GCT ATT CC -3'	20	55	55.6	

^a % GC = Contenido de guanina y citosina.

^b Tm = Temperatura de hibridación.

^c pb = Pares de bases

V.3 Determinación de Actividad Enzimática GST Total

Se determinó la actividad total de GST, empleando un extracto obtenido a partir de 10 g de mesocarpio de las muestras congeladas y almacenadas. A estas muestras se agregaron 20 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM pH 6.0, conteniendo EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, β -Mercaptoetanol 1 mM y 2% de PVPP. Una vez mezclados los componentes se homogenizó el tejido en un homogenizador Ultraturrax y se centrifugó a 5,000 x g por 15 minutos, posteriormente se recolectó el sobrenadante y se sometió a otro centrifugado a 20,000 x g por 30 minutos. El clarificado obtenido se concentró por medio de un filtro para centrífuga de 30 kDa (Millipore) a 5,000 x g hasta obtener un volumen final de 500 μ L. El ensayo de actividad de GST se realizó con el producto resultante de la concentración, utilizando el método de Habig y cols. (1974), el cual emplea glutatión reducido (GSH) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) como sustratos. En este ensayo se mide el producto de la conjugación de glutatión con CDNB, catalizada por la enzima GST. La reacción se llevó a cabo en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH 6.5, empleando 1 mM de GSH, 1 mM de CDNB y 25 μ L del extracto concentrado. Se determinó la absorbancia a 25 °C en un espectrofotómetro a 340 nm durante 3 minutos. Para calcular la actividad enzimática GST total se utilizó el

coeficiente de extinción molar $\varepsilon = 9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig et al., 1974). Finalmente se determinó la concentración proteica al extracto concentrado, por el método de Bradford en microplaca (BioRad), usando BSA (seroalbúmina bovina) como estándar. Los resultados de actividad GST total se expresaron en nmoles/min/mg de proteína total.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Análisis de Secuencias y Diseño de Iniciadores

En este trabajo se analizaron las secuencias nucleotídicas que codifican para enzimas GSTs, una clase *tau* y otra clase *phi*, obtenidas en nuestro grupo de trabajo a partir de un transcriptoma de mango ‘Ataulfo’. La región codificante de la GST clase *tau* consta de 690 nucleótidos que codifican para una proteína deducida de 229 aminoácidos (Figura 2), mientras que la de GST clase *phi* consta de 634 nucleótidos que codifican para una proteína deducida de 210 aminoácidos (Figura 3). Cada una de las secuencias aminoacídicas se analizó por medio del algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990), para compararlas con secuencias de proteínas registradas en la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple utilizando el algoritmo ClustalW2 (Larkin et al., 2007), de cada una de las secuencias aminoacídicas analizadas en este trabajo, con secuencias de diversas especies que mostraron mayor grado de similitud (Figuras 4 y 5). Se encontró que la GST clase *tau* a evaluar mostró mayor similitud con una GST clase *tau* 17 de Ciruela china (*Prunus mume*, XP_008221708.1), mientras que la clase *phi* resultó más similar a una GST clase *phi* 9 de naranja (*Citrus sinensis*, XP_006484981.1).

```

1  M A K S D V K L L G A W P S P Y V M R A
1  ATGGCGAAAAGTGACGTGAAGCTTTTGGGTGCATGGCCGAGCCCATATGTGATGAGGGCA
21  R I A L N V K S V D Y E L L E E T L G S
61  AGAATCGCCCTCAACGTCAAATCTGTGGACTATGAGTTATTGGAGGAGACGCTTGGATCG
41  K S D L L L K S N P V H K K I P V L I H
121  AAAAGTGACCTTCTTCTTAAATCAAACCCAGTTTACAAGAAAATTCCTGTTCTAATTCAT
61  N D K P I C E S L I I V H Y I D E F W S
181  AACGATAAGCCTATATGTGAGTCTCTCATTATTGTTCACTACATCGATGAGTTTGGTCC
81  S G P S I L P S D P Y D R A I A R F W A
241  TCTGGTCCCTCCATTCTTCTTCCGATCCCTATGACCGTGCCATCGCTCGCTTTTGGGCC
101  A Y L D E K W Y P S L K G I A S A Q G E
301  GCCTATCTTGATGAAAAGTGGTACCCTTCGTTGAAAGGAATAGCGAGTGCTCAAGGAGAG
121  E A K K A A V D Q V G E S L A L I E D T
361  GAAGCTAAAAAAGCTGCTGTTGACCAAGTTGGGGAAAAGTTTGGCTTTGATAGAGGATACT
141  Y V K L S K G K P F F G G E K I G Y L D
421  TATGTGAAGTTGAGCAAAGGTAAGCCTTTCTTTGGTGGGGAGAAAATTGGGTATCTCGAC
161  I A F G C F L G W L R V T E K T S G V K
481  ATTGCATTTGGGTGCTTCTTGGGTTGGCTGAGAGTGACGGAGAAGACGAGTGGGGTTAAG
181  F L N E A K T P H L A K W A V R F C A D
541  TTTCTTAATGAAGCAAAAACCTCCTCATTGCGAAGTGGGCTGTGAGGTTTTGTGCTGAT
201  P A V K D V M P E T E K L A E F A K L L
601  CCTGCTGTGAAGGACGTTATGCCTGAAACTGAGAAGCTTGCTGAATTTGCCAAGCTTCTT
221  A K F R A G P P K -
661  GCCAAGTTCAGAGCTGGCCCTCCAAAATGA

```

Figura 2. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de GST clase *tau*.

```

1  M V V K V Y G P A Y A S P K R V M V C L
2  TTAGAAGTGCATGATCTTCTCCAGGATGGTCTGTTGCTAATTTTCATCCACCAGCGACT
21  A E K G I E F E T V P V D L I K G E N R
62  CACATTCTTCCCTGTCTCTTATCATATACTCCTTTCCATTGGCCCAACCAAGTACTGTGT
41  N P E F L K L Q P F G S L P V I Q D G D
122  GAAGGGAAGATGACTCAGATCAGCCAGGCTGAAGAAATCTCCACCTAAGTACTTGCTTTC
61  Y T L Y E S R A I I R Y Y A E K Y K S Q
182  AGAGAGTCTCTTCTCATATACGTCCAGAAGCTTGTCCAAGCTTTTCTTCACTCTCCTTAAT
81  G T D L L G K S I E E R G V V E Q W L E
242  CAACTTCTCATCTGAGGGAATTCGAGTTTGGGAAGCAAATAAAATTTGTACTGTCTATGTC
101  V E A H N F H P P I Y D M T V Q I L F A
302  GTATATTGGAGGATGAAAGTTGTGCGCCTCAACCTCTAGCCATTGTTCCACAACACCTCG
121  S K L G I P S D E K L I K E S E E K L G
362  TTCTTCTATGGATTTCCCCAGGAGATCAGTTCCCTGAGACTTGTATTTTTTGCATAATA
141  Q V L D V Y E K R L S E S K Y L G G D F
422  CCGTATGATAGCTCTGGATTCATATAAAGTGTAATCTCCGTCTTGAATAACGGGAAGTGA
161  F S L A D L S H L P F T Q Y L V G P M G
482  TCCAAAAGGCTGTAAGTGGAGGAACTCAGGATTTCTATTCTCTCCCTTGATAAGATCAAC
181  K E Y M I R D R K N V S R W W D E I S N
542  AGGGACAGTCTCAAATTCAAATTCCTTCTCAGCCAGGCATACCATCACCCGCTTTGGTGA
201  R P S W K K I M Q F -
602  AGCGTAGGCTGGTCCGTACACCTTACCACCAT

```

Figura 3. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la GST clase *phi*.

Prunus_mume	1	MAKNDLKVLGAWPSPFVMRARTALNPKSLDYEFLLEETFGSKSOLLLOSNPVHKKIPVLIH
Prunus_persica	1	MAKNDLKVLGAWPSPFVMRARTSLNPKSLDYEFLLEETFGSKSOLLLOSNPVHKKIPVLIH
Manguijera_indica	1	MAKSDVKVLGAWPSPFVMRARTALNPKSLDYEFLLEETFGSKSOLLLOSNPVHKKIPVLIH
Citrus_sinensis	1	MAKSDVKVLGAWPSPFVMRARTALKPKSVEYEFLEENLGSKEELLKSNPVHKKIPVLIH
Prunus_mume	61	GDKPICESLIVIVEYIDEVMA--SSPSILPSQPYDRATARFWASVIDERWFPAMKGTAAAQA
Prunus_persica	61	GDKPICESLIVIVEYIDEVMP--SSPSILPSHPYDRATARFWASVIDERWFPAMKGTAAAQA
Manguijera_indica	61	NDKPICESLIIIVEYIDEVWSS--GSPSILPSDPYDRATARFWAAVYDERWYPSLKGIAAQA
Citrus_sinensis	61	NDKPVCESLIIVIVEYIDEVWSS--GSPSILPSDPYDRATARFWAAVYDERLFPALKSTGASDG
Prunus_mume	120	EEARKAAIEQVAEGLALEDAFQKTSKGDFFSGDKIGYLDIAFGCFLGWLRVTEIMNGI
Prunus_persica	120	EEARKAAIEQVAEGLALEDAFQKTSKGDFFSGDKIGYLDIAFGCFLGWLRVTEIMNGI
Manguijera_indica	120	EEAKKAAVDQVGEHALLEDTVVLSKGGKPPFGGEKIGYLDIAFGCFLGWLRVTEITSGV
Citrus_sinensis	121	AEAKEAAIEQLIIEGLVLEDAFVCKSKGKPPFGGSOIGFLDIAFGCFLGWLRVTEIMIEV
Prunus_mume	180	KFLDEETKTPGLAKWAHKFCADA AVKDVPETEKLAEVAKIITAKLRGAGAPPK
Prunus_persica	180	KFLDEETKTPGLAKWAHKFCADA AVKDVPETEKLAEVAKIITAKLRGAGAPPK
Manguijera_indica	180	KFLNEAKTPHLAKWAVRFCADPAVKDVPETEKLAEPKLLAKF--RAGPPK--
Citrus_sinensis	181	KFLDEVKTPGLFKWAERFCADA AVKDVPETEKLAEPKVLAKL--RAGKWN--

Figura 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GST clase tau de *Manguijera indica* L. cv. 'Ataulfo' con GSTs de otras especies. *Prunus mume* (XP_008221708.1), *Prunus persica* (XP_007226100.1), *Citrus sinensis* (XP_006483268.1).

