

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MADS Y HB-1, Y DE LOS
GENES *ACS* Y *ACO* DURANTE LA MADURACIÓN POST-COSECHA DE MANGO

(*Mangifera indica* L.) CV. ATAULFO



TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JOSÉ ANGEL ORTEGA BORCHARDT

HERMOSILLO, SONORA

ABRIL DEL 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



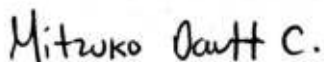
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



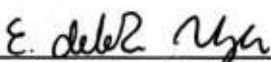
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la tesis de José Angel Ortega Borchardt la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el título de Licenciado en Biología con opción en Biotecnología.



Dra. Mitzuko Dautt Castro
Directora de Tesis



Dr. Enrique De La Re Vega
Secretario



Dra. Gloria Irma Ayala Astorga
Sinodal



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Suplente

DECLARACIÓN

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto CB2012-01-178296 “Estudios moleculares de la maduración del mango Ataulfo (*Mangifera indica* L.): uso de la transcriptómica para identificar los genes responsables de la pérdida de firmeza”, otorgado a la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna.

DEDICATORIA

A mis padres, que son las personas que más quiero y más importantes en mi vida, porque me han acompañado a través de alegrías, tristezas, enojos, frustraciones y que sé que siempre estarán para mí en todo lo que me espera en un futuro. Ustedes son la base de mis conocimientos, valores y aspiraciones. Todos mis éxitos se los dedico a ustedes con todo mi cariño.

A mi hermano mayor, también siendo de las personas más importantes en mi vida, que es mi mejor amigo y cómplice en la vida, que siempre ha visto por mi bienestar y siempre tiene una reflexión para hacerme una mejor persona.

A mi familia en general, por haber estado al pendiente de mis logros, tanto personales como profesionales.

Dedico esta tesis a cada uno de los pasos que di para poder desenvolverme profesionalmente y personalmente, que a pesar de todos los tropiezos, siempre tuve el apoyo de las personas que me rodean para poder levantarme y seguir adelante para llegar a la persona que soy hoy.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por darme asilo cuatro años de mi vida, los cuales han sido de los mejores y donde aprendí a sostenerme con mi conocimiento.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por abrirme las puertas y darme los medios necesarios para concretar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico para poder finalizar este trabajo.

A la Dra. Mitzuko Dautt, por brindarme siempre su apoyo, por guiarme de una manera tan profesional y desinteresada que sólo ella podría hacer, por tenerme paciencia en mis errores, por siempre estar al pendiente de cómo y por qué hacía las cosas, por el tiempo que me brindó, por mejorar mis sentidos en el campo científico y ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Enrique De La Re, por su interés en ver concretada mi tesis y siempre tener un espacio de su tiempo disponible para mí y mis dudas, por las sonrisas compartidas y su confianza.

A la Dra. Gloria Ayala, por darme un giro de perspectiva en los estudios de mi tesis de investigación y por su apoyo oportuno para mejorar mi redacción científica.

A la Dra. María Islas, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su interés en mi vida personal y profesional, por explicarme mis dudas, por ser tan linda y comprensiva, por apoyarme y enseñarme a lo largo de estos años que tengo de conocerla.

A la Dra. “mi Tía” Carmen Contreras, por darme de su apoyo dentro y fuera del laboratorio, por siempre darme un espacio para resolverme dudas y siempre tenerme paciencia para ello, por su confianza y por todas las risas que hemos compartido.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, Lucía Angulo, Deyanira Fimbres, Chema Anaya, Eliezer Sánchez y David Moreno por su compañerismo y amistad, por siempre estar al pendiente y apoyarme de la manera que sea para que siga adelante.

A la Dra. Magda Pacheco, por su disponibilidad y ayuda a la desenvoltura de mi conocimiento en las técnicas de la biología molecular.

A Leonardo Fox y a Ignacio Chavira, por su compañerismo y ser mis tutores en la introducción de la biología molecular cuando llegué por primera vez al CIAD.

A Cristóbal González, por su amistad e interés en mi progreso en la investigación de mi tesis.

A Eduardo Hernández, por su interés en mi progreso profesional y ocurrencias que siempre me trajeron una sonrisa al rostro.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biología Molecular de Plantas, especialmente al M.C. Ángel Javier “Tocayo” Ojeda y al M.C. Rigel Fernández por su disponibilidad de tiempo, de equipo de laboratorio y amistad.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, especialmente al M.C Emmanuel Aispuro, por disponibilidad de equipo y compartir siempre una sonrisa conmigo.

A mis compañeros de la carrera que, sin poder nombrar a todos, han aportado algo nuevo a mi vida que aprecio de todo corazón.

A mis compañeros de la especialidad en Biotecnología, que gracias a ustedes no paré de sorprenderme lo interesantes que se volvieron las clases del último año de la carrera y de reírme de las ocurrencias que siempre salían al aire.

A mis amigos del “bio-squad”, Luis Tellechea, Jorge Jiménez, Diego Félix y Tadeo De La Cruz, por la amistad, atención, confianza y entre muchas otras cosas que los hicieron de los amigos más queridos que he tenido en mi vida.

A mis amigos de la carrera, Tania Burgos, Reneé Mange, Teresa Ibarra, Cynthia Machado, Jannel Vega, Teresita González y Elizabeth Poom, por acompañarme y apoyarme siempre. Gracias por escuchar, por tenerme presente y por estar ahí.

A mis amigos de la preparatoria, y en especial a Daniel Cortez, César Leyva, Luis René López, Luis Carlos Solís, Francisco Duarte y Bernardo Estrella, por escucharme, por ser siempre parte de mi vida y darme una alegría muy grande cada vez que los tengo presentes.

A Stephanie Aguilar, que siempre conté con su apoyo en cualquiera de los ámbitos de mi vida. Por compartir conmigo su gusto por la biología y proveerme de sus palabras que me alentaron a ser cada día una mejor persona.

A Alma Fimbres, por ser una amiga y consejera que siempre me ha apoyado y escuchado a lo largo de los años, tanto en cuestiones personales y profesionales.

A Gabriela Casanova, por compartir conmigo parte de su tiempo, su perspectiva de la vida y su amistad. Gracias por haber estado siempre ahí y por estar hoy.

A los miembros de Borchardt, Daniel Márquez, Daniel Galindo e Isaac Elizalde, por la amistad, enseñanzas y sonrisas, también a Saúl Durazo por haber sido parte de nuestra aventura.

A la Biología, que es la ciencia que se aboca al estudio de los seres vivos, y provocar en mí ese interés y valor a todos los procesos bióticos y abióticos que ocurren en nuestro entorno.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	5
II.1 El Mango, “El Rey de los Frutos”	5
II.2 La Maduración de los Frutos y su Importancia	6
II.2.1 Frutos climatéricos y no-climatéricos	7
II.3 Regulación Transcripcional Durante la Maduración	8
II.4 MADS-RIN y HB-1: Su Importancia en la Maduración de los Frutos y su Relación con los Genes <i>ACS</i> y <i>ACO</i> Durante la Maduración	12
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	16
V.1 Objetivo General	16
V.2 Objetivos Específicos	16
VI. METODOLOGÍA	17
VI.1 Análisis Bioinformáticos de Secuencias	17
VI.2 Evaluación de Rangos Dinámicos y Validación de GAPDH	17
VI.3 Evaluación y Análisis de la Expresión Génica del Factor de Transcripción MADS y HB-1, y de los Genes <i>ACS</i> y <i>ACO</i> por PCR Cuantitativa	18
VI.4 Análisis de los Datos	19
VII. RESULTADOS	20
VII.1 Datos Obtenidos de los Análisis de BLAST	20
VII.2 Alineamiento y Localización de los Dominios Funcionales en las Secuencias Aminoacídicas de MADS, HB, ACS y ACO de Mango	22
VII.2.1 Localización de los dominios funcionales en los miembros de la familia de factores de transcripción MADS y HB en mango	22
VII.2.2 Localización de los dominios funcionales en los miembros de la familia de enzimas ACS y ACO en mango	24
VII.3 Prueba de Eficiencia y Validación de Iniciadores	25
VII.4 Evaluación de Rangos Dinámicos y Validación de GAPDH	25
VII.5 Evaluación de Expresión de los Genes que Codifican para los Factores de Transcripción MiMADS1 y MiHB-1, y para los Genes <i>MiACS5</i> y <i>MiACO12</i>	29

VII.5.1 Patrón de expresión génica del gen que codifica el factor de transcripción MiMADS1 y la enzima MiACS5 en frutos de mango cv. Ataulfo	29
VII.5.2 Patrón de expresión génica del gen que codifica el factor de transcripción MiHB-1 y la enzima MiACO12 en frutos de mango cv. Ataulfo	30
VIII. DISCUSIÓN	32
VIII.1 Localización de los Dominios Funcionales en las Secuencias Aminoacídicas de MADS, HB, ACS y ACO en Mango	32
VIII.2 Expresión de MiMADS1 y de MiACS5 en Frutos de Mango cv. Ataulfo	33
VIII.3 Expresión de MiHB-1 y de MiACO14 en Frutos de Mango cv. Ataulfo	34
IX. CONCLUSIONES	36
X. RECOMENDACIONES	37
XI. LITERATURA CITADA	38

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de MADS del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.	20
Tabla II	Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de HB del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.	21
Tabla III	Comparación de la secuencia aminoacídica deducida de ACS del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.	21
Tabla IV	Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de ACO del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.	21
Tabla V	Rangos dinámicos y validación de los genes de interés para las PCR cuantitativas.	26

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Frutos de mango.	5
Figura 2	El dogma central de la biología molecular. Modificado de Tropp (2012).	8
Figura 3	Respresentación esquemática de la función del factor de transcripción. Modificado de Latchman (2008).	9
Figura 4	Representación esquemática de los dominios de las proteínas MADS en plantas. Modificado de Álvarez-Buylla et al. (2000).	11
Figura 5	Representación esquemática de los factores de transcripción que influyen en la maduración mediada por etileno del fruto en tomate. Modificado de Karlova et al. (2014) y Cherian et al. (2014).	13
Figura 6	Diluciones para pruebas de rangos dinámicos para las PCRs cuantitativas.	18
Figura 7	Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas MADS deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.	23
Figura 8	Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas HB deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.	23
Figura 9	Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas ACS deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.	24
Figura 10	Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas ACO deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.	25
Figura 11	Gráfica de rango dinámico para <i>MADS</i> para evaluar la eficiencia del par de oligonucleótidos diseñados (A). Gráficas de validación para GAPDH con respecto a los genes de interés <i>MADS</i> (B).	27
Figura 12	Gráfica de rango dinámico para <i>HB-1</i> para evaluar la eficiencia del par de oligonucleótidos diseñados (A). Gráficas de validación para GAPDH con respecto al gen de interés <i>HB-1</i> (B).	28

Figura 13	Gráfica de rango dinámico para <i>ACS</i> para evaluar la eficiencia del par de oligonucleótidos diseñados (C.1). Gráficas de validación para GAPDH con respecto al gen de interés <i>ACS</i> (C.2).	28
Figura 14	Expresión génica de <i>MiMADS1</i> durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).	29
Figura 15	Expresión génica de <i>MiACS5</i> durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).	30
Figura 16	Expresión génica de <i>MiHB-1</i> durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).	31
Figura 17	Expresión génica de <i>MiACO12</i> durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).	31

RESUMEN

El mango Ataulfo es un cultivar de origen mexicano con gran aceptación en los mercados internacionales, por sus características atractivas y nutricionales. El proceso de maduración de este fruto ha sido y continúa siendo estudiado tanto a nivel fisiológico, bioquímico y genético. El mango es un fruto climatérico que tiene una maduración rápida y corta vida de anaquel por lo que se investiga cómo mantener su calidad por más tiempo. Las enzimas de la síntesis del etileno, son la 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa (ACS) y la 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa (ACO). En plantas y frutos se han identificado varios miembros de los genes que codifican para ACS y ACO. Además, a nivel molecular se conocen algunos genes involucrados en la regulación de la maduración de frutos, entre ellos, los factores de transcripción que regulan la expresión de genes blanco. Dos de las familias de factores de transcripción más importantes en la regulación de la maduración son las proteínas MADS y HB. Recientemente, se obtuvo el transcriptoma del mango Ataulfo en el cual se identificaron secuencias que codifican para proteínas MADS, HB-1, ACS y ACO. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los factores de transcripción *MADS* y *HB-1*, y de los genes *ACS* y *ACO* durante la maduración post-cosecha del mango. El patrón de expresión de *MiMADS1* y *MiACS5* se mantuvo constantes hasta el día 5 post-cosecha, siendo este el día de mayor expresión para ambos, sugiriendo una posible interacción. En el caso del patrón de expresión para *MiHB-1* y *MiACO12*, se muestra un nivel de expresión mayor en el día 3 post-cosecha, sugiriendo también una posible interacción. Estos análisis proveen información valiosa acerca de la regulación de la maduración de frutos de mango, la cual puede ser utilizada en un futuro para mejorar su vida de anaquel.

