



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Identificación de proteínas asociadas con tolerancia  
inducida al daño por frío en frutos de mango cv Keitt  
tratados hidrotérmicamente**

## **TESIS**

Que presenta

**IBQ. DENNISE ALEJANDRA CHAIREZ VEGA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA  
Y  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Directores

**DR. JOSÉ ÁNGEL LÓPEZ VALENZUELA**  
**DRA. NANCY YARELI SALAZAR SALAS**

Culiacán, Sinaloa, Junio de 2018

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología y Tecnología Poscosecha de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José Ángel López Valenzuela y la Dra. Nancy Yareli Salazar Salas, así como la asesoría del Dr. Misael Odín Vega García y la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo. Contó con financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI 2015/256) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La IBQ Dennise Alejandra Chairez Vega recibió beca de estudios de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y beca de terminación de tesis del PROFAPI.



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

## **CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 7 del mes junio del año 2018, el (la) que suscribe IBQ. Dennise Alejandra Chairez Vega, alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0708122-7, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Angel López Valenzuela y Dra. Nancy Yareli Salazar Salas y cede los derechos del trabajo titulado "Identificación de proteínas asociadas con tolerancia inducida al daño por frío en frutos de mango cv Keitt tratados hidrotérmicamente", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Dennise A. Chairez*

IBQ. Dennise Alejandra Chairez Vega

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, en especial a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas y a la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos por permitirme llevar a cabo mis estudios profesionales.

A todos los maestros de la facultad que han contribuido de alguna manera estos 8 años, gracias a ustedes he crecido tanto profesional como personalmente.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y Al Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo económico otorgado durante mi estancia en la maestría, así como al financiamiento del proyecto de tesis.

A mis directores de tesis, Dr. José Ángel López Valenzuela y Dra. Yareli Salazar Salas, muchas gracias primeramente Dr. José Ángel por permitirme trabajar en su laboratorio y darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, y Dra. Yareli por todo el apoyo, consejos y ayuda brindada. Por siempre estaré agradecida con ustedes.

A la MC. Jeanett Chávez Ontiveros y Dra. Karen Pineda Hidalgo por estar siempre al pendiente tanto en cuestión de trabajo como personal. Gracias por las asesorías, las pláticas, por su amistad y los cafés de la mañana. Este trabajo se logró en gran parte gracias a su impulso y motivación.

Al laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha por toda la ayuda proporcionada, por el trato tan amable que recibí durante la realización del trabajo, al Dr. Misael por las valiosas asesorías brindadas y a la Dra. Martha Edith López López por ser siempre tan servicial, por la gran ayuda, los consejos, por siempre estar al pendiente de mí y aclarar cualquier duda que tuviera en cualquier momento.

A mis compañeros y amigos de laboratorio ¡son los mejores!, al “mango team” Milton y Cynthia por esos días en el laboratorio que nos dieron las 4 de la mañana procesando, mejor compañía no pude haber tenido, los quiero mucho a los dos, Milton por ayudarme, aconsejarme y por las discusiones tan agradables que tuvimos,

y Cynthia por preocuparte por mí y ser tan linda y honesta persona. Elthon, por tu valiosa amistad, María Fernanda por la ayuda contribuir en gran parte para la realización del trabajo, Christian, David, Alberto Felix, Alberto Aguilar, Glenda, Adan, Cristina, a cada una de ustedes por hacer tan divertidos los días en el laboratorio, por hacerme reír y aguantarme. En sí, a todo el laboratorio por el gran trabajo en equipo que se realiza, porque todos están al pendiente de todos, no es solo trabajo de uno sino de todos; y por las carnes asadas con karaoke que fueron muy muy divertidas.

Gracias a la maestría conocí a dos grandes personas que se convirtieron en mis mejores amigas; Denisse y Erika. Gracias por todos los momentos tan divertidos que hemos tenido, por estar tan locas igual que yo, por el compañerismo, las quiero muchísimo a las dos y espero y nuestra amistad dure por mucho tiempo.