Prunus_mume	1	MVVKVYCAAYASPKRVI VCLVERKEVD FETIPFDLKGHEKHPFLKLOPFCTVPLIQDGD
Manguijera_indica	1	MVVKVYCPAYASPKRVI VCLAERKGIETETVPVDLKGERRNPEFLKLOPFCSLPVIQDGD
Citrus_sinensis	1	MVVKVYCPAYASPKRVI VCLIERQIETETAPVDLKGERRNPEYLLKLOPFALPVIQDGD
Citrus_clementina	1	MVVKVYCPAYASPKRVI VCLIERQIETETAPVDLKGERRNPEYLLKLOPFALPVIQDGD
Prunus_mume	61	YTLYESRAIRIYYAEKYK SQGTALLGKTI EERGLVEQWLEVEAHNHPPIYDMLVHLILFA
Manguijera_indica	61	YTLYESRAIRIYYAEKYK SQGTDLGKSI EERGLVEQWLEVEAHNHPPIYDMLVHLILFA
Citrus_sinensis	61	FTLYESRAIRIYYAEKYK SQGTLLGKTI EERGLVEQWLEVEAHNHPPIYEMTVQLLFA
Citrus_clementina	61	FTLYESRAIRIYYAEKYK SQGTLLGKTI EERGLVEQWLEVEAHNHPPIYEMTVQLLFA
Prunus_mume	121	SALGFPSDPKVIQESSEKLGKVLVDIYEGRLSKSKYL AGDFFSLADLSHLPPFTQYLVGPMG
Manguijera_indica	121	SKLGLIPSDERLIKESSEKLGKVLVDIYEGRLSKSKYL AGDFFSLADLSHLPPFTQYLVGPMG
Citrus_sinensis	121	SKLGLSVDEKLVKSEKLGKVLVDIYEGRLSKSKYL AGDFFSLADLSHLPPFTQYLVGPMG
Citrus_clementina	121	SKLGLSVDEKLVKSEKLGKVLVDIYEGRLSKSKYL AGDFFSLADLSHLPPFTQYLVGPMG
Prunus_mume	181	KEYMIRDRKHVSAWWDISNRPSWKKVLEFGGPF
Manguijera_indica	181	KEYMIRDRKHVSAWWDISNRPSWKKIMQF---
Citrus_sinensis	181	KEYMIRDRKHVSAWWDISNRPSWKKVLELY---
Citrus_clementina	181	KEYMIRDRKHVSAWWDISNRPSWKKVLELY---

Figura 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GST clase phi de *Manguijera indica* L. cv. 'Ataulfo' con GSTs de otras especies. *Citrus clementina* (XP_006437116.1), *Citrus sinensis* (XP_006484981.1), *Prunus mume* (XP_008229575.1).

La secuencia deducida de aminoácidos de la GST tau de mango presentó un 76% de identidad con la GST tau de la ciruela china (*Prunus mume*), 75% con la GST tau de durazno (*Prunus persica*) y 77% con la GST tau de naranja (*Citrus sinensis*). La secuencia deducida de aminoácidos de la GST phi de mango presentó un 85% de identidad con la especie mandarina (*Citrus clementina*), 84% de identidad con naranja (*Citrus sinensis*) y 78% con ciruela china (*Prunus mume*). Finalmente también se realizó un alineamiento de las dos secuencias de GST de mango a evaluar, tau y phi. Se encontró que solo presentaban un 13% de identidad, sin embargo ambas presentaban residuos conservados que les permiten realizar una

función de GST, tales como los sitios de unión a glutatión (sitio G) y el sitio de unión a sustrato (sitio H) (Figura 6).

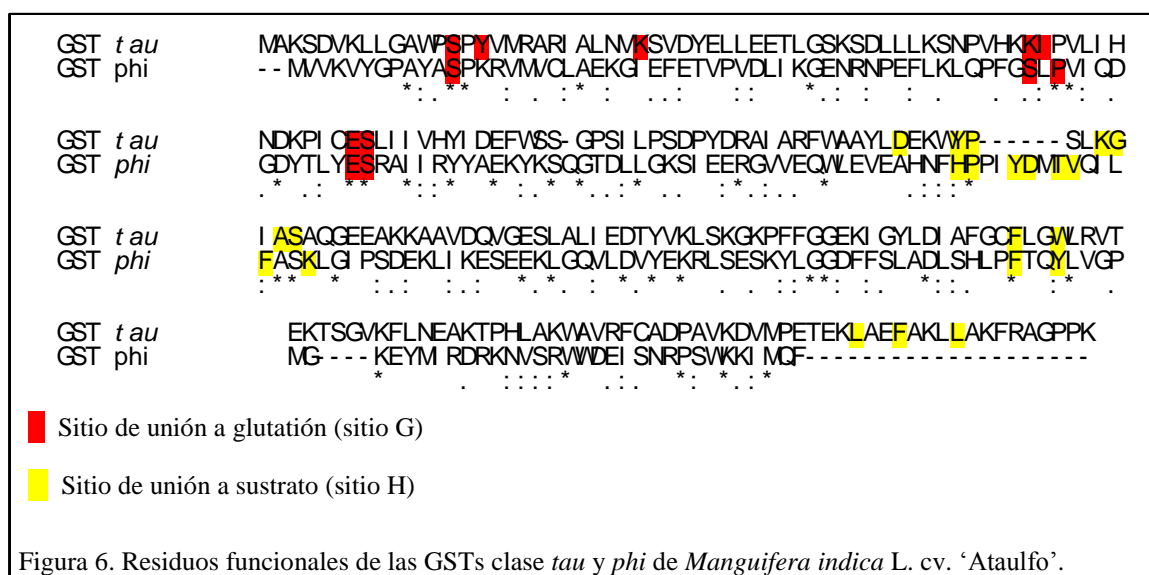


Figura 6. Residuos funcionales de las GSTs clase *tau* y *phi* de *Manguijera indica* L. cv. 'Ataulfo'.

VI.2 Obtención de ADNc

Un paso crucial en la evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativa, es la calidad del ARN que se utilizará para la síntesis de ADNc. El protocolo de extracción utilizado debe proporcionar como producto final un ARN total aislado de buena calidad (Rienth et al., 2014) y con un alto grado de integridad. Una vez obtenido dicho grado de pureza e integridad, el ARN puede ser utilizado como templado en técnicas como qPCR para obtener perfiles de expresión génica (Gasic et al., 2004; Gehrig et al., 2000). Los perfiles de expresión génica permiten asignar funciones putativas a los genes analizados (Meisel et al., 2005).

VI.2.1 Aislamiento y Evaluación de la Integridad del ARN Total

A partir de 1 g de tejido de mesocarpio de mango se obtuvieron rendimientos desde 11.9 µg a 60.4 µg de ARN total, rendimientos similares a los reportados por Meisel y cols. (2005) en durazno (24 µg/g peso fresco). En este trabajo los rendimientos de la extracción no variaron en gran medida a pesar de los cambios fisiológicos y bioquímicos que sufre el mango durante su maduración poscosecha, como lo son el

aumento de metabolitos secundarios que pudieran interferir en la obtención del ARN aislado. En manzana y vid se ha reportado que conforme el fruto maduraba los rendimientos en las extracciones de ARN total tendieron a bajar (Gasic et al., 2004; Rienth et al., 2014).

Un parámetro para la determinación de calidad en el ARN obtenido es la relación de las absorbancias a 260/280 nm y 260/230 nm. Relaciones menores a 1.8 son considerados como un indicador de contaminación (Rienth et al., 2014). La contaminación por proteína se puede detectar en la relación 260/280, mientras que en el caso de la relación de absorbancias 260/230, se puede detectar contaminación por carbohidratos, fenol, reactivos como el TRIzol entre otros (Russell et al., 2008). El ARN extraído de mango registró relaciones de absorbancia 260/280 nm de 1.85 a 2.18, y relaciones de absorbancia 260/230 nm de 1.84 a 2.50, relaciones mayores que las reportadas por Meisel y cols. (2005) al usar un método con TRIzol, y similares a las de Gasic y cols. (2004) y Rienth y cols. (2014), en manzana y vid respectivamente.