I. INTRODUCCIÓN

El proceso de maduración de los frutos es de gran importancia por lo que ha sido extensivamente estudiado a nivel fisiológico, bioquímico y genético. La maduración es un proceso complejo el cual culmina en cambios en el color, textura, sabor, aroma del fruto, entre otros. Uno de los factores que limitan el valor económico de algunos frutos es la corta vida de anaquel, asociado a su corto período de maduración. La maduración acelerada en los frutos puede llevar a un ablandamiento excesivo el cual resulta en su deterioro durante el transporte y manejo. Un aumento en la vida de anaquel, además de ayudar a reducir las grandes pérdidas post-cosechas, incrementaría la calidad de los frutos en términos de la frescura, lo cual es favorable para el consumidor (Payasi y Sanwal, 2008).

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto clasificado como climatérico, que madura rápidamente una vez que ha sido cortado del árbol (post-cosecha) en su etapa de madurez fisiológica (Ellong et al., 2015). Su popularidad ha llegado a ser muy importante para el mercado internacional debido a su buen sabor, aroma, color atractivo y por sus propiedades nutrimentales (Sivakumar et al., 2010). Los frutos climatéricos son caracterizados por un incremento en su respiración celular y en la producción de etileno. El etileno, conocido también como la hormona de maduración, es esencial para la maduración de este tipo de frutos (Klee y Giovannoni, 2011).

El etileno es muy importante pues regula algunos procesos de desarrollo y de la maduración de los frutos. La biosíntesis del etileno involucra la acción de dos enzimas claves, el precursor es la *S*-adenosil metionina (SAM) que es convertida en 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) por la ACC sintasa (ACS). El ACC es posteriormente convertido a etileno por la ACC oxidasa (ACO) (Klee y Giovannoni, 2011). Este proceso de biosíntesis del etileno, así como muchos otros eventos de maduración de los frutos, van acompañados de una regulación a nivel molecular mediada por mecanismos transcripcionales.

En este contexto, los factores de transcripción son proteínas que se unen a los promotores de los genes y regulan la expresión génica a nivel transcripcional. Estas proteínas son responsables de que se lleve a cabo la transcripción de genes mediada por la ARN polimerasa celular (Kadonaga, 2004).

Se conocen varios factores de transcripción que están involucrados en los procesos de cascada de la maduración, entre los cuales se encuentran los genes *CNR* (colorless non-ripening, por sus siglas en inglés) (Manning et al., 2006), el producto de un gen que es la mutación *nor* (non-ripening) (Karlova et al., 2014) y el gen *RIN* (ripening inhibitor) de la familia de proteínas MADS (nombre proveniente del acrónimo de cuatro proteínas de este tipo). Las proteínas MADS son factores de transcripción que están presentes en muchos organismos como levaduras, algunos invertebrados, insectos y mamíferos, y tienen como función la regulación de procesos en el desarrollo o diferenciación celular. En las plantas está relacionado fundamentalmente con la inducción floral, la organogénesis y la maduración en los frutos (Pacheco-Sánchez, 2015).

Específicamente, se sabe que el factor de transcripción MADS-RIN codifica como un componente regulador necesario para desencadenar la respiración climatérica y la biosíntesis del etileno relacionada con la maduración (Vrebalov et al., 2002). Además, en frutos de tomate se ha visto que MADS-RIN regula directamente genes de pared celular asociados a la maduración como a las poligalacturonasas (*PG*), beta-galactosidasa 4 (*BGAL4*), alfa-galactosidasas (*AGAL*) y expansinas (*Exp1*), las cuales están asociadas al ablandamiento del fruto y a genes relacionados con la síntesis de carotenoides asociados al desarrollo del color (Martel et al., 2011; Fujisawa et al., 2011). Además, se ha demostrado que son muy importantes para que se lleve a cabo una gran variedad de procesos de desarrollo de la planta, entre ellos incluyendo el crecimiento vegetativo, control del tiempo de florecimiento y maduración de los frutos (Martel et al., 2011).

Los factores MADS también mantienen una relación muy estrecha en la regulación de genes de la biosíntesis del etileno. Particularmente se ha visto que en tomate (*Solanum lycopersicum*), un *MADS* tipo AGAMOUS-LIKE1 (*TAGL1*) y MADS-RIN regulan a un gen que codifica para *ACS2* y posiblemente a *ACS4*; mientras que otro factor de transcripción llamado *HB-1* (homeobox protein) regula a *ACO1* (Itkin et al., 2009). Por su parte, en frutos de manzana se ha visto que al igual que MADS-RIN, *MADS9* actúa como activador transcripcional de *ACS1* (Ireland et al., 2013).

El cómo la transcripción de la ruta de la biosíntesis del etileno es regulado es un punto de estudio crítico para nuestro entendimiento de procesos como la maduración, senescencia, abscisión y la respuesta al estrés. En el estudio de los procesos de desarrollo de la planta, se encuentra el factor de transcripción HB-1, una proteína con un dominio de zipper de leucinas clase 1 muy conservado. Este factor de transcripción está involucrado en diversas funciones biológicas, incluyendo procesos del desarrollo en el meristemo apical y de respuesta a la luz, estrés por agua, entre otros (Cherian et al., 2014). En un estudio por Lin et al. (2008), se demostró que el factor de transcripción LeHB-1 de tomate está involucrado en la regulación de la organogénesis floral, desarrollo de los carpelos y la maduración. También se evaluó un control de este factor de transcripción y *LeACO1* en tomate.

Para el caso de frutos de mango, se ha evaluado la expresión génica del factor de transcripción *MiMADS1* desde amarre del fruto hasta su etapa de madurez fisiológica, demostrando que está presente y que tiene un rol importante durante la ontogenia del fruto (Pacheco-Sánchez, 2015). Sin embargo, la información que existe sobre el papel de estos factores de transcripción MADS, así como de los HB-1 en la regulación de las enzimas ACS y ACO de la síntesis del etileno durante la maduración del fruto es prácticamente nula.

Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación se centra en evaluar la expresión génica del factor de transcripción *MADS* que presente mayor homología con MADS-RIN de tomate, así como *HB-1* y los genes *ACS* y *ACO* en frutos de mango durante su maduración post-cosecha para así profundizar el conocimiento del papel de éstos en la regulación de la maduración del mango cv. Ataulfo.

II. ANTECEDENTES

II.1 El Mango, “El Rey de los Frutos”

El mango (*Mangifera indica* L.) es muy conocido por su exótico sabor y normalmente referido como el rey de los frutos (Figura 1). Es un fruto popular y económicamente importante, muy cultivado en los trópicos y en los subtropicos (Sivakumar et al., 2010). La producción comercial de mango se ha reportado en más de 87 países, siendo los principales productores India, China, Tailandia, Indonesia, Filipinas, Pakistán y México. Siendo los países de México (41% del mercado mundial), Filipinas (7.6%) y Pakistán (7.8%) los principales exportadores (Sauco, 2009).



Figura 1. Frutos de mango.

El mango cv. Ataulfo es originario de México y se está convirtiendo en una de las variedades más importantes en el mercado internacional. Sus características nutrimentales son muy importantes, ya que son ricos en polifenoles, carotenoides totales y en vitamina C (Ellong et al., 2015). Sin embargo, una de sus limitaciones es la inconsistencia en la madurez del fruto, que limita los tiempos de transporte, lo cual ha causado desconformidades entre los productores. Los frutos de mango tienen una corta vida de anaquel, esto puede provocar un alto costo el cual puede llegar a provocar que sea inaccesible para muchos consumidores (Sivakumar et al., 2010).

La susceptibilidad de enfermedades, la sensibilidad a almacenaje a bajas temperaturas (debajo de los 13° C) y ser un fruto perecedero es debido a su maduración y ablandamiento rápido durante el almacenamiento, manejo y transporte. La maduración del mango puede ser provocada naturalmente o artificialmente, y esta etapa es muy importante ya que es la previa al consumo de este fruto o a su procesamiento. Generalmente, la madurez natural de estos frutos es un proceso que lleva entre 10 y 15 días hasta su senescencia (Ellong et al., 2015).

II.2 La Maduración de los Frutos y su Importancia

La maduración es uno de los procesos más importantes en la vida de los frutos, ya que es en esta etapa donde se alcanzan las características organolépticas adecuadas para su consumo, como los cambios en el color, la textura, el sabor y el aroma del fruto. Gracias a la importancia económica que posee, el proceso de maduración ha sido y continúa siendo ampliamente estudiado tanto a niveles fisiológicos, bioquímicos y genéticos (Payasi y Sanwal, 2008). Tanto los frutos secos como los frutos frescos tienen etapas de desarrollo muy similares, incluyendo el proceso de transformación de ovario a fruto, crecimiento y maduración del fruto.

La transformación de ovario a fruto presenta la primera etapa de su desarrollo, justo después de su fertilización. Esta etapa es seguida por una fase de división celular activa y una posterior expansión celular; ambas llegan a contribuir a la fase del crecimiento del fruto. La etapa del crecimiento provoca que el fruto obtenga su máximo tamaño. Posteriormente procede la etapa donde los frutos obtienen la competencia de prerequisite para poder entrar a una etapa muy importante: la maduración. Como se había mencionado antes, esta etapa resulta en la conversión de un fruto menos inmaduro a uno altamente apetitoso, ricamente nutritivo y con un color más atractivo (Kumar et al., 2014).

Los frutos son parte importante del desempeño de la dispersión de la semilla y pueden ser definidos casi exclusivamente como carpelos maduros. Una definición más precisa abarca los tejidos que son extracarpelarios y que son incluidos en el estado de la maduración del fruto (Giovannoni, 2001). Anteriormente, muchos frutos al llegar a su senescencia, liberaban las

semillas en una proximidad cercana a ella. Por ello, muchas especies de plantas han evolucionado para crear un mayor atractivo de los frutos, siendo estas consumidas por animales y así ser dispersadas a una mayor distancia, produciendo una reducción en la competencia de plantas emparentadas (Klee y Giovannoni, 2011; Ruxton et al., 2012).

II.2.1 Frutos climatéricos y no-climatéricos

Los frutos se clasifican en dos grupos dependiendo el tipo de maduración que presenten: los frutos climatéricos y los no-climatéricos. Esta clasificación se ha utilizado para poder distinguir a los frutos en base a su respiración celular y a la producción de etileno (Giovannoni, 2001). Los frutos climatéricos usualmente incrementan la biosíntesis de etileno, la cual es requerida para las frutas tales como tomates, plátanos, manzanas, peras, mango, entre otras. Los frutos no-climatéricos, incluyendo las fresas, uvas y frutas cítricas, no requieren de respiración climatérica o de una producción alta de etileno para su maduración.

La investigación acerca de la maduración de frutos se ha centrado primordialmente en la relación que mantiene con el etileno. En la actualidad son escasos los reportes que existen sobre el control antes de la inducción del etileno, así como de los mecanismos reguladores que se comparten entre las especies de frutos climatéricos y no-climatéricos (Vrebalov, 2002). El mango es un fruto climatérico en el cual el aumento de producción de etileno precede al pico climatérico (Bouyazen, 2010). Este pico en la respiración (pico climatérico) es el que condiciona la presencia de oxígeno como indispensable para que se produzca la maduración (Payasi y Sanwal, 2008). Los frutos que lo presentan por lo general se cosechan en la etapa que se conoce como madurez fisiológica.

Aun cuando se conoce que los cambios fisiológicos y químicos asociados con la maduración de frutos climatéricos pueden llegar a variar entre las especies, algunos cambios son característicos de muchas de ellas. Estos incluyen la modificación de la estructura de la pared celular y con ello la pérdida de firmeza del tejido y, cambios en el metabolismo del azúcar/almidón, una alteración en la composición y niveles de metabolitos secundarios como los pigmentos, así como también la susceptibilidad a una variedad de patógenos. Estos

cambios son el producto de una activación coordinada de múltiples rutas genéticas y bioquímicas, donde los factores de transcripción juegan un papel crucial en la regulación de estos procesos (Martel et al., 2011).

II.3 Regulación Transcripcional Durante la Maduración

El investigador Francis Crick, junto a James D. Watson en 1953, proveyeron una estructura teórica del material genético en forma de ADN. Crick propuso que la información genética fluye de ADN a ADN (replicación de ADN), de ADN a ARN (transcripción) y de ARN a polipéptido (traducción) (Figura 2) (Tropp, 2012). A esta teoría se le conoce como el dogma central de la biología molecular.