A mis amigos Dulce, Erik, Cristel, Aglae, Marco, Agustín, Manuel, Yolanda por estar ahí siempre y ayudarme a superar tiempos llenos de estrés, por su apoyo en todo momento y por su gran amistad. Y a mi mejor amigo Adrián, gracias por tus palabras de motivación, los regañones, el estar ahí siempre que te he necesitado y principalmente por creer en mí.

A los más importantes gracias a mi familia, a mis hermanos Rodrigo, Marcos y Elias; a mis tías que son muchas pero ellas saben que las aprecio y las quiero, a mis primos y primas. Al hombre de mi vida, siempre estaré agradecida con mi papá Elias Chairez que él lo es todo para mí, sin su esfuerzo y su sacrificio por sacar a la familia adelante, yo no estaría donde estoy ahorita, su apoyo y trabajo han logrado que pueda cumplir mis metas, a mi mamá Maria Esther Vega que es la mujer más fuerte y buena que conozco gracias por siempre estar ahí apoyándome en lo que decido, por alentarme a seguir adelante; los amo muchísimo a los dos son mis pilares más fuertes y agradezco a Dios de tenerlos como mis padres.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	8
A MANGO	8
1 Origen	8
2 Producción e importancia económica	9
3 Clasificación taxonómica y aspectos botánicos	11
4 Composición química y valor nutricional	14
5 Maduración	18
6 Almacenamiento	21
B DAÑO POR FRÍO	23
1 Síntomas de daño por frío	23
2 Mecanismos relacionados con el daño por frío	26
3 Métodos para reducir los síntomas de daño por frío	32

C	PROTEÓMICA EN MANGO	39
IV	JUSTIFICACIÓN	44
V	OBJETIVOS	45
A	OBJETIVO GENERAL	45
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	46
A	MATERIALES	46
B	MÉTODOS	46
1	Aplicación del tratamiento hidrotérmico	46
2	Índice de daño por frío (IDF)	47
3	Lixiviación de electrolitos	47
4	Contenido de malondialdehído (MDA)	47
5	Extracción de proteínas	48
6	Identificación de proteínas	50
7	Análisis estadístico	51
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
A	ÍNDICE DE DAÑO POR FRÍO	52
1	Coloración no uniforme	52

2 Marchitez	56
3 Picado superficial	58
4 Áreas necróticas o pudrición	59
B CAMBIOS EN PARÁMETROS RELACIONADOS CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO	60
1 Lixiviación de electrolitos	60
2 Contenido de malondialdehído (MDA)	63
C CAMBIOS EN LA ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO	66
1 Proteínas relacionadas con respuesta al estrés y defensa	73
a Proteínas de choque térmico	73
b Peroxidasas	75
c Superóxido dismutasa	77
d Factor de transcripción de choque térmico A1	78
2 Proteínas relacionadas con procesos de desarrollo y maduración del fruto	79

a Fitoeno desaturasa	79
b Pectato liasa	80
c GTPasa pequeña tipo Rab X y Rab11	82
d Chalcona sintasa	84
3 Proteínas relacionadas con respiración	86
a Ubiquinol oxidasa	86
4 Proteínas relacionadas con patogénesis	88
a $\beta$ -1,3- glucanasa	88
5 Proteína relacionada con $\beta$ -oxidación	89
a Acetil coA acil transferasa o 3-cetoacil-coA tiolasa	89
VIII CONCLUSIONES	91
IX BIBLIOGRAFÍA	92
ABREVIATURAS	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Partes anatómicas del fruto de mango	13
2	Principales variedades de mango comercializadas en México	15
3	Mecanismos propuestos para la respuesta al almacenamiento en frío en cáscara de mango cv Keitt	29
4	Principales síntomas de daño por frío en mango cv Keitt	53
5	Cambios en apariencia y maduración de frutos de mango con y sin tratamiento hidrotérmico	54
6	Lixiviación de electrolitos en frutos de mango almacenados hasta 20 días a 5°C, más un periodo de maduración de 7 días a 21°C	62
7	Contenido de MDA en frutos de mango almacenados hasta 20 días a 5°C, más un periodo de maduración de 7 días a 21°C	64
8	Cambios en la acumulación de proteínas de cáscara de mango tratados hidrotérmicamente y frutos control almacenados a 5°C durante 0, 10 y 20 días	67
9	Identificación por espectrometría de masas de las proteínas 2 y 36 indicadas en la Figura 8	69
10	Cuantificación de proteínas acumuladas diferencialmente entre los frutos de mango tratados hidrotérmicamente y frutos control almacenados por 0 (A), 10(B) y 20(C) días a 5°C	74