Un requisito importante para una síntesis de ADNc correcta es la integridad de la molécula de ARN mensajero. Al evaluar la integridad del ARN extraído en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturizantes, se observaron las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S bien definidas, siendo la banda 28S la que se observa de mayor grosor e intensidad (Figuras 7 y 8). Estos resultados concuerdan con los de Deepa y cols. (2014) y Meisel y cols. (2005) en cúrcuma (*Curcuma longa*) y durazno (*Prunus persica*) respectivamente, donde la banda 28S muestra aproximadamente dos veces más intensidad que la 18S. Además es evidente la presencia de otras bandas entre la 28S y 18S al igual que en los protocolos de Gasic y cols. (2004) en manzana y Vasanthaiah y cols. (2008) en vid (*Vitis vinífera*). Sin embargo, dichas bandas intermedias se observaron más definidas en este trabajo, lo que sugiere una nula degradación a pesar de que la electroforesis se realizó a temperatura ambiente (Deepa et al., 2014; Kiefer et al., 2000).

La tercera banda bien definida (Figuras 7 y 8) podría identificarse como alguna de las subunidades ribosomales de mitocondria y cloroplastos de células vegetales, ya que estas poseen subunidades 16S y 5S (Dey y Harborne, 1997). En algunos estudios se ha detectado la banda correspondiente a la subunidad 16S en gels de

agarosa. Walkera y cols. (1998) detectaron en maíz la banda 16S muy cercana a la 18S, como se observó en este trabajo, por lo que esta podría corresponder a dicha subunidad. Otros estudios también han mostrado la banda correspondiente a la subunidad 5S (Esmaeili y Zaker, 2011; Zhang et al., 2011), sin embargo, esta banda no fue detectada en nuestra corrida electroforética.

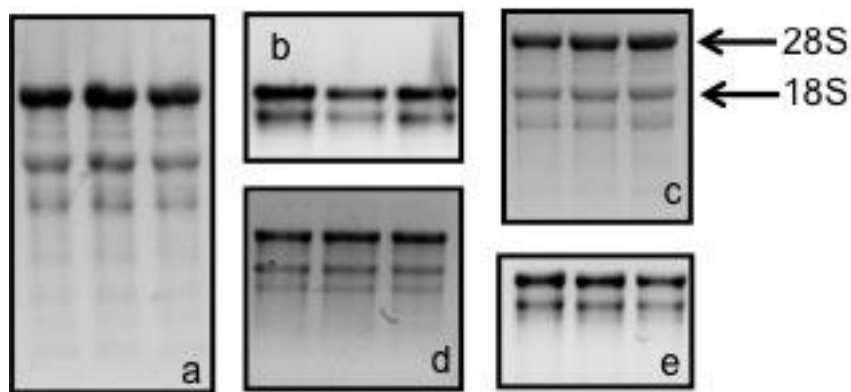


Figura 7. Análisis electroforético del ARN extraído de mango testigo a diferentes días de almacenamiento poscosecha. a) día 1, b) día 3, c) día 5, d) día 7 y e) día 9. Las flechas indican la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

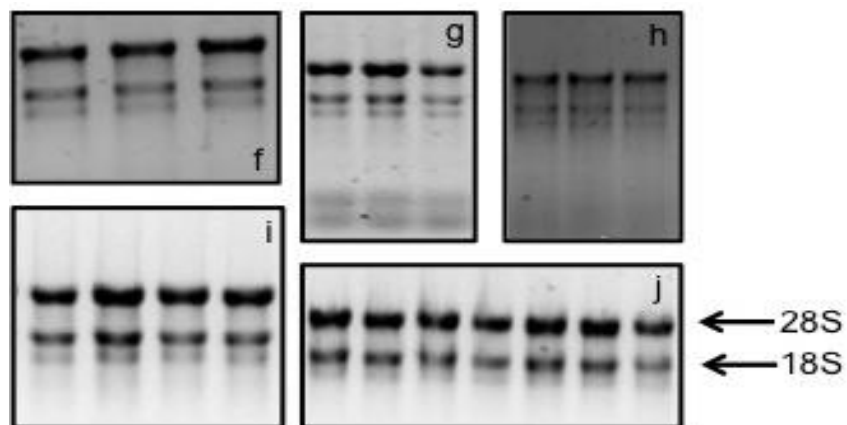


Figura 8. Análisis electroforético del ARN extraído de mango tratado a diferentes días de almacenamiento poscosecha. f) día 1, g) día 3, h) día 5, i) día 7 y j) día 9. Las flechas indican la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

VI.2.2 Evaluación y Síntesis de ADNc

El ARN utilizado en la síntesis de ADNc, fue sometido a un proceso de eliminación de ADN genómico, el cual se comprobó mediante una reacción de PCR usando

como templado el ARN sometido a dicho proceso. Al analizar el producto de reacción en un gel de agarosa al 1%, no se observó amplificación. Por lo tanto el protocolo de limpieza aplicado mostró ser efectivo, además no causa la degradación del ARN, sin embargo la concentración del material genético extraído al finalizar el protocolo de limpieza, baja aproximadamente a la mitad. De igual manera una vez realizada la síntesis de ADNc, utilizando 5 μ g del ARN libre de ADN genómico, se comprobó la síntesis de ADNc mediante una PCR y tal como se observa en la Figura 9, es evidente una banda a los 200 pb aproximadamente, correspondiente al fragmento del gen *GAPDH* utilizado como control. Por lo tanto la síntesis de ADNc total utilizando el sistema comercial Superscript III fue eficiente.

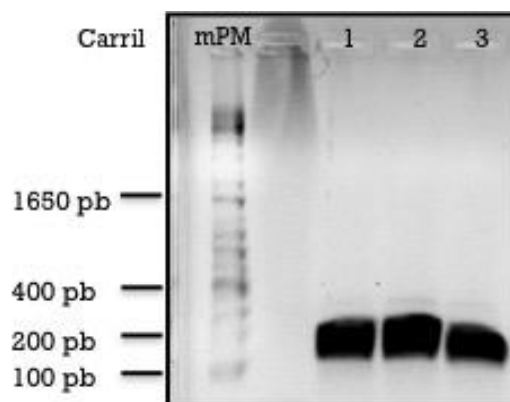


Figura 9. Análisis electroforético del ADNc total de mango sometido a PCR. mPM: Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen). Carril 1 y 2: ADNc total de mango sometido a PCR. Carril 3: Control positivo.

VI.3 Evaluación y Análisis de la Expresión Relativa de *GST phi* y *tau* de Mango

Los datos de expresión génica relativa obtenidos de las reacciones de qPCR se evaluaron por el método $\Delta\Delta C_t$ comparativo, resultando dentro de la normalidad al analizarse por el método de Kolmogorov. Estos datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para buscar diferencias significativas en la expresión relativa de los dos genes de GST en estudio, a lo largo de almacenamiento poscosecha. Para lo anterior se utilizaron las muestras de los días 1,

3, 5, 7 y 9 tanto de mango sometido a tratamiento hidrotérmico como de mangos sin tratar (testigo).

VI.3.1 Efecto del Almacenamiento Poscosecha Sobre la Expresión Génica de GST *phi* y *tau* de Mango

La expresión de estos genes en los mangos testigo, se evaluó durante el almacenamiento poscosecha de los frutos. La expresión relativa de los genes que codifican para las dos clases de GST evaluadas, fue mayor y estadísticamente diferente en los frutos del día 3 de almacenamiento poscosecha, con respecto a la expresión en los frutos del resto de los días evaluados (Figuras 10 y 11). A partir del día 3 la expresión de GST *tau* y *phi* disminuyó hasta llegar a sus niveles más bajos en los frutos de los días 7 y 9, no habiendo diferencias estadísticas en su expresión.

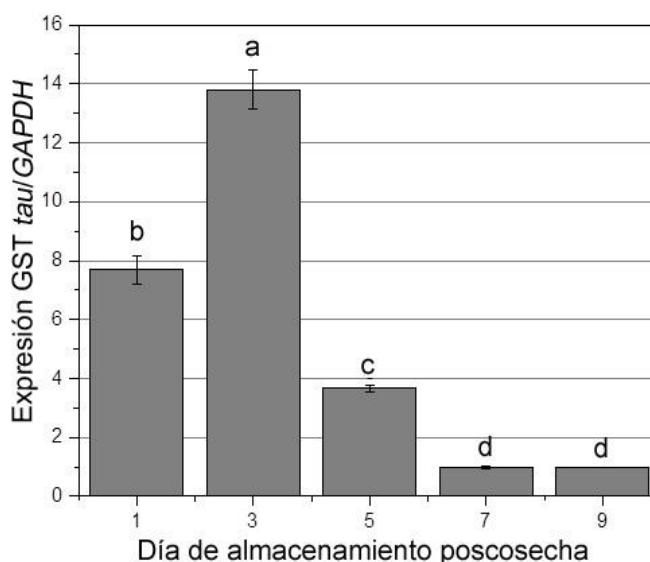


Figura 10. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *tau* en mangos testigo de la variedad 'Ataulfo' durante su almacenamiento poscosecha. Se presenta la media \pm error estándar de una mezcla de tres replicas biológicas medidas por triplicado. Diferente literal significa diferencias estadísticas obtenidas por la prueba de Fisher ($P < 0.01$). Los datos fueron evaluados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