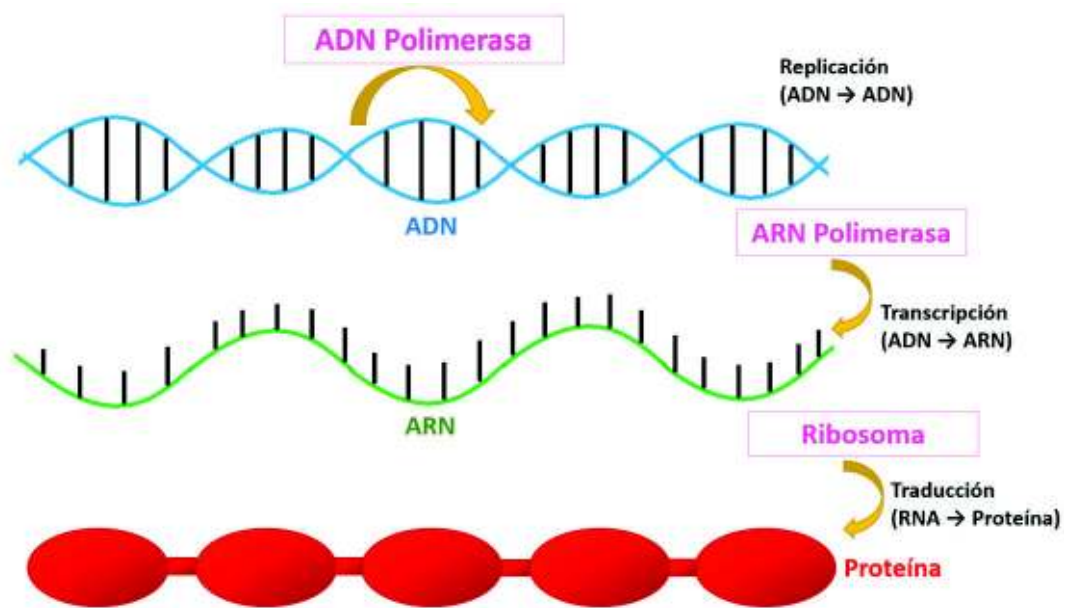


Figura 2. El dogma central de la biología molecular. Modificado de Tropp (2012).

Particularmente para el proceso de transcripción, se sabe que su regulación normalmente involucra la función de diferentes tipos de proteínas (Brooker et al., 2014). Es claro que ambos, el proceso de transcripción y su regulación en tejidos particulares o la respuesta a señales particulares, son controlados por elementos de secuencias cortas de ADN localizadas continuas al gen promotor (Latchman, 2008). Los factores de transcripción son proteínas que llegan a influenciar la habilidad de la ARN polimerasa para poder transcribir los genes (Figura 3) (Brooker et al., 2014).

Los factores de transcripción son proteínas de característica modular que consisten de varios números de dominios. Los tres dominios más importantes en estos son el sitio de unión al ADN, el dominio que activa la transcripción y el dominio de dimerización. Añadiendo, los factores de transcripción usualmente poseen una señal de localización nuclear (NLS) y tienen también una señal de exportación nuclear (NES). Los factores de transcripción también contienen un dominio de unión al ligando, dominios de unión a la hormona, los cuales son muy importantes para poder controlar sus actividades en el proceso de la transcripción (Kadonaga, 2004). Estas son características de los factores de transcripción, los cuales, como se ha dicho tienen varias funciones importantes, entre ellas la maduración de frutos.

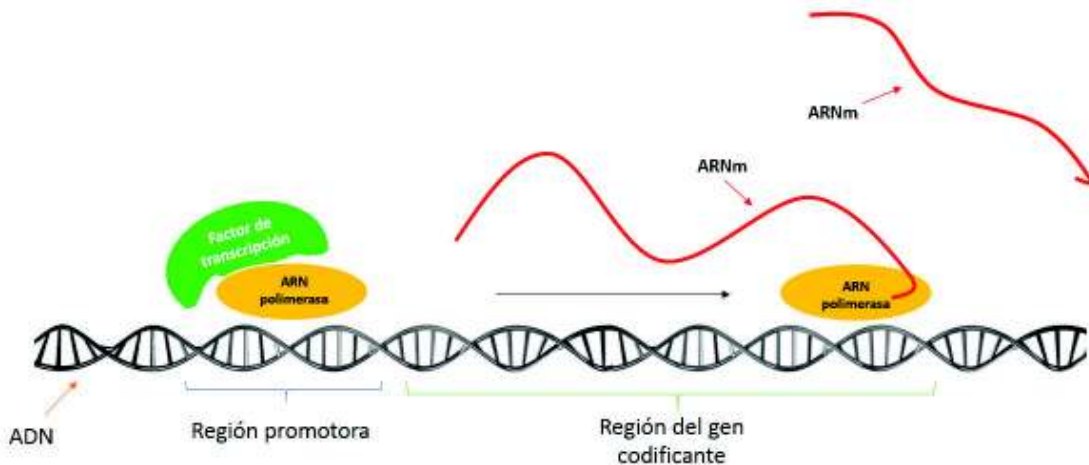


Figura 3. Representación esquemática de la función del factor de transcripción. Modificado de Latchman (2008).

La regulación en la transcripción de genes juega un papel muy importante para que exista un equilibrio en los procesos biológicos dentro de la célula. Particularmente en el proceso de maduración se han encontrado algunos factores de transcripción que son pieza clave en la regulación de dicho proceso. Entre las familias de factores de transcripción que tienen una gran importancia en el desarrollo y la maduración de frutos se encuentran las proteínas MADS. Éstas son un grupo muy grande de proteínas los cuales tienen como una de sus características principales presentar un dominio muy conservado, el cual obtuvo su nombre posteriormente a la caracterización de cuatro proteínas de este tipo formando un acrónimo:

MINOCHROMOSOME MAINTENANCE 1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, AGAMOUS de *Arabidopsis*, DEFICIENS de *Antirrhinum* y SERUM RESPONSE FACTOR del humano. Siendo una secuencia conservada de 56 aminoácidos, el dominio MADS está localizada en la N-terminal de todas las proteínas de tipo MADS (Pacheco-Sánchez, 2015).

Las proteínas MADS tienen dos regiones funcionales, la mitad N-terminal, la cual es la que contiene el sitio de unión al ADN, y la mitad C-terminal, la cual es necesaria para la activación de la transcripción. Estas proteínas pueden llegar a formar dímeros y multímeros que permiten la formación de diferentes complejos entre las proteínas MADS, ya que estas se pueden formar como homodímeros y heterodímeros (Pařenicová et al., 2003). Los genes MADS de las plantas están clasificados en dos grupos, en tipo I y tipo II de acuerdo a la secuencia de aminoácidos deducida del dominio MADS (Chen et al., 2012).

La gran mayoría de los genes *MADS* están clasificados en el grupo del tipo II, y todos codifican para un dominio MADS (M), una región de intervención (I), un dominio K (similar a queratina o keratin-like) y finalmente la región C-terminal (C) (Figura 4). El dominio M está involucrado en la unión al ADN y la dimerización con otras proteínas presentes del tipo MADS. El dominio K y la región C poseen regiones que forman hélices alfa en su estructura secundaria, la cual se ubican asociadas con interacciones entre proteínas. La región I y también el dominio K se han relacionado con una dimerización específica (Sun et al., 2014). Y finalmente, se sabe que la región C no es requerida para la dimerización, pero se tiene clara la importancia de ella para la nueva formación de complejos ternarios y para que la transcripción se active (Shore y Sharrocks, 1995).

En estudios recientes, se ha visto que la mayoría de las proteínas de la familia MADS han sido seleccionadas e identificadas en diferentes tipos de frutos jugosos, por lo que éstas han llegado a jugar un rol importante en la regulación de la maduración. Esto se basa en resultados obtenidos en plantas como *Arabidopsis* donde se sugiere que la actividad de los genes MADS-box coordinan estos aspectos y frutos como el tomate, donde han sido correlacionados con una inducción en la maduración de los sépalos de la flor y también están involucrados en el desarrollo y maduración de los frutos (Giovannoni, 2001).

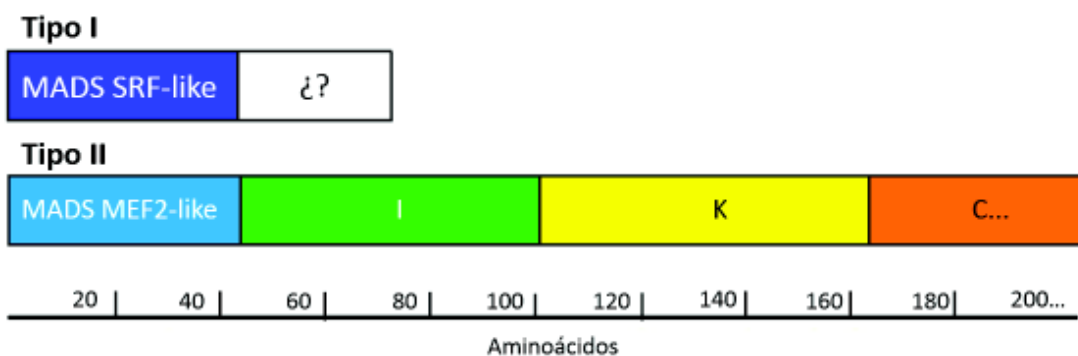


Figura 4. Representación esquemática de los dominios de las proteínas MADS en plantas. Modificado de Álvarez-Buylla et al. (2000).

En tomate se han obtenido genes mutantes pertenecientes a la familia MADS que trabajan en la regulación de la transcripción de la maduración de los frutos, los cuales se conocen como los genes *RIN*, *CNR* y *NOR*. Estos genes codificantes para reguladores transcripcionales actúan regulando la expresión de otros genes responsables de los fenotipos de maduración, incluyendo también la producción de etileno (Martel et al., 2011).

Por otra parte, se ha observado inhibición de todos los fenómenos de la maduración debido a la pérdida de función de la proteína MADS-RIN, tales como el ablandamiento del fruto, la biosíntesis de carotenoides, la respiración celular, y la producción de etileno. Es así, que MADS-RIN es un factor determinante en la regulación de la maduración de los frutos, el cual puede llegar a ampliarse a los componentes de la regulación genética necesarios para desencadenar la maduración óptima que posee una relación con la biosíntesis del etileno (Fujisawa et al., 2013).

Otro de los factores de transcripción que se ha visto que juegan un papel importante en la maduración de los frutos son las proteínas homeobox (HB). En frutos de tomate se ha visto que *HB-1* controla de una forma positiva la expresión del gen que codifica para la enzima *ACO1* para producir etileno durante la maduración y desarrollo de los frutos (Lin et al., 2008). De esta manera, *HB-1* tiene un importante papel para que la transducción de señal ocurra y tenga como resultado el desarrollo de color, cambio en la textura, sabores y aromas de los frutos, característicos en su maduración (Cherian et al., 2014).

Los genes homeobox contienen una secuencia de ADN altamente conservada de 180 pb, y estos codifican para una proteína que está involucrada en los procesos de desarrollo del fruto. El homeodominio de los factores de transcripción HB es responsable de la unión específica al ADN. Se sabe además que *HB-1* está involucrado en varios procesos de desarrollo del fruto, como en el desarrollo biológico del meristemo apical y de respuesta a la luz, al estrés por agua, entre otros (Lin et al., 2008).

II.4 MADS-RIN y HB-1: Su Importancia en la Maduración de los Frutos y su Relación con los Genes *ACS* y *ACO* Durante la Maduración

Los frutos de tomate han sido utilizados como modelo de estudio de la maduración. Se sabe que un número de mutantes relacionados con la maduración del tomate han sido de gran utilidad en la investigación y la reproducción, y hay un interés especial en el gen mutante *rin* (ripening inhibitor, por sus siglas en inglés). El mutante *rin* muestra sensibilidad alta al etileno, incluyendo la triple respuesta de las semillas, la abscisión floral y la senescencia de los pétalos y de las hojas. Sin embargo, los frutos que poseen el mutante *rin* no muestran una maduración ante etileno exógeno, y aun así muestran inducción a algunos genes receptivos a esta hormona, indicando una retención de sensibilidad al etileno de los frutos. De esta manera se elucidó que el gen *RIN* codifica para un componente genético regulatorio necesario para activar la respiración climatérica y la biosíntesis del etileno, así como en la regulación no mediada por etileno.