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Principales estados productores de mango en México en 2016	10
2	Taxonomía del mango	12
3	Composición química y nutrimental del fruto de mango	16
4	Efecto del almacenamiento y tratamiento hidrotérmico en los síntomas de daño por frío de cáscara de mango cv Keitt almacenado a bajas temperaturas	55
5	Identidad y función de las proteínas asociadas al daño por frío en cáscara de mango cv Keitt sin y con TH almacenados durante 20 días a 5°C	70

## I RESUMEN

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los frutos más importantes en términos de producción y comercialización en el mundo, pero al ser un fruto tropical es susceptible a desarrollar un desorden fisiológico llamado daño por frío (DF) cuando es almacenado a temperaturas por debajo de los 13°C sin llegar al punto de congelación. Los síntomas comunes de DF en mango son decoloración de la cáscara, coloración no uniforme, picado superficial y áreas necróticas. Una alternativa para disminuir los efectos del DF en mango es la aplicación de un tratamiento hidrotérmico (TH), el cual se ha demostrado que provee tolerancia a este desorden. Sin embargo, existe muy poca información acerca de los cambios en la acumulación de proteínas en respuesta a bajas temperaturas y aquellas relacionadas con la tolerancia al DF. El objetivo de este trabajo fue identificar proteínas asociadas con la tolerancia inducida al daño por frío en mango cv Keitt tratados hidrotérmicamente. Se utilizaron frutos de mango en estado verde maduro y se separaron en dos lotes, de los cuales a uno se le aplicó un TH (46.1°C/90-110 min) y el otro se utilizó como control; ambos fueron almacenados a 5°C por 20 días y posteriormente fueron sometidos a un periodo de maduración de 7 días a 21°C. Se evaluó el índice de daño por frío (IDF) por cada síntoma, lixiviación de electrolitos (LE), contenido de malondialdehído (MDA) y acumulación de proteínas en frutos tratados y el control. Los resultados de IDF mostraron que los frutos control presentaron una mayor severidad de los síntomas, siendo la coloración no uniforme el principal síntoma y se presentó a partir de los 10 días a 5°C. Los parámetros fisiológicos LE y MDA presentaron valores menores en los frutos con TH, sugiriendo un menor daño de las membranas con respecto a los frutos control. El análisis

proteómico entre frutos control y con TH detectó alrededor de 400 polipéptidos de los cuales 33 se acumularon diferencialmente durante el almacenamiento bajo condiciones de estrés por frío, lográndose la identificación de 23 proteínas por espectrometría de masas. Dentro de las proteínas con mayor acumulación en frutos con TH se encontraron algunas relacionadas con estrés y defensa como proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP clase II 17.6 kDa) y factor de transcripción de choque térmico A1 (HsfA1), así como peroxidasa (POX), superóxido dismutasa (SOD) y chalcona sintasa (CHS); las primeras dos podrían estar contribuyendo en la adquisición de termotolerancia y en conjunto con las del sistema antioxidante podrían jugar un papel importante en la adquisición de tolerancia al DF. Otras proteínas con mayor acumulación en frutos con TH están involucradas en el desarrollo y maduración del fruto como fitoeno desaturasa (PDS), una enzima de la ruta de biosíntesis de carotenoides que se relacionó con una coloración más uniforme en los frutos tratados, así como pectato liasa (PL) y GTPasa pequeña RabX y Rab 11. Estos resultados sugieren que la tolerancia al DF inducida por el TH está asociada con una mejor protección de las proteínas ante el estrés por frío, una mayor actividad del sistema antioxidante y de protección contra patógenos, favoreciendo un mejor desarrollo y maduración del fruto, así como una menor incidencia de síntomas y daño a las membranas en frutos con TH con respecto a los no tratados.