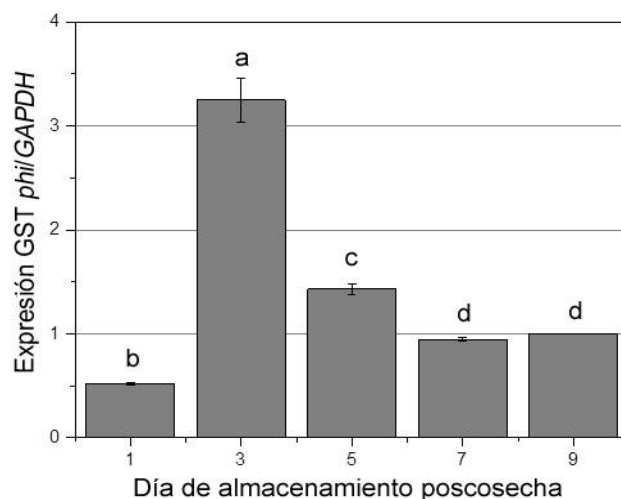


Figura 11. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *phi* en mangos testigo de la variedad 'Ataulfo' durante su almacenamiento poscosecha. Se presenta la media \pm error estándar de una mezcla de tres replicas biológicas medidas por triplicado. Diferente literal significa diferencias estadísticas obtenidas por la prueba de Fisher ($P < 0.01$). Los datos fueron evaluados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

Se ha reportado que en plantas, la expresión de diversas GSTs es inducida por el etileno de manera diferencial (Chen et al., 2012; Gong et al., 2005; Itzhaki et al., 1994; Itzhaki y Woodson, 1993; Smith et al., 2003; Zhou y Goldsbrough, 1993). En un estudio realizado en plantas de *Arabidopsis* con mutaciones en los receptores de etileno ETR1, la expresión de *AtGSTF2* (GST *phi*) en hojas se vio disminuida en gran medida, con respecto a sus niveles en la variedad silvestre. Además en hojas y semillas de plantas silvestres (no mutantes), un tratamiento con etileno estimuló una mayor expresión de *AtGSTF2* (Zhou y Goldsbrough, 1993). Otro estudio en *Arabidopsis* también con mutantes *etr1*, reportó de nuevo que las plantas testigo mostraron mayor expresión de *AtGSTF2* que las mutantes; sin embargo, al someterlas a diversos tratamientos como glutatión, cobre, herbicidas, ácido salicílico y auxinas, todos los tratamientos estimularon los niveles de expresión de *AtGSTF2* (Smith et al., 2003).

Además, en otros estudios como los de Itzhaki y cols. (1994), y (Maxson y Woodson, 1996), han reportado en clavel *Dianthus caryophyllus* L. cv. 'White Sim', un sitio de respuesta a etileno (ERE) en la región 5' corriente arriba de un gen GST *phi*. El sitio ERE localizado tiene alta similitud a un elemento de respuesta a etileno

localizado en el gen *E4* de tomate, el cual es controlado transcripcionalmente por etileno durante la maduración del fruto. Los estudios citados anteriormente nos pueden indicar que algunas GSTs pueden ser reguladas por etileno, sin embargo éste no es el único factor que activa su expresión, ya que las GSTs pueden expresarse ante diversos factores de estrés en mutantes insensibles a etileno.

Los altos niveles de expresión relativa de *GST tau* y *phi* alcanzados en el día 3 de almacenamiento poscosecha de mango ‘Ataulfo’, podrían deberse al aumento súbito en la producción de etileno durante este almacenamiento, ya que estudios en otros cultivares de mango como ‘Kensington’ y ‘Nam Dokmai’ (Ketsa et al., 1999; Kim et al., 2007), registran su pico de etileno a los días 2 y 4 de almacenamiento poscosecha respectivamente. Es importante mencionar que el pico de etileno en mangos puede variar dependiendo del cultivar, sin embargo se observa que éste cae en los primeros días de almacenamiento poscosecha, tal como podría estar ocurriendo en mango ‘Ataulfo’. Por otra parte la temperatura de almacenamiento y el grado de madurez del fruto, también influyen en la síntesis de etileno; sin embargo, tanto las condiciones de almacenamiento como el estado de madurez en el que el fruto fue cosechado en estudios anteriores, fueron similares a las utilizadas en este trabajo.

VI.3.2 Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Sobre la Expresión Génica de GST *phi* y *tau* de Mango

La expresión relativa de los genes que codifican para las GST clase *tau* (Figura 12) y *phi* (Figura 13) evaluadas en mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico, fue mayor y estadísticamente diferente en mangos del día 1 de almacenamiento poscosecha con respecto a mangos del resto de los días evaluados. Es evidente una reducción en la expresión de ambos genes, decayendo ésta en los frutos de los días intermedios (día 3, 5 y 7), y registrando un menor nivel de expresión en frutos del último día muestreado (día 9).

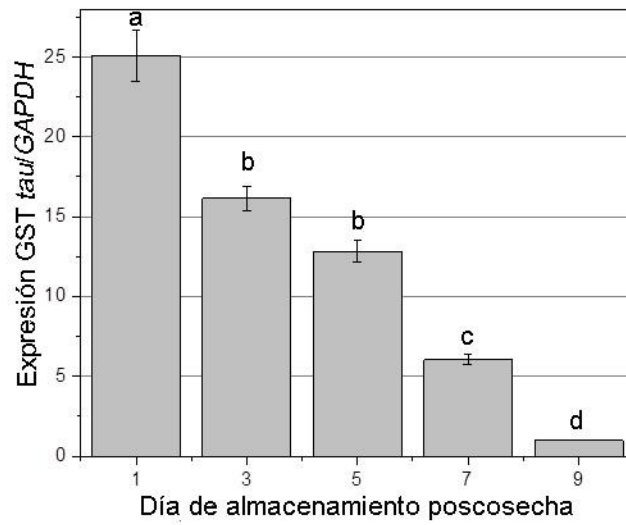


Figura 12. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *tau* en mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad 'Ataulfo' durante su almacenamiento poscosecha. Se presenta la media \pm error estándar de una mezcla de tres replicas biológicas medidas por triplicado. Diferente literal significa diferencias estadísticas obtenidas por la prueba de Fisher ($P < 0.01$). Los datos fueron evaluados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

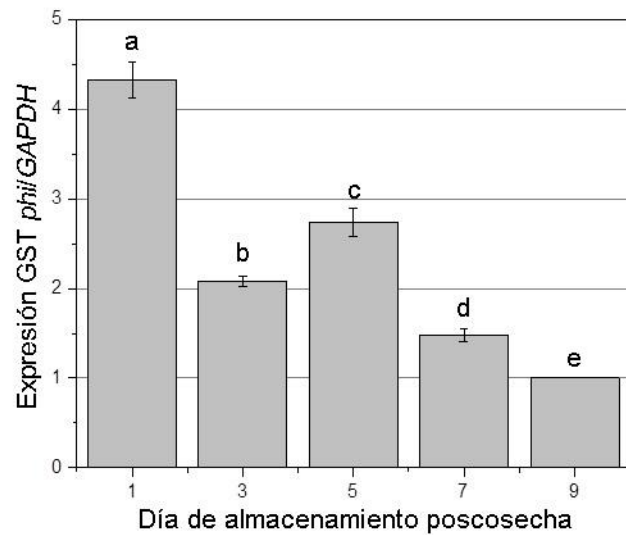


Figura 13. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *phi* en mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad 'Ataulfo' durante su almacenamiento poscosecha. Se presenta la media \pm error estándar de una mezcla de tres replicas biológicas medidas por triplicado. Diferente literal significa diferencias estadísticas obtenidas por la prueba de Fisher ($P < 0.01$). Los datos fueron evaluados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

Los tratamientos térmicos estimulan en los frutos un aumento de proteínas con capacidad antioxidante. Los niveles de expresión altos de *GST phi* y *tau* en los mangos del día 1, concuerdan con los niveles altos de proteína DHAR en durazno sometido a un tratamiento de blanqueado, donde en frutos al día 1 del tratamiento se detectó abundancia de la enzima DHAR (Lurie y Pedreschi, 2014). Se ha reportado que DHAR es co-inducida con las GSTs clases *phi* y *tau* en cereales, cuando se someten a estrés del tipo abiótico (Mohsenzadeh et al., 2011). Además de estimular la actividad de enzimas con capacidad antioxidante, los tratamientos térmicos en frutos también estimulan la síntesis de compuestos con actividad antioxidante, solo que estos últimos tienden a desaparecer en los primeros días de almacenamiento poscosecha (Lurie y Pedreschi, 2014). En el caso de las GST *phi* y *tau* de mango, sí bien reducen su expresión a lo largo del almacenamiento poscosecha, éstas aún son detectadas con diferencias significativas en los frutos hasta los últimos días muestreados (días 7 y 9).

En un estudio realizado en naranja sometida a tratamiento hidrotérmico, se detectó peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cual disminuyó a lo largo de su almacenamiento (Lurie y Pedreschi, 2014). En células de *Arabidopsis*, 11 genes codificantes de GSTs *tau* y 2 de GSTs *phi* (*GSTF3* Y *GSTF8*) aumentaron su expresión al ser tratadas con H_2O_2 . Una de las GSTs *tau* de *Arabidopsis* (*GSTU17*) (AEE28571.1), muestra un 66.5% de identidad con la GST *tau* de mango ‘Ataulfo’ (Figura 14). En cuanto a las GSTs de clase *phi*, en la *GSTF8* el H_2O_2 fue el factor que más aumentó sus niveles de expresión. Además la expresión de ésta fue mucho mayor que registrada por *GSTU17* bajo el mismo tratamiento (Sappl et al., 2009). La GST *phi* de mango ‘Ataulfo’ muestra un 36% de identidad con *GSTF8* de *Arabidopsis*, cabe destacar que la GST de mango es 53 residuos más corta hacia su grupo amino terminal que la de *Arabidopsis*, sin embargo un análisis de dominios y un alineamiento con la GST *phi* de mango, mostró que *GSTF8* de *Arabidopsis*, a partir del residuo 54, contaba con los mismos dominios de la GST clase *phi* de mango, además de una gran similitud con la secuencia de la GST *phi* de mango (Figura 15).