Desde una perspectiva práctica, la mutación *rin* es usado ampliamente en los híbridos de las variedades del tomate para alargar la vida de anaquel del fruto y aumentar la calidad del mismo y que sea más aceptable para el consumidor. MADS-RIN es un ejemplo de un gen cuyos efectos son documentados *a priori*, sugiriendo que tiene un potencial excelente para poder poner en práctica la modificación genética de la maduración de los frutos y de las características en general de los frutos (Vrebalov et al., 2002).

La ruta de biosíntesis del etileno ha sido ampliamente estudiada en tomate y como había sido mencionado anteriormente, se sabe que esta involucra la conversión de SAM a ACC gracias a la enzima ACS, y posteriormente por la enzima ACO a etileno (Figura 5) (Karlova et al., 2014). Las funciones de las enzimas ACS y de ACO son consideradas como

limitantes en la producción de etileno durante la maduración de los frutos, y además se conoce que están codificadas en familias multigénicas. Cinco de las diferentes isoformas que presenta la enzima ACO han sido identificados en el fruto del tomate, y tienen una expresión diferencial durante el desarrollo del fruto y también durante su maduración. Y para la enzima ACS que se han identificado nueve genes en el fruto del tomate y entre ellas, son 5 las que se expresan durante el proceso de la maduración del fruto (Cherian et al., 2014).

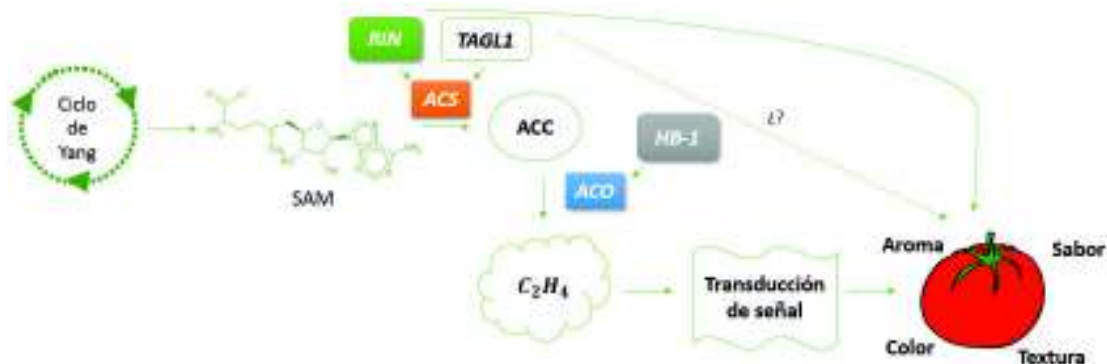


Figura 5. Representación esquemática de los factores de transcripción y de los genes que influyen en la maduración mediada por etileno del fruto en tomate. Modificado de Karlova et al. (2014) y Cherian et al. (2014).

El etileno es fundamental para que se active la maduración en los frutos climatéricos, y esto ha sido claramente observado por la regulación de la expresión de los genes *ACS* y *ACO* en plantas. Los genes (*LeACS6* y *LeACS1A*) que suprimían el etileno mostraron una fuerte reacción retardada en la maduración en tomate y en otros frutos, como el melón y la manzana. Sin embargo, las rutas independientes de etileno existen en los frutos del grupo climatérico, y es ahí donde sucede el ablandamiento, la acumulación de azúcares y también donde se le da el color a la pulpa en frutos donde el etileno es suprimido. Estos resultados han llevado a la conclusión de que la regulación de los frutos climatéricos y los no-climatéricos coexiste en los frutos climatéricos (Bouyazen et al., 2010).

El factor de transcripción *RIN*, pertenece al clado *SEPALLATA* (*SEP*). Estudios en frutos de tomate han elucidado la participación de otros tipos de MADS como el gen *TOMATO AGAMOUS-LIKE 1* (*TAGL1*), que antiguamente se había reportado en etapas tempranas del desarrollo del fruto. Sin embargo, posteriormente se reportó que está altamente expresado en las últimas etapas de este desarrollo y con *RIN* son influyentes primarios en la síntesis del etileno para unirse con el promotor *ACS* (Itkin et al. 2009; Cherian et al., 2014).

El tomate también ha sido objeto de estudio para otro factor de transcripción importante durante la síntesis del etileno, la proteína homeobox (HB). Estudios en el tomate han demostrado que el *HB-1* está involucrado en la organogénesis floral, en el desarrollo del carpelo y en la maduración. Y es así como la identificación de este factor de transcripción marca un paso más para el entendimiento del control de la maduración, y muestra como es regulado *ACO*. *HB-1* se encuentra expresado en altos niveles durante la maduración fisiológica y declina su expresión en la etapa previa al punto máximo de la maduración del fruto (Lin et al., 2008).

Como se ha visto anteriormente, los estudios básicos sobre el papel de los factores de transcripción MADS y HB-1 durante la maduración de frutos se centran en frutos modelos de estudio como el tomate. Sin embargo, la información en otros frutos es muy escasa. En este contexto, el presente estudio se analiza la expresión de estos factores de transcripción, así como los genes que codifican para las enzimas ACS y ACO durante la maduración post-cosecha en frutos de mango para de esta manera evaluar su posible función en el proceso de maduración de este fruto.

III. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se obtuvo el transcriptoma de mango Ataulfo (Dautt-Castro et al., 2016), en el cual se identificaron 18 secuencias codificantes para *MADS*, 16 secuencias para *HB*, 3 de *ACS* y 12 de *ACO*. Análisis bioinformáticos de dichas secuencias revelaron una proteína tipo *MADS* que tiene una alta identidad con *MADS-RIN* del tomate (67%), además se encontraron proteínas en el mango con altos porcentajes de identidad con *ACS2* y *ACO1* de tomate (68% y 56%, respectivamente). *ACS* y *ACO* son muy importantes para la regulación de la maduración de frutos a nivel transcripcional. Dicha regulación es un proceso clave para entender los cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en los frutos. Por tal motivo, el estudio a nivel molecular de los factores de transcripción *MADS* y *HB-1* durante la maduración post-cosecha en frutos de mango, así como la relación que mantiene con los genes a los cuales regula como *ACS* y *ACO*, proporcionaría información muy importante para entender su función en la maduración de este fruto.

IV. HIPÓTESIS

El gen que codifica para el factor de transcripción MADS que posee una alta identidad con la proteína MADS-RIN de tomate, así como el HB-1 y los genes *ACS* y *ACO* se expresan diferencialmente durante la maduración post-cosecha de los frutos de mango cv. Ataulfo.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

Evaluar la expresión de los factores de transcripción MADS y HB-1, y de los genes *ACS* y *ACO* durante la maduración post-cosecha de los frutos de mango cv. Ataulfo.

V.2 Objetivos Específicos

1. Analizar las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los factores de transcripción *MADS* y *HB-1*, y de *ACS* y *ACO* utilizando herramientas bioinformáticas.
2. Evaluar por qPCR la expresión de *MADS*, *HB-1*, *ACS* y *ACO* durante la maduración post-cosecha de frutos de mango.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Análisis Bioinformáticos de Secuencias

Las secuencias codificantes para los factores de transcripción *MADS* (18 secuencias) y *HB-1* (16 secuencias), así como las de los genes *ACO* (12 secuencias) y *ACS* (3 secuencias) fueron obtenidas a partir del transcriptoma de mango Ataulfo (Dautt-Castro et al., 2016). Se procedió a hacer un análisis bioinformático con el algoritmo BLASTx y BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para cada una de las secuencias para determinar los porcentajes de identidad a nivel de aminoácidos que presentan con proteínas de otras especies vegetales. El algoritmo traduce la secuencia de nucleótidos a aminoácidos y la compara con proteínas similares en otras especies de frutos y plantas. Además, se hizo un alineamiento con las secuencias de aminoácidos deducidos de cada familia de genes para la identificación de los dominios funcionales reportados en otros estudios para cada una de ellas.

VI.2 Evaluación de Rangos Dinámicos y Validación de GAPDH

Se realizaron pruebas de rangos dinámicos para cada gen evaluado y del gen normalizador *GAPDH* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) con el fin de determinar la eficiencia de la amplificación de sus oligonucleótidos. Los rangos dinámicos lineales son los rangos de concentraciones entre las que funciona correctamente el protocolo de qPCR. Se tiene en cuenta que en la qPCR no se pueden extrapolar los resultados, y es en este rango el que nos indica la concentración más alta y más baja donde el protocolo de PCR se comporta realmente en forma cuantitativa y las muestras se pueden medir (Brookman-Amisshah et al., 2015). Se utilizó el valor de Ct (cycle threshold) para llevar a cabo el análisis de la expresión génica. Este parámetro es un valor numérico que indica el ciclo en el cual se genera una fluorescencia que cruza un punto umbral o punto cruce que indica el producto amplificado generado al inicio de la fase exponencial de la reacción. Esta correlación entre fluorescencia y la cantidad de producto amplificado permite una cuantificación precisa de las moléculas blanco sobre un amplio rango dinámico. La pendiente representa la tasa a la que se genera el amplicón, expresado en porcentaje, y debe de ser lo más cercano a 100% posible, eso corresponde a la duplicidad del ADN a cada ciclo (Nolan et al., 2006).

Los rangos dinámicos se llevaron a cabo utilizando como templado el ADNc obtenido de los mangos del día 1 post-cosecha. De éste se hicieron cinco diluciones (1:2) con una concentración inicial de 80 ng/5 μ L (16 ng/ μ L) (Figura 6).

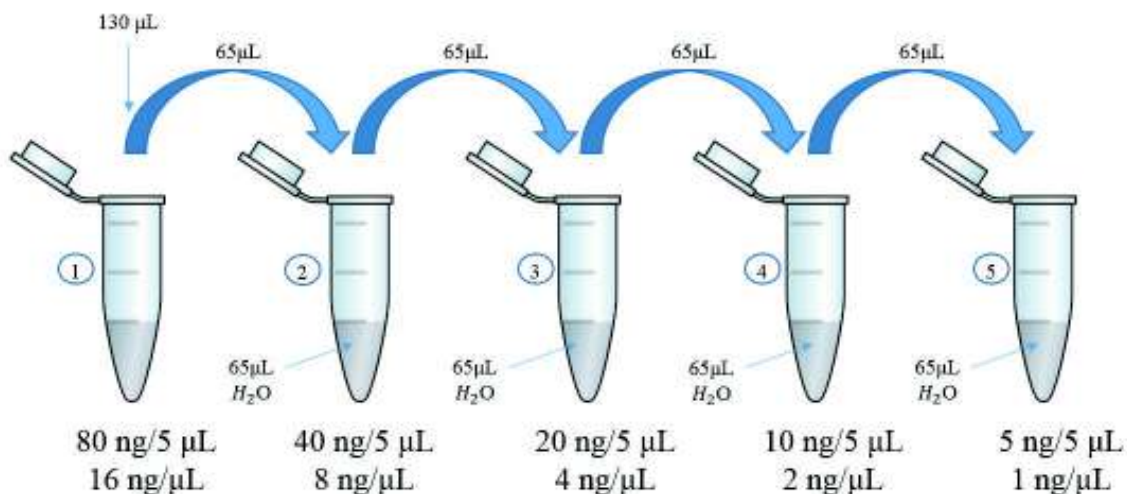


Figura 6. Diluciones para pruebas de rangos dinámicos para las PCRs cuantitativas.

La fórmula utilizada para calcular la eficiencia a partir del valor de la pendiente fue $E = (10^{(-1/pendiente)} - 1) \times 100$. Se busca una pendiente entre -3.2 a -3.5, la ideal siendo -3.32 que equivale a 100% de eficiencia. Para finalizar la validación, se calcularon los valores ΔCt ($Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{GAPDH}$) y se graficaron contra los logaritmos de las concentraciones de ADN.

VI.3 Evaluación y Análisis de la Expresión Génica del Factor de Transcripción *MADS* y *HB-1*, y de los Genes *ACS* y *ACO* por PCR Cuantitativa

Se utilizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) para evaluar la expresión génica del factor de transcripción *MADS* y *HB-1*, y de los genes *ACS* y *ACO* durante la post-cosecha del mango Ataulfo. En trabajos previos se realizó la extracción de ARN de pulpa de mango Ataulfo de los días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento post-cosecha (Anaya-Dyck, 2015) siguiendo la metodología reportada por López-Gómez y Gómez-Lim (1992). A partir de ellos se sintetizaron los ADNc, utilizando el sistema comercial de Invitrogen, y de estos se hizo una mezcla de tres réplicas biológicas (Sánchez-Galván, 2015).

También se realizó una normalización de los datos de expresión mediante el uso del gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), cuya expresión se ha visto que no se ve afectada durante la maduración de frutos de mango, por lo que ha sido utilizado como un buen normalizador (Dautt-Castro et al., 2015).