## ABSTRACT

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the most highly produced and commercialized fruit in the world, but being a tropical fruit it is susceptible to develop a physiological disorder called chilling injury (CI) when it is stored at temperatures below 13°C without reaching the freezing point. Common CI symptoms in mango are peel discoloration, pitting and necrotic areas. An alternative to reduce the effects of CI in mango is the application of a hot water treatment (HWT), which has been demonstrated to provide tolerance to this disorder. Nevertheless, there is not enough information about the changes in the accumulation of proteins in response to low temperature and those related to CI tolerance. The aim of this study was to identify proteins associated with chilling injury tolerance in mango cv. Keitt with hot water pretreatment. Mature green mango fruits were divided in two groups, one of them was treated with hot water (46.1°C, 90-110 min) and the other was used as a control; both groups were stored at 5°C for 20 days followed by a ripening period of 7 days at 21°C. Chilling injury index (CII) for each symptom, electrolyte leakage (EL), malondialdehyde (MDA) content and the accumulation of proteins were evaluated in treated and control fruit. CII results showed the symptoms were more severe in control than HWT fruit; the main symptom was uneven color development and was observed from day 10 at 5°C. The values of the physiological parameters EL and MDA were lower in HWT than control fruit, suggesting smaller damage in the cell membranes of treated fruit compared to the control. The comparative proteomic analysis between control and HWT fruits revealed about 400 polypeptides of which 33 were differentially accumulated during the storage under cold stress conditions; 23

proteins were identified by mass spectrometry. Some of the proteins with greater accumulation in HWT fruit included those related with stress and defense processes like small heat shock proteins (sHSP class II 17.6 kDa) and heat stress transcription factor A1 (HsfA1), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD), and chalcone synthase (CHS); the first two proteins may be contributing in the acquisition of thermotolerance and together with the antioxidant enzymes may play an important role in the acquisition of CI tolerance. Other proteins with greater accumulation in HWT fruit are involved in fruit development and ripening like phytoene desaturase (PDS), an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway that was related with a more uniform coloration in the treated fruit, as well as pectate lyase (PL), small GTPase RabX and Rab 11. These results suggest that the CI tolerance induced by the HWT is associated with better protein protection against the cold stress, a higher activity of the antioxidant and pathogen protection systems, which favors a better fruit development and ripening, as well as a less incidence of symptoms and membrane damage in HWT than non-treated fruit.

## II INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los frutos más antiguos y de mayor importancia comercial ya que es ampliamente cultivado y comercializado. Es reconocido por su excelente sabor exótico y usualmente es referido como el “Rey de las Frutas” (Sivakumar y col 2010), además de que se le atribuyen varias actividades biológicas y es considerado un fruto nutraceutico (Masibo y He 2009) por ser una fuente de micronutrientes importantes como vitaminas y otros fitoquímicos como compuestos fenólicos. Provee energía mayormente por su contenido de carbohidratos y también proporciona en menor proporción fibra dietaria, proteínas y grasas (Tharanathan y col 2006).

Los productos de mango son populares a nivel mundial y han aumentado su presencia en mercados estadounidenses y europeos. India es el mayor productor mundial, seguido por China, Tailandia, Indonesia, Pakistán, México y Brasil. El alto consumo de este fruto también puede explicarse por la existencia de más de mil cultivares diferentes alrededor del mundo (Matheyambath y col 2016).