A. thaliana-GSTU17	1	MASSDVKLIGAWASPVVMRPRIALNLSKSVPEFLQETFGSKSELLLKSNPVHKKIPVLLH
M. indica-GST	1	MAKSDVKLIGAWPSPVVMRPRIALNLSKSVPEFLQETFGSKSELLLKSNPVHKKIPVLLH
A. thaliana-GSTU17	61	ADKPVSESNIVVEYIDDTWSSSGPSILPSDPYDRAMARFWAAYLDEKWFVALRGLKAGG
M. indica-GST	61	NDKPICESLIIVVEYIDDFWSSSGPSILPSDPYDRAMARFWAAYLDEKWFPSLKGIAAAG
A. thaliana-GSTU17	121	EEKKAIVIAOLEEGNAFLKAFIDCSKGGKPPFNGDNIGYLDIALGCFLAWLRVTELAVS
M. indica-GST	120	EEAKKAVDQVGEESLALIEDTYVKLSKGGKPPFNGDNIGYLDIAFGCFLAWLRVTEKTS
A. thaliana-GSTU17	181	KIDAEAKTPSTSKWAENFCNDPAVKVMPETAKLAEFAKLIFFPKQA---
M. indica-GST	180	KPLNEAKTPHLAKWAVRFCAADPAVKVMPETAKLAEFAKLIFFKFRAGPPK

Figura 14. Alineamiento de GST *tau* 17 de *Arabidopsis thaliana* (AEE28571.1) con GST *tau* de mango ‘Ataulfo’.

A. thaliana-GSTF8	1	MGAIQARLPFLFLSPPSIKHHTFLHSSSSNSNFKIRSNKSSSSSSSIIMASIKVHGVPM
M. indica-GST	1	-----MVKVYVGPAY
A. thaliana-GSTF8	61	TATMRVLATLYEKDLOFELIPVDMRAJAHKQEAHLATNPFQIPALEDGDLTLESRAIT
M. indica-GST	11	ASPKRVMVCLAEEKGIEFETVPVDLIKGNRNPEFLKLPQPFGLPVLDGDVTLVESRAIT
A. thaliana-GSTF8	121	QVLAEEVSEKGEKLISQDCKVKATTNVWLOVEGOQFDPNASKLAFERVFKGMFGMTDP
M. indica-GST	71	RVYAEKVKSQGTDLGLGKSIE-ERGVVEQWLEVEAHNHPPIYDMTVQILFASKLGFPSDE
A. thaliana-GSTF8	181	AAVQELGKIQKVIDVVEARLAKSEFLAGDSFTLADLHHLPAIHVYLLG-TDSKVLFDSRP
M. indica-GST	130	KLTKESSEKLGQVLDVYEKRLSESKVLLGDFEELADLSHLFTQYLVGPMGKEYMIRDRK
A. thaliana-GSTF8	240	KVSEWIKKISAREPAWAKVIDLQKQ
M. indica-GST	190	NVSRWWEIISNRPSWKKIMQF---

Figura 15. Alineamiento de GST *phi* 8 de *Arabidopsis thaliana* (AEC10880.1) con GST *phi* de mango ‘Ataulfo’.

En otro estudio, pero en *Physcomitrella patens* (musgo), se evaluó la respuesta de varios genes codificantes de GSTs *phi* ante la presencia de peróxido de hidrógeno, se encontró que *PpGSTF2* y *PpGSTF6* sólo se expresaron en respuesta a H_2O_2 , mientras *PpGSTF1* y *PpGSTF7* respondieron a varios tipos de estrés, pero el H_2O_2 fue el tratamiento que más estimuló su expresión (Liu et al., 2013). Por otra parte en el mismo estudio se realizó un ensayo de actividad peroxidasa, con hidroperóxido de cumeno como sustrato, siendo *PpGSTF1*, *PpGSTF3*, *PpGSTF9* y *PpGSTF10* las GSTs *phi* que mostraron actividad peroxidasa. Dentro de la superfamilia de las GSTs, las clases *phi*, *tau* y *theta* (principalmente esta última) muestran actividad peroxidasa, sin embargo las GSTs *phi* y *tau* son las clases encontradas en mayor proporción (Dixon et al., 2002a; Dixon y Edwards, 2010; Dixon et al., 2010). El gran número de genes GSTs clase *tau* que responden a H_2O_2 , aunado a los altos y a veces específicos perfiles de expresión de algunos genes GSTs clases *phi* también en respuesta a H_2O_2 , nos permite sugerir que las GSTs *phi*

y *tau* evaluadas de mango 'Ataulfo', también pudieran responder a un estrés oxidativo causado por H₂O₂, los primeros días posteriores al tratamiento hidrotérmico.

El peróxido de hidrógeno no es la única molécula con alto potencial oxidante que se puede formar como consecuencia de un tratamiento térmico en los frutos. El estrés por calor puede producir compuestos hidroperóxidos, producto de la oxidación lipídica en las membranas celulares. Cloroplastos de tabaco transformados con genes *GST*, en combinación con *DHAR* y glutatión reductasa, mejoraron su tolerancia al estrés oxidativo causado por metilviológeno (MV), y se observó una menor peroxidación lipídica (Le Martret et al., 2011). Los α,β -aldehídos insaturados pueden surgir de la escisión de ácidos grasos insaturados y son más reactivos que otros aldehídos. Un ejemplo de esto es el trans-2-hexanal, que es un aldehído comúnmente formado durante la peroxidación de lípidos en plantas. Algunas GSTs *phi* y *tau* presentan actividad peroxidasa dependiente de glutatión, pudiendo reducir hidroperóxidos orgánicos y de esta manera ayudando a contrarrestar un estrés oxidativo (Dixon et al., 2002b; Dixon et al., 2009; Dixon et al., 2010). Las GSTs clase *tau* en plantas unen selectivamente derivados de ácidos grasos oxidados (Dixon y Edwards, 2010), así como algunas GSTs *phi* poseen actividad en contra de moléculas producto de la peroxidación lipídica, como el 4-hidroxinonanal en sorgo (Gronwald y Plaisance, 1998). En un trabajo con calabaza (*Cucurbita máxima* Duch), algunas GSTs de la clase *tau* (*CmGSTU1*, *CmGSTU2* y *CmGSTU3*) aumentaron su expresión cuando las semillas fueron tratadas con α,β -aldehídos insaturados y otros aldehídos relacionados (butiraldehído, crotonaldehído, trans-2-hexanal y ácido etacrínico) (Fujita y Hossain, 2003). Por otra parte en *CmGSTF1* no fueron visibles cambios en los niveles de expresión ante los tratamientos con aldehídos. En *Arabidopsis* varias GSTs de clase *phi* y *tau*, incluyendo GSTU17, GSTU25, GSTF6, GSTF8 y GSTF9, presentaron actividad glutatión peroxidasa en contra de hidroperóxido de cumeno, siendo mayor la actividad alcanzada por las GSTs de clase *tau*. Además, GSTU25 se probó contra los substratos ácido 13-hidroperoxi-9,11-octadecadienoico (18:2-OOH) y ácido 13-hidroperoxi-9,11,15-octadecatrienoico (18:3-OOH), presentando actividad hidroperoxidasa (Dixon et al., 2009). Las enzimas GSTU17 (Q9FUS8.1) y GSTF9

(NP_180643) de *Arabidopsis* presentan un 66.5% de identidad con respecto a las GSTs homólogas de mango ‘Ataulfo’ (Figura 14 y 16).

A. thaliana-GSTF9	1	MVLRVYGP	PHFASPKRALV	TLIEKGVAFETI	PVDLMKGEHKQ	PAYLALQ	PPFC	TPFAVVDGD
M. indica-GST	1	MVLRVYGP	PAYASPKRVM	CLAEKGI	EFETVPVDL	IKGENRNP	EFLLK	LPFC
A. thaliana-GSTF9	61	YKIFESRA	VVMRYVAEKY	RSQGP	DLLGKTVE	DRGOVEQ	WLDVE	ATTYHPPL
M. indica-GST	61	YTLYESRA	LIRYVAEKY	RSQGT	DLGKSI	ERGVVEQ	WLEVE	AHNFHPPI
A. thaliana-GSTF9	121	SVMG	FP	SDEK	LKISEE	KL	AGVLD	VYEAHLSK
M. indica-GST	121	SKL	G	IP	SDEK	LKISEE	KL	GOVLD
A. thaliana-GSTF9	181	KAYMI	KDRR	HVS	AWDD	DIS	SR	PAWKE
M. indica-GST	181	KEYMI	RDRR	NVSR	WWD	IS	NR	PSWKK

Figura 16. Alineamiento de GST *phi* 9 de *Arabidopsis thaliana* (NP_180643) con GST *phi* de mango ‘Ataulfo’.

Tanto GSTs *tau* como *phi* han demostrado tener actividad peroxidasa dependiente de glutatión. La clase *tau* parece tener una actividad peroxidasa más alta, así como más miembros con dicha actividad que la clase *phi* en *Arabidopsis*. Esto aunado al hecho de que la expresión de *GSTF1* en calabaza en presencia de α,β -aldehídos insaturados no fue estimulada a diferencia de las GSTs *tau*, así como el alto porcentaje de identidad de estas proteínas con las GSTs de mango estudiadas en este trabajo, podrían sugerir que la GST *tau* de mango ‘Ataulfo’, puede estar implicada en la protección celular contra daños causados por hidroperóxidos de ácidos grasos.