Las reacciones de amplificación se hicieron con la mezcla comercial iTaq Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD) 2X. Se prepararon reacciones a un volumen final de 20 µl, la cual constó de 10 µL de iTaq, 5 µL de templado (40 ng de ADNc), 1µL de los oligonucleótidos específicos sentido y antisentido (5 µM), para cada gen y se aforaron con agua estéril. Previo a las corridas de expresión relativa, se realizó una estandarización y prueba de especificidad mediante la curva de disociación (melt-curve) para cada par de oligonucleótidos. Las condiciones del qPCR fueron: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto. Se incluyeron los controles negativos para cada par de iniciadores.

La expresión relativa de los genes de este estudio, en mangos durante el almacenamiento post-cosecha se obtuvo mediante el análisis de datos utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) de acuerdo con la fórmula:

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

Esta fórmula analiza la expresión génica realizando una comparación con los niveles de expresión génica más bajos, en este caso los observados en el día 9 (calibrador). En este estudio, el tiempo x son los diferentes días de almacenamiento post-cosecha de mango y el tiempo 0 es el tiempo de referencia o calibrador (día 9).

VI.4 Análisis de los Datos

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con un diseño completamente al azar. Se compararon las medias con la prueba de Tukey-Kramer para los resultados de expresión génica del factor de transcripción *MADS*, *HB-1* y de los genes *ACS* y *ACO*, con una significancia del 95%.

VII. RESULTADOS

VII.1 Datos Obtenidos de los Análisis de BLAST

En el transcriptoma de mango Ataulfo (Dautt-Castro et al., 2016), se identificaron 18 secuencias codificantes para factores de transcripción tipo MADS, 16 para la familia de los factores de transcripción HB, y para los genes *ACS* y *ACO* 3 y 12, respectivamente. Las secuencias aminoacídicas deducidas de esos genes se obtuvieron y se hizo una selección, considerando primeramente aquellas que estaban completas de acuerdo a la comparación de los resultados del BLASTp. En las tablas I, II, III y IV se muestran las comparaciones y los porcentajes de identidad que presentan con proteínas muy similares en su estructura primaria en otros frutos. Los genes y proteínas codificadas fueron nombrados con base en su identidad más alta a proteínas del GenBank que ya estaban reportadas.

Tabla I. Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de MADS del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.

Proteínas MADS deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo			
Nombre	Clave de según transcriptoma	Proteína a la que más se parece	% Identidad
MiSEP3	>c18085_g1_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: NP_001234384.1	83%
MiMADS1	>c20228_g1_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: AGW23594.1	65%
MiAGL3	>c19749_g1_i1	Mango (<i>M. indica</i>) GenBank: AER34989.1	99%
MiAGL1	>c20508_g1_i1	Mango (<i>M. indica</i>) GenBank: AER34988.1	99%
MiAGL15	>c16891_g1_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004229674.1	57%
MiAGL24	>c1505_g1_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: NP_001306770.1	65%
MiMADS65	>cds.comp16319_c0_seq3	Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) GenBank: XP_006477467.1	79%
MiMADS2	>c10925_g1_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_010314516.1	30%

Tabla II. Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de HB del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.

Proteínas HB deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo			
Nombre	Clave de según transcriptoma	Organismo con el que se comparó	% Identidad
MiHB-6	>c18082_g2_i2	Naranja (<i>C. sinensis</i>) GenBank: KDO81047.1	73%
MiHB-17	>c22968_g2_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004250119.1	54%
MiHB-1	>c21304_g1_i1	Naranja (<i>C. sinensis</i>) GenBank: KDO76038.1	78%
MiHB-5	>c20957_g1_i2	Cacao (<i>Theobroma cacao</i>) GenBank: XP_007031433.1	67%
MiHB-12	>c21243_g1_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004230017.1	55%
MiHB-4	>c20898_g1_i1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004245792.1	68%
MiHB-16	>c20898_g1_i2	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004245792.1	68%

Tabla III. Comparación de la secuencia aminoacídica deducida de ACS del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.

Proteínas ACS deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo			
Nombre	Clave de según transcriptoma	Proteína a la que más se parece	% Identidad
MiACS5	>c19037_g1_i1	Naranja (<i>C. sinensis</i>) GenBank: NP_001275831.1	81%

Tabla IV. Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de ACO del transcriptoma de mango Ataulfo con secuencias aminoacídicas depositadas en el GenBank mediante BLASTp.

Proteínas ACO deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo			
Nombre	Clave de según transcriptoma	Proteína a la que más se parece	% Identidad
MiACO12	>cds.comp13812_c0_seq1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004247712.1	56%
MiACO13	>cds.comp18816_c0_seq1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004247712.1	59%
MiACO11	>cds.comp1117_c0_seq1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>) GenBank: XP_004247709.1	60%
MiACO5	>cds.comp18639_c0_seq1	Mandarina (<i>Citrus clementina</i>) GenBank: XP_006449820.1	88%

VII.2 Alineamiento y Localización de los Dominios Funcionales en las Secuencias Aminoacídicas de MADS, HB, ACS y ACO de Mango

Los miembros de la familia MADS, HB, ACS y ACO identificados se compararon entre sí por alineamiento utilizando el software CLC Main Workbench 10 y se identificaron cajas o dominios característicos de las proteínas de estudio. Lo anterior confirma que la estructura primaria de las proteínas de estudio en proteínas de la misma familia es muy similar.

En el presente estudio se hizo una localización de cuatro dominios en la estructura primaria de los factores de transcripción MADS, así como también la localización de un dominio muy conservado en las secuencias de HB de mango: el homeodominio. Además, se localizaron en el alineamiento de la secuencias de la enzima ACS un dominio muy conservado de la enzima piridoxal fosfato y de las secuencias ACO el dominio 2OG-Fe(II).

VII.2.1 Localización de los dominios funcionales en los miembros de la familia de factores de transcripción MADS y HB en mango

Durante el análisis de las secuencias aminoacídicas de MADS en mango se localizó el sitio de unión a secuencias conservadas de ADN, que se categoriza como dominio MADS, el cual consta de 56 a 60 amino ácidos aproximadamente; la región I (intervención) y el dominio K (similar a queratina) ambos están involucrados en interacciones proteína-proteína (los factores MADS forman homodímeros y heterodímeros en su forma activa) y por último el dominio C-terminal es importante para la constitución de complejos ternarios (unión de dímeros) y son también esenciales para la activación de la transcripción (Figura 7) (Pacheco-Sánchez, 2011).

En el caso de los alineamientos de las secuencias aminoacídicas de los factores de transcripción HB de mango se identificó el dominio más conservado: el homeodominio (Figura 8). El homeodominio tiene como función bioquímica ser el sitio de unión al ADN, y consta aproximadamente de 60 aminoácidos (Schena y Davis, 1994), y está involucrado en procesos de desarrollo de la planta.

Dominios de las secuencias MADS en mango

- Dominio MADS *MEF2-like*
- Región I
- Dominio K
- C-terminal

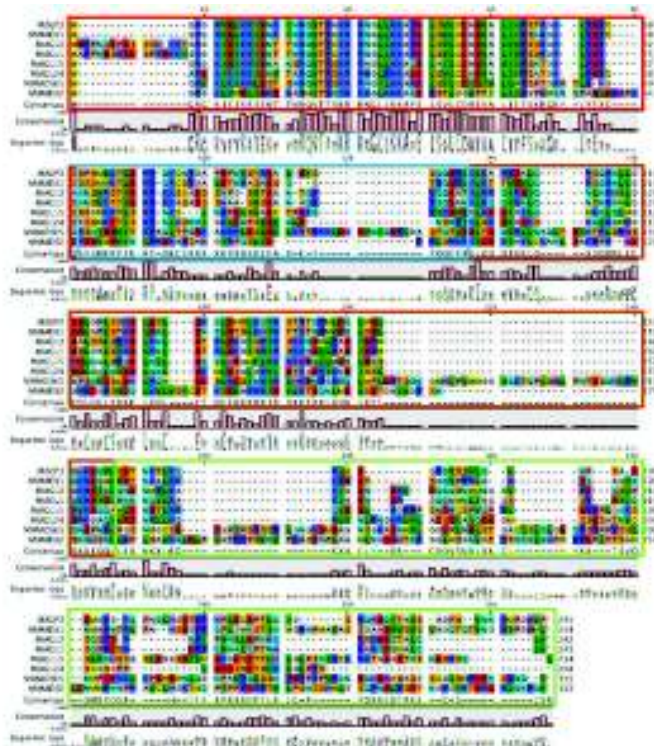


Figura 7. Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas MADS deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.

Dominios de las secuencias HB-1 en mango

- Homeodominio



Figura 8. Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas HB deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.

VII.2.2 Localización de los dominios funcionales en los miembros de la familia de enzimas ACS y ACO en mango

En el transcriptoma de mango Ataulfo se obtuvo únicamente una secuencia codificante completa de la ACS (*MiACS5*). Con el fin de identificar las regiones conservadas en su secuencia aminoacídica y sus dominios funcionales, *MiACS5* se alineó con una ACS de manzana (*Malus domestica*; GenBank: NP_001280870.1) y una de naranja (GenBank: NP_001275831.1) (Figura 9), presentando un dominio conservado de una enzima piridoxal fosfato (PLP)-dependiente entre los residuos 95 y 430.

En el caso para las ACO en mango, se identificó el dominio funcional 2OG-Fe(II) (Figura 10). Las secuencias de aminoácidos de ACO analizadas contienen el dominio 2OG-Fe(II) entre los residuos 238 al 342. El resultado del alineamiento de múltiples secuencias muestra que los aminoácidos de las proteínas ACO están relativamente conservados.

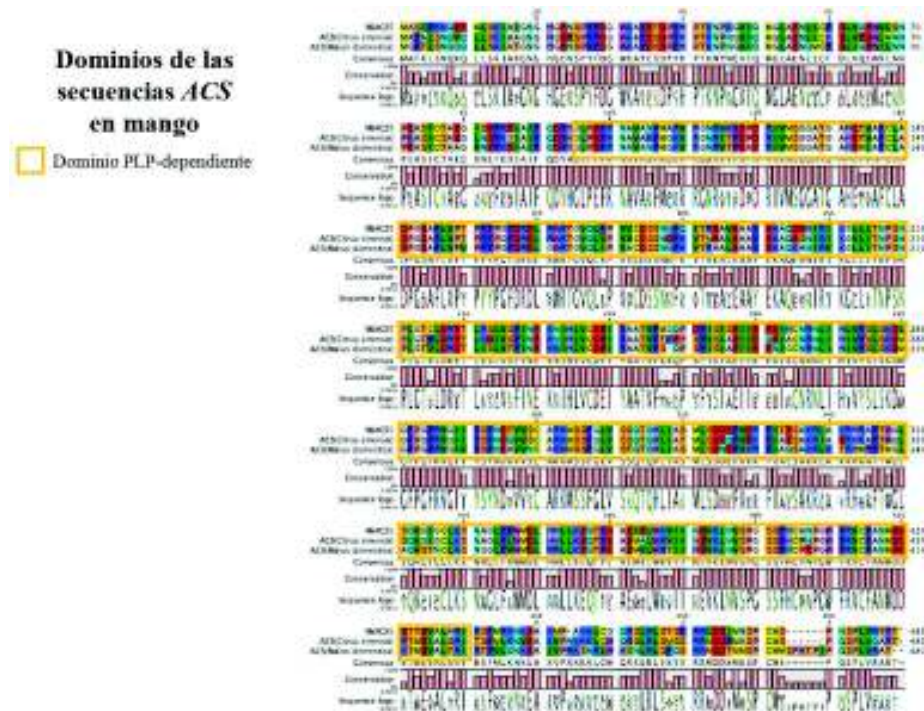


Figura 9. Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas ACS deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.



Figura 10. Dominios funcionales localizados en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas ACO deducidas del transcriptoma de mango Ataulfo.

VII.3 Prueba de Eficiencia y Validación de Iniciadores

En las corridas de qPCR experimentales, para los cuatro genes evaluados se observó un solo pico de amplificación según los resultados de la curvas de disociación, indicando con ello la especificidad de los iniciadores. Además, se encontró que en los ADNc del día 1 los valores de Ct obtenidos eran más altos para los cuatro pares de iniciadores evaluados.

VII.4 Evaluación de Rangos Dinámicos y Validación de GAPDH

Los resultados obtenidos de la corrida de los rangos dinámicos para cada uno de los genes de este estudio se pueden observar en la Tabla V. La primera columna indica las concentraciones de las diluciones hechas para cada uno de los genes de estudio como se muestra en la figura 10. La segunda columna señala el \log_{10} de cada una de las concentraciones correspondientes, la tercera y cuarta columna representan el promedio del Ct obtenido del gen de interés y del gen normalizador *GAPDH*, respectivamente. La quinta columna representa el valor del ΔCt ($Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{GAPDH}$).