Para analizar el efecto del tratamiento hidrotérmico en cada día de almacenamiento poscosecha muestreado, los datos de expresión génica se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con un arreglo factorial asimétrico 2 x 5. Lo anterior para buscar diferencias significativas en la expresión relativa de los genes codificantes de las dos GSTs estudiadas, en cada día de almacenamiento poscosecha, entre los mangos testigo y los sometidos a tratamiento hidrotérmico. Tanto el día de almacenamiento poscosecha, el tratamiento hidrotérmico, así como la interacción de los dos factores resultaron significativos ($p < 0.01$).

Las GSTs *phi* y *tau* de mango ‘Ataulfo’ se encuentran expresadas mayormente, y son estadísticamente diferentes, en mangos tratados hidrotérmicamente con

respecto a los testigos en los días 1, 5 y 7 de almacenamiento poscosecha (Figuras 17 y 18). La GST clase *phi* es la que muestra un mayor aumento en su expresión en mangos tratados con respecto a los testigos, esto en el día 1, siendo 8 veces más expresada (Figura 17). Sin embargo los niveles de expresión de GST clase *tau* son mayores a los de *phi* en todos los días evaluados (Figura 18). Se ha reportado que las GST *phi* tienen una respuesta más específica y alta hacia tratamientos con H₂O₂ (Liu et al., 2013; Sappl et al., 2004), molécula con alto potencial oxidante detectada en frutos los primeros días tras tratamientos térmicos (Lurie y Pedreschi, 2014). Esto concuerda con los resultados de expresión en frutos de mango ‘Ataulfo’ del día 1 de almacenamiento poscosecha, donde la GST *phi* se mostró 8 veces más estimulada con respecto al testigo.

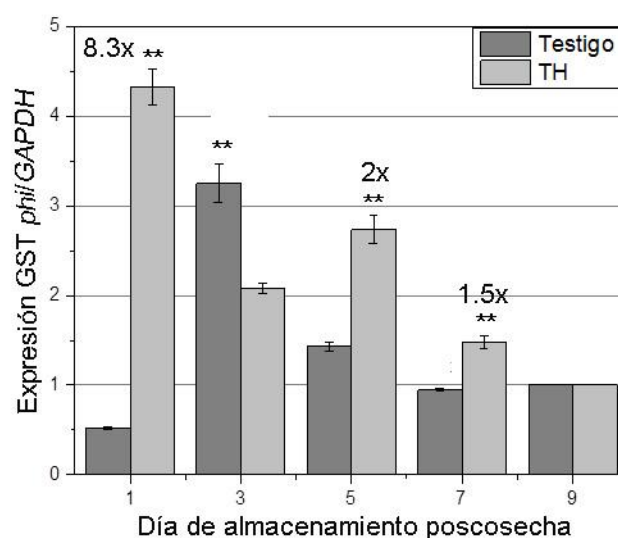


Figura 17. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *phi* en mangos testigo y sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha. Se presenta la media \pm error estándar de una mezcla de tres replicas biológicas medidas por triplicado. Asterisco significa diferencias estadísticas obtenidas por la prueba de Fisher ($p < 0.01$). Los datos fueron evaluados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

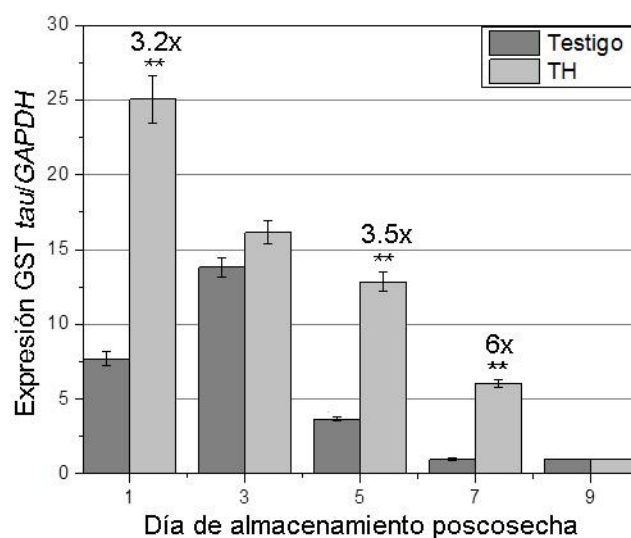


Figura 18. Expresión relativa del gen que codifica para GST clase *tau* en mangos testigo y sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha. Se presenta la media \pm error estándar de una mezcla de tres replicas biológicas medidas por triplicado. Asterisco significa diferencias estadísticas obtenidas por la prueba de Fisher ($P < 0.01$). Los datos fueron evaluados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

El compuesto malonaldehído producto de la peroxidación de lípidos, se ha encontrado tras un tratamiento hidrotérmico en mango de la variedad ‘Keiit’, desde etapas iniciales, y aumentando de manera significativa días después (durante su almacenamiento poscosecha) (Djioua et al., 2009). Algunas GSTs *tau* han mostrado actividad GPOX en contra de hidroperóxidos de cumeno y de ácidos grasos (Dixon et al., 2009), así como también se ha visto aumentada su expresión en presencia de aldehídos insaturados producto de la peroxidación de lípidos (Fujita y Hossain, 2003). La GST *tau* de mango ‘Ataulfo’ pudiera estar contrarrestando el efecto de un estrés oxidativo en etapas posteriores, ayudando a reducir lípidos oxidados, que pudieran provenir de un estrés térmico, ya que de estar 3 veces más expresada en los primeros días de almacenamiento poscosecha, aumenta a 6 veces en el día 7 (Figura 18).

VI.4 Evaluación del Efecto del Tratamiento Hidrotérmico Sobre la Actividad GST Total Durante el Almacenamiento Poscosecha de Mangos cv. ‘Ataulfo’

Para analizar el efecto del tratamiento hidrotérmico en la actividad GST total a lo largo del almacenamiento poscosecha de mango cv. ‘Ataulfo’, los valores calculados de actividad se sometieron a una prueba de t para dos muestras independientes. La actividad transferasa de las GSTs de mango ‘Ataulfo’ fue medida utilizando GSH y CDNB como sustratos. La actividad enzimática GST aumentó desde el día 5 (primer día a la que pudo ser detectada) hasta el día 9 de almacenamiento poscosecha. En cuanto al efecto del tratamiento hidrotérmico, se observó que éste aumenta de manera significativa la actividad GST total los días 5 y 7 de almacenamiento poscosecha (Figura 19).

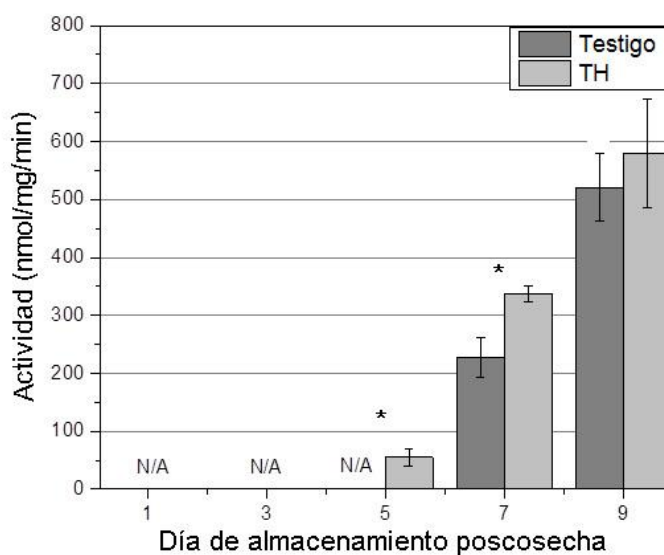


Figura19. Actividad GST total de mangos testigo y sometidos a tratamiento hidrotérmico de la variedad ‘Ataulfo’ durante su almacenamiento poscosecha. Se presenta la media \pm error estándar de tres replicas biológicas medidas por triplicado. N/A: No actividad. Asterisco significa diferencias estadísticas obtenidas por la prueba de t para dos muestras independientes ($P < 0.05$).

Los frutos como el mango, son tejidos con bajo porcentaje de proteína. Es posible que debido a factores como la naturaleza de la muestra, no se haya podido detectar

actividad en todos los días de almacenamiento poscosecha, ya que la cantidad de proteína que se podía extraer era muy pequeña. En los mangos muestreados los días 1, 3 y 5, debido al estado de inmadurez, la pulpa de mango contenía más fibra, lo que influía en el rendimiento de la extracción. Sin embargo, los valores de actividad encontrados concuerdan con valores reportados en cultivos vegetales como zanahoria (153 nmol/min/mgP), calabaza (154 nmol/min/mgP), rábano (229 nmol/min/mgP) y cebolla (648 nmol/min/mgP) (Fujita et al., 2007).

En cuanto al efecto del tratamiento hidrotérmico en la actividad GST de los frutos de los días donde se pudo detectar, es posible descartar el efecto de la madurez en los valores obtenidos, ya que las mediciones fueron en un mismo estado fisiológico (fruto testigo y tratado). Se puede observar que existe diferencia significativa, cuando se comparan frutos tratados contra los testigos, registrando mayores niveles de actividad los frutos sometidos a tratamiento hidrotérmico. Probablemente el aumento de la actividad en mangos sometidos a tratamiento hidrotérmico cause un efecto protector a nivel celular.

El comportamiento de la actividad GST a lo largo del almacenamiento poscosecha, en primera instancia pareciera no concordar con los de expresión génica de las GSTs *phi* y *tau* evaluadas. Sin embargo en estudios con mutantes de *Arabidopsis* con una reducción marcada en los niveles totales de proteínas GST *phi* 6, 7, 9 y 10, las plantas transgénicas no mostraron reducción en la actividad GST, tal como se mide utilizando el sustrato modelo 1-cloro-2,4 dinitrobenzenu (CDNB) (Sappl et al., 2009). Esto puede indicar que a pesar de que la clase *phi* es predominante, ante una deficiencia de ésta otras GST's pueden suplir su función transferasa, probablemente de la clase *tau* (también predominante) pudiera pasar algo similar.

La familia GST presenta gran divergencia funcional entre clases y dentro de ellas (Banerjee y Goswami, 2010; Chi et al., 2011; Dixon et al., 2002b; Jain et al., 2010; Lan et al., 2009; Liu et al., 2013). El presente estudio midió actividad GST total, la cual es aportada por un gran número de GSTs presentes en el mesocarpio de mango. A pesar de que la mayoría de las GSTs cumplen función transferasa, algunas clases muestran otras funciones más específicas (reductasa ó peroxidasa); además dentro de una misma clase, algunas GSTs han exhibido también diferencias funcionales. Si bien las GSTs *phi* y *tau* de mango 'Ataulfo' evaluadas en este trabajo, tienen el

residuo catalítico serina que le permite realizar la actividad transferasa, es probable que estas GSTs también actúen en la protección contra el estrés oxidativo del mango, cuando es sometido a un tratamiento hidrotérmico, realizando su actividad peroxidasa. Es probable que otras GST's *phi* y *tau*, así como GST's de otras clases, puedan estar influyendo en la actividad transferasa total presente, sobre todo en los últimos días del almacenamiento poscosecha.

VII. CONCLUSIÓN

El tratamiento hidrotérmico es una práctica común como tratamiento cuarentenario, que permite la eliminación de patógenos en los frutos de mango, sin embargo se puede ver afectada la fisiología del fruto, desencadenándose una respuesta al estrés resultado de este tratamiento. Una estrategia de defensa ante este estrés, es el aumento en la transcripción y síntesis de proteínas que ayudan a minimizar este efecto, tales como las enzimas de la familia GST. En este trabajo se observó que el tratamiento hidrotérmico estimuló la expresión de las enzimas GST *phi* y *tau* en mango ‘Ataulfo’, donde la GST *phi* fue estimulada mayormente en los frutos el primer día posterior al tratamiento, mientras que la *tau* lo fue mayormente días después. En cuanto al efecto del almacenamiento poscosecha en mangos sin tratar, se observó un comportamiento ascendente en la expresión, para luego decaer progresivamente a partir del día 3, lo cual pudiera ser efecto de la maduración, y los cambios metabólicos y fisiológicos que esta implica.

La actividad GST total fue estimulada de manera significativa por efecto del tratamiento hidrotérmico. El comportamiento de la actividad GST, difiere del de la expresión de las GSTs *phi* y *tau*. Al medir actividad GST total, ésta es proporcionada no solo por las GSTs de clase *phi* y *tau*, si no también por todas las clases GSTs con actividad transferasa presentes en mesocarpio. Sería recomendable poder medir las actividades específicas de las GSTs *phi* y *tau* analizadas en este estudio, y sobre todo evaluar si muestran actividad peroxidasa dependiente de glutatión, como sus homólogas en otras especies, para así poder tener un perfil de actividad más específico. Además, un estudio a nivel génico de las regiones promotoras, ayudaría a elucidar la forma de regulación de la transcripción de estos genes, y corroborar si se encuentran los elementos de respuesta a etileno encontrados en otras GSTs u otros elementos de regulación.

VIII. REFERENCIAS

- 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(3), 403-410.
- Anaya, A.L., Espinosa, G.F. y Cruz, O.R. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*: Plaza y Valdés.
- Ayala, V.M.J., Ayala, G.O.J., Aguilar, R.V.H. y Corona, T.T. (2014). Evolución de la Calidad de Semilla de *Capsicum annum* L. Durante su Desarrollo en el Fruto. *Rev. Fitotec. Mex.*, 37(1), 79 - 87.
- Aza, G.C., Herrera, I.L., Nunez, P.H.G., De la Vega, O.M. y Ochoa, A.N. (2013). Anthocyanin accumulation and expression analysis of biosynthesis-related genes during chili pepper fruit development. *Biologia Plantarum*, 57(1), 49-55.
- Banerjee, S. y Goswami, R. (2010). GST profile expression study in some selected plants: in silico approach. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 336(1-2), 109-126.
- Baraona, C.M. y Sancho, B.E. (2000). *Fruticultura General (fruticultura I)*: Euned.
- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R. y Schieber, A. (2005a). Screening of Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars for Their Contents of Flavonol O- and Xanthone C-Glycosides, Anthocyanins, and Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1563-1570.
- Berardini, N., Schieber, A., Klaiber, I., Beifuss, U., Carle, R. y Conrad, J. (2005b). 7-O-Methylcyanidin 3-O- β -D-Galactopyranoside, a Novel Anthocyanin from Mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') Peels. *Z. Naturforsch.*, 60b, 801 – 804.
- Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E. y Di Gaspero, G. (2007). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell and Environment*, 30(11), 1381-1399.
- Chen, J.-H., Jiang, H.-W., Hsieh, E.-J., Chen, H.-Y., Chien, C.-T., Hsieh, H.-L. y Lin, T.-P. (2012). Drought and Salt Stress Tolerance of an Arabidopsis Glutathione S-Transferase U17 Knockout Mutant Are Attributed to the Combined Effect of Glutathione and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 158(1), 340-351.
- Chi, Y., Cheng, Y., Vanitha, J., Kumar, N., Ramamoorthy, R., Ramachandran, S. y Jiang, S.-Y. (2011). Expansion Mechanisms and Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Family in Sorghum and Other Higher Plants. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 18(1), 1-16.
- Conn, S., Curtin, C., Bezier, A., Franco, C. y Zhang, W. (2008). Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, 59(13), 3621-3634.

- Csiszár, J., Horváth, E., Váry, Z., Gallé, Á., Bela, K., Brunner, S. y Tari, I. (2014). Glutathione transferase supergene family in tomato: Salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78, 15-26.
- Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C.A., Pacheco-Sanchez, M.A., Casas-Flores, S., Sanchez-Flores, A., Kuhn, D.N. y Islas-Osuna, M.A. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp de novo transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Deepa, K., Sheeja, T.E., Santhi, R., Sasikumar, B., Cyriac, A., Deepesh, P.V. y Prasath, D. (2014). A simple and efficient protocol for isolation of high quality functional RNA from different tissues of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(2), 263-271.
- Dey, P.M. y Harborne, J.B. (1997). *Plant Biochemistry*: Elsevier Science.
- Dixon, D., Davis, B. y Edwards, R. (2002a). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 30859 - 30869.
- Dixon, D., Laphorn, A. y Edwards, R. (2002b). Plant glutathione transferases. *Genome Biol*, 3, reviews3004-reviews3004.3010.
- Dixon, D.P. y Edwards, R. (2010). Glutathione Transferases. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8, e0131.
- Dixon, D.P., Edwards, R. y Steel, P.G. (2011). Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling. *Plant signaling & behavior*, 6:8(8), 1-5.
- Dixon, D.P., Hawkins, T., Hussey, P.J. y Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1207-1218.
- Dixon, D.P., Skipsey, M. y Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71(4), 338-350.
- Djioua, T., Charles, F., Lopez-Lauri, F., Filgueiras, H., Coudret, A., Jr, M.F., Ducamp-Collin, M.-N. y Sallanon, H. (2009). Improving the storage of minimally processed mangoes (*Mangifera indica* L.) by hot water treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 221-226.
- Empaque de Mangos del C.I.P. (2009). Identificación de las necesidades logísticas para la comercialización del sistema producto Mango en la Región Noroeste.
- Esmacili, A. y Zaker, S.R. (2011). Differential expression of glycine receptor subunit messenger RNA in the rat following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 49(2), 280-284.
- FAOSTAT. (2008). fao Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Consultado en <http://faostat.fao.org>.
- Fujita, M. y Hossain, M. (2003). Modulation of Pumpkin Glutathione S-Transferases by Aldehydes and Related Compounds. 5. 44
- Fujita, M., Rohman, M.M. y Hossain, M.D. (2007). Comparative Investigation of Glutathione S-Transferases, Glyoxalase-I and Alliinase Activities in Different Vegetable Crops. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 10(1), 21-28.
- Gasic, K., Hernandez, A. y Korban, S. (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4), 437-438.