Tabla V. Rangos dinámicos y validación de los genes de interés para las PCR cuantitativas.

Rangos dinámicos para <i>MADS</i>				
Concentraciones (ng/μL)	<i>log</i>₁₀	Promedio Ct <i>MADS</i> D1	Promedio Ct <i>GAPDH</i>	ΔCt
16	1.9	22.08847237	23.11561012	-1.0271378
8	1.6	22.91009521	23.97953796	-1.0694427
4	1.3	23.93754768	25.01955414	-1.0820065
2	1	25.13864136	25.96016502	-0.8215237
1	0.69	25.83173752	26.80923653	-0.977499
Rangos dinámicos para <i>HB-1</i>				
Concentraciones (ng/μL)	<i>log</i>₁₀	Promedio Ct <i>HB-1</i> D1	Promedio Ct <i>GAPDH</i>	ΔCt
16	1.9	29.17604065	23.11561012	6.06043053
8	1.6	30.02681541	23.97953796	6.04727745
4	1.3	31.04536438	25.01955414	6.02581024
2	1	32.22143936	25.96016502	6.26127434
1	0.69	32.96446609	26.80923653	6.15522957
Rangos dinámicos para <i>ACS</i>				
Concentraciones (ng/μL)	<i>log</i>₁₀	Promedio Ct <i>ACS</i> D1	Promedio Ct <i>GAPDH</i>	ΔCt
16	1.9	33.5566597	23.11561012	10.4410496
8	1.6	34.38524246	23.97953796	10.4057045
4	1.3	35.4188652	25.01955414	10.3993111
2	1	36.53600006	25.96016502	10.575835
1	0.69		26.80923653	

Con los datos de la tabla anterior, se realizó una regresión semi-logarítmica, en el eje de las X se gráfica el \log_{10} de la concentración de los ADNc empleados y en el eje de las Y los promedios de los Ct obtenidos en la corrida (Figura 11A, 12A y 13A) para tres de los genes evaluados y del gen normalizador *GAPDH*. En las Figuras 11B, 12B y 13B se muestran los valores de las pendientes que se utilizaron como criterio para aprobar la validación del gen normalizador para *MADS*, *HB-1* y *ACS* respectivamente, el cual debe estar entre -0.1 y 0.1.

En el caso del gen *MiMADSI* se obtuvo una eficiencia de 104.6% y una pendiente de la curva de validación de *GAPDH* de -0.1. Para el gen *MiHB-1* se obtuvo una eficiencia de 103.8% y una validación de -0.13. Finalmente, para el gen *MiACS5* se obtuvo una eficiencia de 99.9% y una curva de validación de -0.1. Los resultados obtenidos aprobaron la validación para evaluar la expresión de los genes de este estudio. Para el caso de *ACO*, previamente ya se

habían realizado las pruebas de rangos dinámicos y su validación con *GAPDH* (Dautt-Castro et al., 2015), donde se obtuvo una eficiencia de 91.3% y una pendiente de la curva de validación de -0.1, lo cual indica que al igual que los otros genes evaluados, se puede utilizar confiablemente *GAPDH* como gen normalizador para evaluar la expresión de *ACO*. También se calculó un índice de correlación R^2 que debe ser cercano al 1, e indica la reproducibilidad.

De acuerdo al análisis de los resultados y al observar las buenas eficiencias y validación del gen normalizador, se concluyó que para las corridas finales de los genes de interés se utilizaría la concentración de 40 ng/ μ L. Esta concentración fue considerada para así obtener una ventaja de una eficiente amplificación de la muestra y con un mínimo gasto de ADNc de mango, y también se consideró el rango de los Cts en los cuales la amplificación es logarítmica, el cual está en el rango de entre los 15 a 30 ciclos. Únicamente para el caso de *ACS*, el cuál mostró valores mayores a 30 ciclos, la corrida final se realizó utilizando 100 ng de ADNc molde. Sin embargo, como se había mencionado los valores de eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos y su validación con *GAPDH* fueron adecuados.

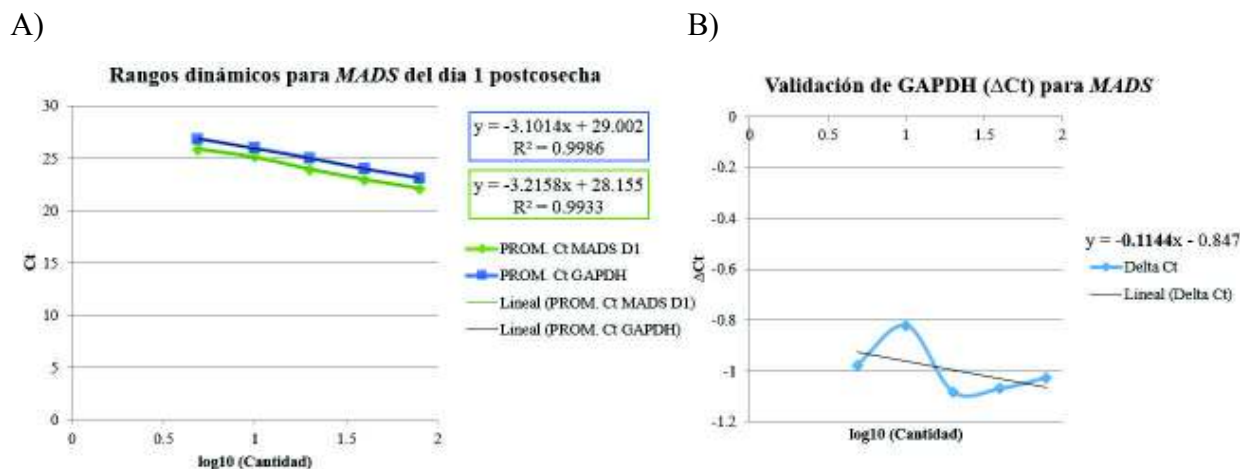
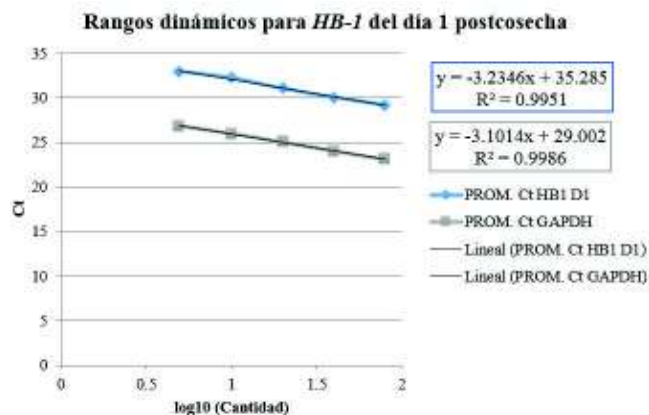


Figura 11. Gráfica de rango dinámico para *MADS* para evaluar la eficiencia del par de oligonucleótidos diseñados (A). Gráficas de validación para *GAPDH* con respecto a los genes de interés *MADS* (B).

A)



B)

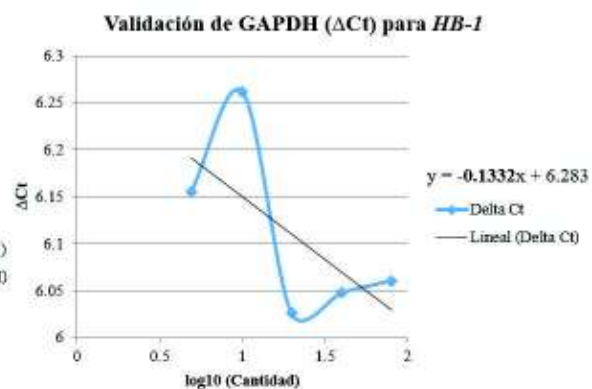
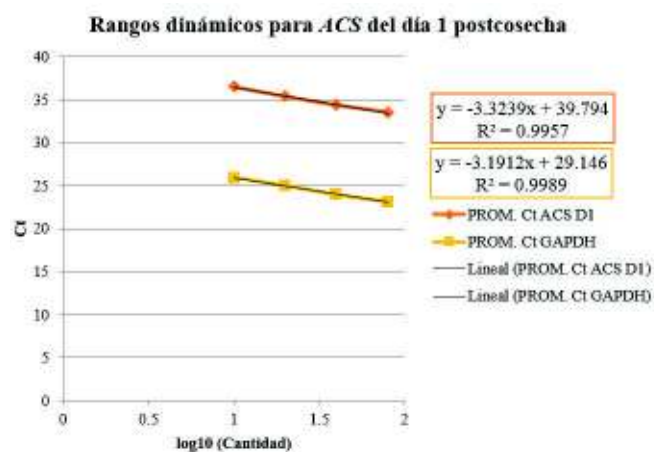


Figura 12. Gráfica de rango dinámico para *HB-1* para evaluar la eficiencia del par de oligonucleótidos diseñados (A). Gráficas de validación para GAPDH con respecto al gen de interés *HB-1* (B).

A)



B)

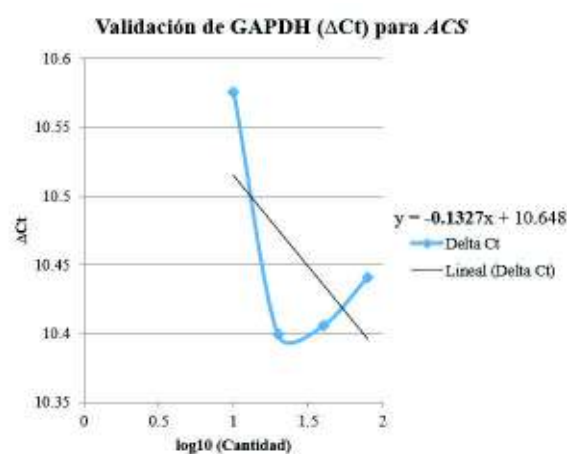


Figura 13. Gráfica de rango dinámico para *ACS* para evaluar la eficiencia del par de oligonucleótidos diseñados (A). Gráficas de validación para GAPDH con respecto al gen de interés *ACS* (B).

VII.5 Evaluación de Expresión de los Genes que Codifican para los Factores de Transcripción MiMADS1 y MiHB-1, y para los Genes *MiACS5* y *MiACO12*

En este trabajo se evaluó la expresión de genes que codifican los factores de transcripción MiMADS1 y MiHB-1, así como de las enzimas MiACS5 y MiACO12 en mesocarpio de frutos de mango durante los diferentes días post-cosecha 1, 3, 5, 7 y 9.

VII.5.1 Patrón de expresión génica del gen que codifica el factor de transcripción MiMADS1 y la enzima MiACS5 en frutos de mango cv. Ataulfo

Se evaluó la expresión del gen *MiMADS1* en etapa de maduración post-cosecha del mango cv. Ataulfo (Figura 14). En la gráfica se puede observar que los mayores niveles de expresión se observaron en el día 5, teniendo un incremento de 10 veces con respecto al nivel de expresión del día 9, mientras que en los días 1, 3 y 7 se mantuvieron constantes. La tendencia de expresión declinó significativamente en el día 9 post-cosecha.

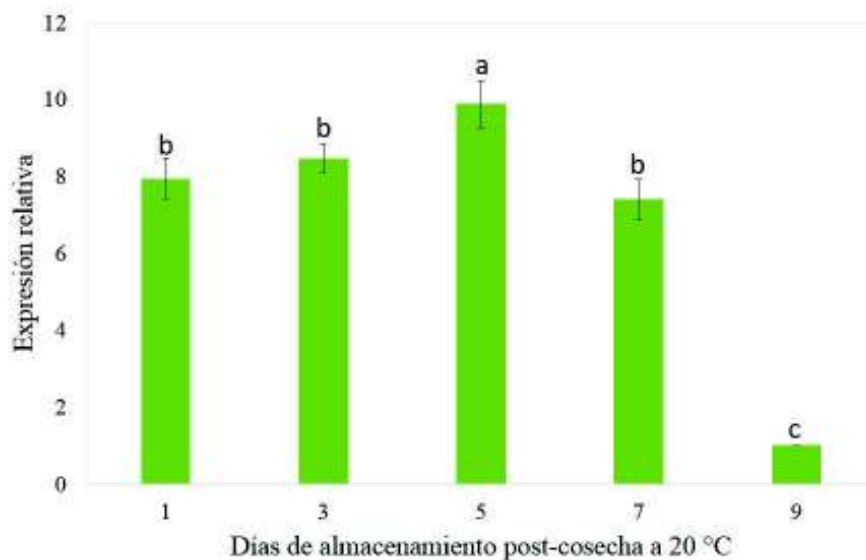


Figura 14. Expresión génica de *MiMADS1* durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La expresión relativa para el caso del gen *MiACS5* evaluada se presenta en la figura 15. Se muestra un incremento de expresión génica en los primeros 5 días post-cosecha, siendo el día 5 el de mayor nivel de expresión, siendo 11 veces más con respecto al día 9. El patrón de expresión posteriormente decrece hasta llegar al día 9 con una menor expresión.