- Gehrig, H.H., Winter, K., Cushman, J., Borland, A. y Taybi, T. (2000). An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18(4), 369-376.
- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N. y Ageorges, A. (2011). In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *The Plant Journal*, 67(6), 960-970.
- Gómez, M.L.P.A. y Lajolo, F.M. (2008). Ascorbic acid metabolism in fruits: activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 756-762.
- Gong, H., Jiao, Y., Hu, W.-w. y Pua, E.-C. (2005). Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro. *Plant Molecular Biology*, 57(1), 53-66.
- Goodman, C.D., Casati, P. y Walbot, V. (2004). A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell*, 16(7), 1812-1826.
- Gronwald, J.W. y Plaisance, K.L. (1998). Isolation and Characterization of GlutathioneS-Transferase Isozymes from Sorghum. *Plant Physiology*, 117(3), 877-892.
- Infante, F., J. Quilantán., F. Rocha., H. Esquinca, A. Castillo, G. Ibarra Núñez y Palacio., V. (2011). Mango Ataulfo: Orgullo chiapaneco. CONABIO. *Biodiversitas*(96), 1-5.
- Itzhaki, H., Maxson, J.M. y Woodson, W.R. (1994). An Ethylene-Responsive Enhancer Element is Involved in the Senescence-Related Expression of the Carnation Glutathione-S-Transferase (GST1) Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8925-8929.
- Itzhaki, H. y Woodson, W. (1993). Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-transferase gene cluster in carnation. *Plant Molecular Biology*, 22(1), 43-58.
- Jacobi, K.K., MacRae, E.A. y Hetherington, S.E. (2001). Postharvest heat disinfestation treatments of mango fruit. *Scientia Horticulturae*, 89(3), 171-193.
- Jain, M., Ghanashyam, C. y Bhattacharjee, A. (2010). Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics*, 11(1), 73.
- Kanyarat, L., Jamnong, U., Kobkiat, S. y Osamu, A. (2010). The Effects of Sugar Application on the Concentrations of Anthocyanin and Flavonol of 'Mahajanaka' Mango (*Mangifera indica* Linn. cv. Mahajanaka) Fruit. *Chiang Mai J. Sci.*, 37(2), 355-362
- Ketsa, S., Chidtragool, S., Klein, J.D. y Lurie, S. (1999). Ethylene synthesis in mango fruit following heat treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 15(1), 65-72.
- Kiefer, E., Heller, W. y Ernst, D. (2000). A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18(1), 33-39.
- Kim, Y., Brecht, J.K. y Talcott, S.T. (2007). Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica* L.) following hot water

- immersion and controlled atmosphere storage. *Food Chemistry*, 105(4), 1327-1334.
- Kitamura, S., Akita, Y., Ishizaka, H., Narumi, I. y Tanaka, A. (2012). Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in cyclamen. *Journal of Plant Physiology*, 169(6), 636-642.
- Kobkiat, S., Kanyarat, L. y U., J. (2011). Sunlight-stimulated phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and anthocyanin accumulation in exocarp of 'Mahajanaka' mango. *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 5(3), 365-373.
- Kumar, S., Asif, M.H., Chakrabarty, D., Tripathi, R.D., Dubey, R.S. y Trivedi, P.K. (2012). Differential Expression of Rice Lambda Class GST Gene Family Members During Plant Growth, Development, and in Response to Stress Conditions. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(3), 569-580.
- Lan, T., Yang, Z.-L., Yang, X., Liu, Y.-J., Wang, X.-R. y Zeng, Q.-Y. (2009). Extensive Functional Diversification of the Populus Glutathione S-Transferase Supergene Family. *The Plant Cell*, 21(12), 3749-3766.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, T. y Higgins, D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Le Martret, B., Poage, M., Shiel, K., Nugent, G.D. y Dix, P.J. (2011). Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 661-673.
- Litz, R.E. (2009). *The Mango: Botany, Production and Uses*: CABI.
- Liu, Y.J., Han, X.M., Ren, L.L., Yang, H.L. y Zeng, Q.Y. (2013). Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant Physiology*, 161(2), 773-786.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14(3), 257-269.
- Lurie, S. y Pedreschi, R. (2014). Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research*, 1.
- Maciel, L.F., Oliveira, C.D., Bispo, E.D. y Miranda, M.D.S. (2011). Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from biodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. *British Food Journal*, 113(8-9), 1103-1113.
- Manthey, A.J. y Perkins-Veazie, P. (2009). Levels of β-Carotene, Ascorbic Acid, and Total Phenols in the Pulp of Five Commercial Varieties of Mango (*Mangifera indica* L.). *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 122, 303-307.
- Maxson, J.M. y Woodson, W.R. (1996). Cloning of a DNA-binding protein that interacts with the ethylene-responsive enhancer element of the carnation GST1 gene. *Plant Molecular Biology*, 31(4), 751-759.
- Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., Gonzalez, M., Orellana, A., Retamales, J. y Silva, H. (2005). A Rapid and Efficient Method for Purifying High Quality Total RNA from Peaches

- (*Prunus persica*) for Functional Genomics Analyses. *Biological Research*, 38, 83-88.
- Mitcham, E.J. y McDonald, R.E. (1993). Respiration rate, internal atmosphere, and ethanol and acetaldehyde accumulation in heat-treated mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 3(1), 77-86.
- Mohsenzadeh, S., Esmaeili, M., Moosavi, F., Shahrtash, M., Saffari, B. y Mohabatkar, H. (2011). Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8160-8165.
- Mohsenzadeh, S., Saffari, B. y Mohabatkar, H. (2009). A New Member of tau-Class Glutathione S-Transferase From Barley Leaves. *EXCLI Journal*, 8.
- Mueller, L.A., Goodman, C.D., Silady, R.A. y Walbot, V. (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology*, 123(4), 1561-1570.
- Nolan, T., Hands, R.E. y Bustin, S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protocols*, 1(3), 1559-1582.
- Ortiz, X., Acevedo, X. y Martinez, H. (2002). *Características Y Estructura de los Frutales de Exportación en Colombia: Iica*.
- Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R., Namiesnik, J., Gorinstein, S. y González-Aguilar, G. (2012a). Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in ‘Ataulfo’ Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. *Molecules*, 17(11), 12657-12664.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E., Islas-Osuna, M.A., Gutierrez-Martinez, P., Robles-Sánchez, M. y González-Aguilar, G.A. (2012b). Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, 135(0), 7-13.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E.M. y González-Aguilar, G.A. (2012c). Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS–ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry*, 135(1), 105-111.
- Paull, R.E. y Jung, C.N. (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 21(1), 21-37.
- Rienth, M., Torregrosa, L., Ardisson, M., De Marchi, R. y Romieu, C. (2014). Versatile and efficient RNA extraction protocol for grapevine berry tissue, suited for next generation RNA sequencing. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(2), 247-254.
- Russell, S., Meadows, L.A. y Russell, R.R. (2008). *Microarray Technology in Practice*: Acaemic press, Elsevier.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sappl, P.G., Carroll, A.J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A. y Singh, K.B. (2009). The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal*, 58(1), 53-68.
- Sappl, P.G., Onate-Sanchez, L., Singh, K.B. y Millar, A.H. (2004). Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Molecular Biology*, 54, 205 - 219.

- Sergent, E. (1999). *El cultivo del mango ("Mangifera indica" L.): botánica, manejo y comercialización*: Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Shi, H.-Y., Li, Z.-H., Zhang, Y.-X., Chen, L., Xiang, D.-Y. y Zhang, Y.-F. (2014). Two Pear Glutathione S-Transferases Genes Are Regulated during Fruit Development and Involved in Response to Salicylic Acid, Auxin, and Glucose Signaling. *PLoS ONE*, 9(2), e89926.
- SIAP-SAGARPA. (2014). Panorama de Mango. Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y pesquero
- Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S. y Goldsbrough, P.B. (2003). Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *The Plant Journal*, 36(4), 433-442.
- Sulaiman, S.F. y Ooi, K.L. (2012). *Polyphenolics, Vitamin C, and Antioxidant Activities of Aqueous Extracts from Mature-Green and Ripe Fruit Fleshes of Mangifera sp.*
- Sultana, B., Hussain, Z., Asif, M. y Munir, A. (2012). Investigation on the Antioxidant Activity of Leaves, Peels, Stems Bark, and Kernel of Mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Food Science*, 77(8), C849-C852.
- Sun, Y., Li, H. y Huang, J.-R. (2012). Arabidopsis TT19 Functions as a Carrier to Transport Anthocyanin from the Cytosol to Tonoplasts. *Molecular Plant*, 5(2), 387-400.
- 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.
- Ulmasov, T., Ohmiya, A., Hagen, G. y Guilfoyle, T. (1995). The Soybean GH2/4 Gene That Encodes a Glutathione S-Transferase Has a Promoter That Is Activated by a Wide Range of Chemical Agents. *Plant Physiology*, 108(3), 919-927.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. y Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.
- Walkera, B.M., Roya, M.L., Colemana, E., Voelkera, R. y Barkana, A. (1998). The Maize tha4 Gene Functions in Sec-Independent Protein Transport in Chloroplasts and Is Related to hcf106, tatA, and tatB. *JCB*, 147(2), 267-276.
- Wang, Z., Huang, S., Jia, C., Liu, J., Zhang, J., Xu, B. y Jin, Z. (2013). Molecular cloning and expression of five glutathione S-transferase (GST) genes from Banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). *Plant Cell Reports*, 32(9), 1373-1380.
- Zhang, S., Xiang, J., Cheng, A., Wang, M., Wu, Y., Yang, X., Zhu, D., Jia, R., Luo, Q., Chen, Z. y Chen, X. (2011). Characterization of duck enteritis virus UL53 gene and glycoprotein K. *Virology Journal*, 8(1), 235.
- Zhao, J. y Dixon, R.A. (2009). The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, 15(2), 72-80.
- Zhikun, L., Xingfen, W., Jun, M., Guiyin, Z. y Zhiying, M. (2008). Cloning and characterization of a tau glutathione S-transferase subunit encoding gene in *Gossypium hirsutum*. *Genes & Genetic Systems*, 83, 219-225.
- Zhou, J. y Goldsbrough, P. (1993). An Arabidopsis gene with homology to glutathione S-transferases is regulated by ethylene. *Plant Molecular Biology*, 22(3), 517-523.