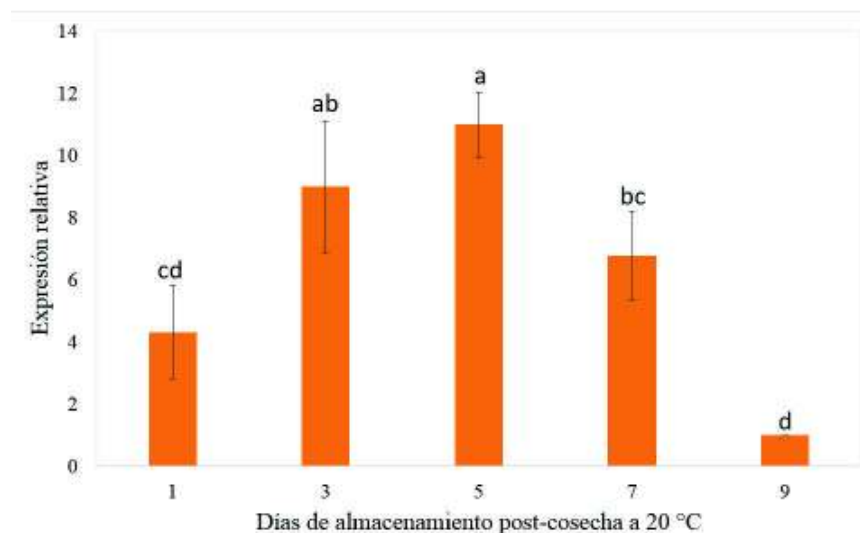


Figura 15. Expresión génica de *MiACS5* durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

VII.5.2 Patrón de expresión génica del gen que codifica el factor de transcripción *MiHB-1* y la enzima *MiACO12* en frutos de mango cv. Ataulfo

En el caso de la expresión relativa del gen *MiHB-1* (Figura 16), se puede observar que los niveles máximos de expresión se dieron en frutos del día 3, siendo 8 veces más con respecto a los niveles en el día 9. El patrón de expresión tiende a incrementar hasta el día 3 post-cosecha, siendo éste su punto máximo de expresión, mientras que en los siguientes días evaluados hay un decremento significativo, donde los valores de expresión estadísticamente son iguales al día 1. Estos análisis sugieren que *MiHB-1* se expresa mayormente en la etapa más cercana a la madurez fisiológica, donde el etileno va en aumento hasta llegar a su pico máximo.

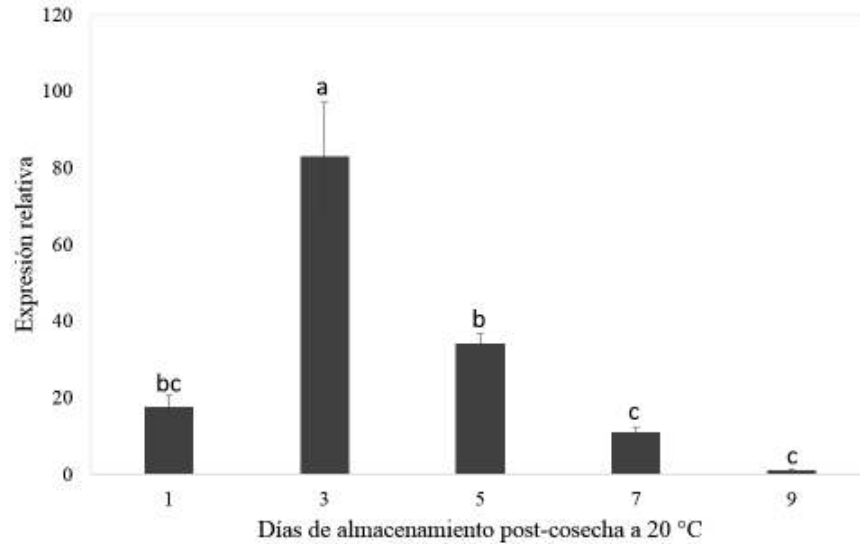


Figura 16. Expresión génica de *MiHB-1* durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En el presente trabajo también se evaluó la expresión génica del gen *MiACO12* (Figura 17), donde la tendencia de expresión incrementa hasta el día 3 post-cosecha, siendo el día con mayores niveles de expresión con un aumento de aproximadamente 180 veces con respecto al día 9, y de ahí en adelante su expresión presenta una declinación.

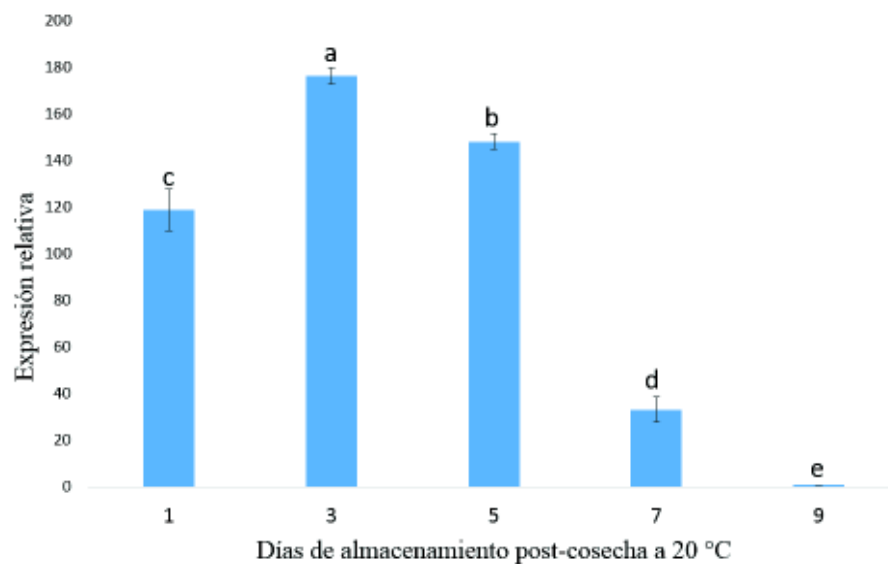


Figura 17. Expresión génica de *MiACO12* durante la maduración post-cosecha de mango cv. Ataulfo. Las diferencias entre medias se evaluaron por una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Localización de los Dominios Funcionales en las Secuencias Aminoacídicas de MADS, HB, ACS y ACO en mango

La localización de los dominios funcionales tiene una gran relevancia, ya que esto nos permite entender si es de carácter funcional, en el caso de ser una unidad modular de la proteína que lleva una función bioquímica determinada, o si es de carácter estructural, si se refiere a un componente estable de la estructura (Berg et al., 2002).

En estudios de proteínas MADS de la planta *Arabidopsis thaliana* se han encontrado cuatro dominios (M, I, K y C) en la estructura primaria de los factores de transcripción MADS. Los cuatro dominios fueron igualmente localizados en las secuencias MADS obtenidas del transcriptoma de mango (Pacheco-Sánchez, 2011).

En el caso de las proteínas HB de mango, se pudo localizar un dominio funcional muy conservado con función de unión al ADN: el homeodominio. Un gran número de homeodominios pueden llegar a reconocer un elemento basal de ADN altamente conservado que puede servir como promotor en muchos genes (Schena y Davis, 1994). Siendo un factor de transcripción poco estudiado, aún falta elucidar y conocer más a fondo sus otros posibles dominios funcionales.

Las secuencias aminoacídicas alineadas de ACS de este estudio presentan un dominio conservado de una enzima piridoxal fosfato (PLP)-dependiente, los cuales han sido ya producto de estudio debido a la función de la ACS asociado con la catálisis de la conversión de SAM a ACC en otros frutos para la síntesis de etileno (Liu et al., 2014).

También, se identificó el dominio funcional 2OG-Fe(II) para las secuencias ACO obtenidas de mango, esto indicando que la ACO es un miembro de la superfamilia de oxigenasas no dependientes del grupo hemo, la mayoría de ellas utilizando Fe(II) como un cofactor y 2-oxoglutarato (2OG) como cosustrato (Liu et al., 2014; John, 1991).

VIII.2 Expresión de *MiMADS1* y de *MiACS5* en Frutos de Mango cv. Ataulfo

Se sabe que los genes *MADS* se expresan en diferentes estados de desarrollo de las plantas, y también en una variedad de tipos de célula y de órganos, sugiriendo que se encuentran involucrados en aspectos del desarrollo que pueden llegar a afectar a múltiples tejidos y órganos. En un estudio por Sung et al. (2000), se observó que *MdMADS4* de manzana (*M. domestica*) se expresó significativamente en el meristemo floral, algunos órganos florales y durante el desarrollo del fruto, esto sugiriendo una posible función similar en los frutos de mango. La regulación de estos genes *MADS* se presenta a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional (Causier et al., 2002).

En el fruto del plátano (*Musa acuminata*) se obtuvieron clonas de 6 genes *MADS-box*. De éstos, tres genes (*MaMADS1*, 2 y 3) solamente se expresan en el fruto, mientras que los otros genes también se expresan en los órganos florales. Por tal motivo y debido a su interacción regulatoria con genes de la síntesis del etileno, se sugirió que *MaMADS1*, 2 y 3 están involucrados en la maduración del fruto (Elitzur et al., 2010). Haciendo una comparación a nivel de las secuencias aminoacídicas de estos genes, se observó un alto porcentaje de identidad de *MaMADS1*, *MaMADS12* y *MaMADS13* de 57, 64 y 55% respectivamente, con respecto al gen *MiMADS1*, lo cual sugiere la participación de este gen en la maduración del fruto de mango.

En frutos de mango cv. Keitt se evaluó la expresión génica del gen *MiMADS1* durante la etapa de amarre hasta su madurez fisiológica. *MiMADS1* mostró patrones similares de expresión en el tejido de mesocarpio tanto en la etapa de desarrollo de los frutos como en su maduración post-cosecha. Estos resultados sugieren la importancia de este gen para ambos procesos en los frutos de mango (Pacheco-Sánchez et al., 2015). Martel et al. (2011) obtuvieron información sobre el factor de transcripción *MADS-box* de tomate y cómo está asociado con la regulación de dos genes de la enzima ACS.

En frutos de tomate se reportaron que dos genes de *ACS* están involucrados en la iniciación de producción de etileno para maduración del fruto (Giovannoni, 2004). Además, en un trabajo por Vrebalov et al. (2002), se describió que un factor de transcripción *MADS-box* del tomate, codificado en *LeMADS-RIN* regula la síntesis de etileno, presumiblemente vía el control de los dos genes de *ACS* responsables de la producción de etileno. En este trabajo se logró evaluar la expresión génica de *MiMADS1* y *MiACS5*, ambos presentando el mayor nivel

de expresión en el día 5 post-cosecha, sugiriendo una posible interacción entre ambos como se presenta en el fruto de tomate. Por su parte, Xie et al. (2006) observaron un retraso en la maduración post-cosecha y en la senescencia en tomate al silenciar el gen *LeACS2*.

Estudios en mango cv. Kent han reportado que la máxima producción de etileno se presenta a los 7 días post-cosecha (Dautt-Castro, 2012). Por otra parte, en otro fruto climatérico como el durazno, se comprobó que a partir del día 5 post-cosecha se presenta un inicio de incremento en la producción de etileno (Begheldo et al., 2008). Este comportamiento en la expresión del gen *MiACS5* y la producción de etileno en los frutos de mango sugiere que la síntesis de etileno en el mango cv. Ataulfo, pudiera estar siendo regulada transcripcionalmente por el gen *MiMADS1*.

VIII.3 Expresión de *MiHB-1* y de *MiACO12* en Frutos de Mango cv. Ataulfo

En pasados estudios de las proteínas de la familia HB han demostrado su funcionalidad dentro de varios procesos del desarrollo de las plantas. Está reportado que un tipo de proteína homeobox knotted-like (KNOX) tiene como función situar el meristemo apical a través de la regulación de producción de giberelina y citocinina (Lin et al., 2008). En un estudio en la planta *A. thaliana*, reveló que el factor de transcripción AtHB-1 está involucrado en la composición de la pared celular y elongación para una posterior maduración (Capella et al., 2015). Presentando evidencia del amplio rango de procesos que también pueden regular los factores de transcripción HB presentes en los frutos de mango.

Por otra parte, está reportado que el gen *HB-1* guarda una relación con los genes relacionados con la señalización del etileno, como el gen *ACO*. También existe evidencia que la proteína LeHB-1 de tomate regula al gen *LeACO1*, y que silenciando LeHB-1 reprimiría a *LeACO1*, lo cual consecuentemente provocaría un retraso en la maduración del fruto (Lin et al., 2008; Pech et al., 2013). Además, se ha reportado que los transcritos del gen *LeHB-1* se acumulan durante la etapa de madurez fisiológica de los frutos de tomate y va declinando su expresión en las siguientes etapas; mientras que *LeACO1* incrementa durante la madurez fisiológica y se acumula durante la maduración del fruto (Lin et al., 2008). Similar a lo que sugiere que ocurre en los frutos de mango debido al nivel de expresión de *MiHB-1* y *MiACO12* evaluado en este estudio.

La carencia de estudios genéticos enfocándose en ACO crea el cuestionamiento de si esta enzima presenta un complejo estructural, bioquímico y post-traducciona similar como el de ACS (Van de Poel y Van Der Straeten, 2014). Se sabe que varios genes de ACO en tomate (*LeACS2* y *LeACS4*) son los responsables de la producción autocatalítica de etileno durante la maduración del fruto (Klee y Giovannoni, 2011).

El etileno es uno de los factores de mayor relevancia en la regulación del ablandamiento, senescencia y abscisión del fruto. La enzima ACO actúa como un acelerador en la maduración de los frutos, ya que cataliza la producción de etileno en el desarrollo de maduración climatérica, llevando hacia la etapa final de senescencia (Liu et al., 2014). De acuerdo a los datos de expresión encontrados en este estudio para la *MiACO12* se sugiere que ésta podría tener un papel muy importante en la síntesis del etileno en los frutos de mango cv. Ataulfo. Aunado a esto, en base a los patrones de expresión encontrados para *MiHB-1* y *MiACO12*, donde el día 3 post-cosecha fue el día de mayor expresión para ambos, sugieren que la proteína MiHB-1 pudiera estar regulando transcripcionalmente al gen *MiACO12* en fruto de mango, al igual que en tomate.

Por otra parte, interesantemente se ha reportado que MADS-RIN tiende a interactuar con las secuencias del promotor de *LeHB-1*, sugiriendo una ruta regulatoria de RIN – *LeHB-1* – *LeACO1* en tomate durante su maduración (Martel et al., 2011). Esta información da la pauta para futuros estudios en la ruta de maduración en mango para así poder tener un cuadro más completo de este proceso tan importante.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a la información obtenida en este trabajo, se concluye que los factores de transcripción *MiMADS1* y *MiHB-1*, y los genes *MiACS5* y *MiACO12* de mango cv. Ataulfo se expresaron de una manera diferencial durante los días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento post-cosecha. Se observaron patrones similares de expresión para *MiMADS1* y *MiACS5* y para *MiHB-1* y *MiACO12* lo cual sugiere una relación en la regulación de su expresión. Estos análisis proveen nuevos hallazgos del comportamiento de expresión génica de éstos genes durante la maduración climatérica del mango cv. Ataulfo.

X. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio a nivel transcripcional de los genes de este trabajo para así poder determinar sus diferentes funciones dentro de la etapa de la maduración del fruto de mango.
2. Estudiar y realizar la inhibición de la expresión de los genes que codifican para las enzimas ACS y ACO de mango para poder elucidar cuál de ellos tienen el papel más importante en la maduración del fruto.

XI. LITERATURA CITADA

- Álvarez-Buylla, E. R., S. Pelaz, S. Liljegren, S. Gold, C. Burgeff, G. Ditta, L. Pouplana, L. Martínez-Castilla y M. Yanofsky. 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:5328–5333.
- Anaya-Dyck, J. M. 2015. Expresión génica de proteínas de choque térmico pequeñas (sHSPs) en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) sometidos a tratamiento hidrotérmico. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Begheldo, M., G. A. Manganaris, C. Bonghi y P. Tonutti. 2008. Different postharvest conditions modulate ripening and ethylene biosynthetic and signal transduction pathways in Stony Hard peaches. *Postharvest Biology and Technology* 48:84–91.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko y L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. W.H. Freeman; New York, Estados Unidos de América.
- Bouyazen, M., A. Latché, P. Nath y J. Pech. 2010. Mechanism of Fruit Ripening – Chapter 16. *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives* vol. 1. Springer.
- Brooker, R. J., E. P. Widmaier, L.E. Graham, y P.D. Stiling. 2014. *Biology*. McGraw-Hill. New York, NY.
- Brookman-Amisshah, N., H. Packer, E. Prediger y J. Sabel. 2015. qPCR Application Guide: Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting. Integrated DNA Technologies, Biogazelle NV, Belgium; Ghent University, Belgium.
- Capella, M., P. A. Ribone, A. L. Arce y R. L. Chan. 2015. *Arabidopsis thaliana* Homeobox 1 (*AtHBI*), a Homeodomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation. *The New Phytologist* 207:669–82.
- Causier, B., M. Ashworth, W. Gui, y B. Davies. 2012. The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 158:423–438.
- Chen, G., W. Deng, M. Truska, F. Y. Peng y R. J. Weselake. 2012. The Bsister MADS-box proteins have multiple regulatory functions in plant development. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1:203–206.
- Cherian, S., C. R. Figueroa y H. Nair. 2014. ‘Movers and shakers’ in the regulation of fruit ripening: a cross dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany* 65:4705–4722.
- Dautt-Castro, M. 2012. Clonación y expresión de poligalacturonasas (PGs) durante la maduración de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones de Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Dautt-Castro, M. 2016. Genes y enzimas asociados a la degradación de pectinas y sus cambios por efecto del tratamiento hidrotérmico en frutos de mango Ataulfo durante su maduración poscosecha. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Dautt-Castro, M., A. Ochoa-Leyva, C. A. Contreras-Vergara, M. A. Pacheco-Sánchez, S. Casas-Flores, A. Sánchez-Flores, D. Kuhn e M. A. Islas-Osuna. 2015. Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp *de novo* transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science* 62:1–12.

- Dwight, Z., R. Palais y C. Wittwer. 2011. uMELT: Prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics* 27:1019–1020.
- Elitzur, T., J. Vrebalov, J. J. Giovannoni, E. Goldshmidt y H. Friedman. 2010. The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* 61:1523–1535.
- Elong, E.N., S. Adenet y K. Rochefort. 2015. Physicochemical, Nutritional, Organoleptic Characteristics and Food Applications of Four Mango (*Mangifera indica*) Varieties. *Food and Nutrition Sciences* 6:242–253.
- Fujisawa, M., T. Nakano y Y. Ito. 2011. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biology* 11:26.
- Giovannoni, J. J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. USDA-ARS Plant, Soil and Nutrition Laboratory and Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University, Ithaca, New York.
- Giovannoni, J. J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16:S170–S180.
- Ireland, H. S., J. Yao, S. Tomes, P. W. Sutherland, N. Nieuwenhuizen, K. Gunaseelan, K. M. David y R. J. Schaffer. 2013. Apple SEPALLATA1/2-like genes control fruit flesh development and ripening. *The Plant Journal* 73:1044–1056.
- Itkin, M., H. Seybold, D. Breitel, I. Rogachev, S. Meir y A. Aharoni. 2009. TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *The Plant Journal* 60:1081–1095.
- John, P. 1991. How plant molecular biologists revealed a surprising relationship between two enzymes, which took an enzyme out of a membrane, where it was not located and put it into the soluble phase where it could be studied. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:192–194.
- Kadonaga, J. T. 2004. Transcription in eukaryotes. *Cell*. 116:247.
- Karlova, R., N. Chapman, K. David, G. C. Angenent, G. B. Seymour y R. A. Maagd. 2014. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany* 65:4527–4541.
- Klee, H. J. y J. J. Giovannoni. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics* 45:41–59.
- Kumar, R., A. Khurana y A. Sharma. 2014. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany* 65:4561–4575.
- Latchman, D. 2008. *Eukaryotic Transcription Factors*. Elsevier Ltd. London.
- Liu, C., R. Lü, J. Li, A. Zhao, X. L. Wang, U. Diane, X. H. Wang, C. H. Wang, Y. S. Yu, S. Han y M. D. Yu. 2014. Characterization and expression profiles of *MaACS* and *MaACO* genes from mulberry (*Morus alba* L.). *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* 15:611–623.
- Lin, Z., Y. Hong, M. Yin, C. Li, K. Zhang y D. Grierson. 2008. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *The Plant Journal* 55:301–310.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods* 25:402–408.

- López-Gómez, R. y M. Gomez-Lim. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* 27:440–442.
- Manning, K., T. Mahmut, M. Pool, Y. Hong, A. J. Thompson, G. J. King, J. J. Giovannoni y G. J. Seymour. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38:948–952.
- Martel, C., J. Vrebalov, P. Tafelmeyer y J. J. Giovannoni. 2011. The Tomato MADS-box Transcription Factor Ripening-inhibitor Interacts with Promoters involved in Numerous Ripening Processes in a Colorless non-ripening-dependant Manner. *Plant Physiology* 157:568–1579.
- Nolan, T., R. Hands y S. Bustin. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Sigma-Aldrich, Homefield Road, Haverhill, UK.
- Pacheco-Sánchez, M. A. 2011. Cambios en la expresión de genes PG, MADS y ACCO en mesocarpio de mango (*Mangifera indica* L.) por efecto de la aplicación de tratamiento hidrotérmico. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Pacheco-Sánchez, M. A. 2015. Expresión del Factor de Transcripción MiMADS en Diferentes Etapas del Desarrollo de Mango (*Mangifera indica* L.) cv Keitt. Tesis de doctorado, Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Pacheco-Sánchez, M. A., C. A. Contreras-Vergara, E. Hernández-Navarro, G. Yepiz-Plascencia, M. A. Martínez-Téllez, S. Casas-Flores, A. A. Arvizu-Flores e M. A. Islas-Osuna. 2015. Molecular modeling and expression analysis of a *MADS-box* cDNA from mango (*Mangifera indica* L.). *3Biotech* 4:357–365.
- Pařenicová L., S. de Folter, M. Kieffer, D. S. Horner, C. Favalli, J. Busscher, H. E. Cook, H. E. Ingram, M. M. Kater, B. Davies, G. C. Angenent y L. Colombo. 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: New Openings to the MADS world. *The Plant Cell* 15:1538–1551.
- Payasi, A. y G. G. Sanwal. 2008. Ripening of climateric fruits and their control. *Journal of Food Biochemistry* 34:679–710.
- Pech, J., E. Purgatto, C. Girardi, C. Rombaldi y A. Latché. 2013. Current challenges in postharvest biology of fruit ripening. *Current Agricultural Science and Technology* 19:1–18.
- Ruxton, G. D. y H. M. Schaefer. 2012. The conservation physiology of seed dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367:1708–1718
- Sánchez-Galván, F. E. 2015. Efecto del tratamiento hidrotérmico en la expresión del glutatión s-transferasa durante la maduración poscosecha de mango cv. Ataulfo. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Sauco, V. G. 2009. Mango production and world market: Current situation and future prospects. *Acta Horticulturae* 1:107–116.
- Schena, M. y R. Davis. 1994. Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:8393–8397.
- Shore, P., y Sharrocks, A. D. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry* 229:1–13.

- Sivakumar, D., Y. Jiang y E. M. Yahia. 2010. Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Research International* 44:1254–1263.
- Sun, W., W. Huang, Z. Li, C. Song, D. Liu, Y. Liu, A. Hayward, Y. Liu, H. Huang e Y. Wang. 2014. Functional and evolutionary analysis of the AP1/SEP/AGL6 superclade of MADS-box genes in the basal eudicot *Epimedium sagittatum*. *Annals of Botany* 113:653–668.
- Sung, S. K., G. H. Yu, J. Nam, D. H. Jeong y G. An. 2000. Developmentally regulated expression of two MADS-box genes *MdMADS3* and *MdMADS4*, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple. *Planta* 210:519–228.
- Tropp, B. E. 2012. *Molecular Biology: Genes to Proteins*. Jones & Bartlett Learning, LLC. Sudbury, MA.
- Van de Poel, B. y D. Van Der Straeten. 2014. 1-aminociclopropano-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Frontiers in Plant Science* 5:1–11.
- Vrebalov, J., D. Ruezinsky, V. Padmanabhan, R. White, D. Medrano, R. Drake, W. Schuch y J. J. Giovannoni. 2002. A MADS-box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-inhibitor (RIN) locus. *Science Magazine* 296:343–346.
- Xie, F., Q. Liu y C. K. Wen. 2006. Receptor signal output mediated by the ETR1 N terminus is primarily subfamily I receptor dependent. *Plant Physiology* 142:492–508.