El manejo de la cadena de frío extiende la vida poscosecha y mantiene la calidad general de los productos hortofrutícolas, ya que disminuye la actividad metabólica y con ello retrasa la maduración y senescencia. Sin embargo, muchos frutos tropicales y subtropicales son sensibles a bajas temperaturas, dando como resultado el desarrollo de un desorden fisiológico conocido como daño por frío (DF), cuyos síntomas y efecto sobre la calidad del fruto limitan su comercialización (Offers 1987; Kader y Mitcham 1994; Ponce de León 1997). El DF ocurre cuando el mango es expuesto a temperaturas menores de a los 13°C, y es el resultado de un mal

funcionamiento o interrupción del funcionamiento de la membrana de la pared celular que afecta la transferencia o flujo de los fluidos celulares hacia dentro y hacia afuera de la célula (Wills y col 1981).

Los síntomas típicos de DF en mango se manifiestan como decoloración de la cascara a colores de escala café o gris, picado (Pesis y col 2000), maduración irregular (Lederman y col 1997), reducción en contenido de carotenoides, descomposición de la pulpa (Lizada 1991), disminución en el desarrollo del aroma y sabor durante la maduración, mayor fuga de electrolitos, reducción en la concentración de sólidos solubles, y es más propenso a desarrollar podredumbres, con la consecuente reducción en la vida de anaquel. La gravedad del DF depende principalmente de la madurez del fruto, el tiempo de almacenamiento o transporte a las temperaturas de DF y el tipo de empaque utilizado (Medlicott y col 1990). Algunos factores pre-cosecha tales como bajas temperaturas durante el desarrollo del fruto también pueden causar DF después de la cosecha (Sivakumar y col 2011).

Se han propuesto dos hipótesis principales (que no son excluyentes entre sí) para tratar de explicar el efecto dañino de las temperaturas bajas en productos sensibles. La primera de ellas sugiere que el DF es consecuencia de una mayor rigidez de las membranas celulares, lo cual induce la inhibición de la actividad de las enzimas unidas a la membrana o transportadores (Wolfe 2006; Zhang y col 2010). La segunda se refiere al desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la cantidad de antioxidantes producidos, conocido también como estrés oxidativo. Las EROs comprenden principalmente el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales superóxido e hidroxilo. Si estas especies no son eliminadas reaccionan

rápidamente con algunas moléculas como ADN, proteínas y lípidos, lo que resulta en la peroxidación lipídica de la membrana (Rice-Evans y col 1997).

En la idea de disminuir los efectos del DF se han utilizado varios métodos que han presentado diversos resultados. En mango y algunos cítricos, la inmersión previa en agua caliente, conocida como tratamiento hidrotérmico (TH), ha tenido buenos resultados (Báez-Sañudo y col 1997; Lurie 1998). El acondicionamiento a temperaturas altas reduce los síntomas de daño por frío debido probablemente a la síntesis de algunas proteínas como las de choque térmico (HSP) y de otras diferentes que podrían modificar las propiedades de las membranas celulares proporcionando la base de la tolerancia térmica (Sala y Lafuente 2000; Gonzalez-Aguilar y col 2000; Yimyong y col 2011). Este tipo de acondicionamiento a temperatura y humedad altas ayuda además a sanar las heridas reduciendo las podredumbres, lo cual puede llegar a ser beneficioso para la calidad del fruto (Martínez-Jávega 1997). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales los frutos responden al estrés por bajas temperaturas y el efecto que tienen diversos tratamientos poscosecha como el hidrotérmico en la adquisición de tolerancia a este tipo de estrés, lo cual permitiría obtener beneficios agrícolas y económicos importantes. El análisis global de los cambios en la acumulación de proteínas (proteómica) representa una alternativa para lograr un mejor entendimiento de las bases bioquímicas del estrés por frío y tolerancia a este desorden, por lo que el objetivo del presente estudio es identificar proteínas asociadas con la tolerancia al daño por frío inducido por TH en frutos de mango cv Keitt.

### III REVISIÓN DE LITERATURA

#### A MANGO

##### 1 Origen

El mango es uno de los frutos más antiguos y más ampliamente cosechados y consumidos en regiones tropicales y subtropicales (Sivakumar y col 2010). Es originario del Noroeste de la India, de la Región Indo-Birmánica y las montañas Chittagong en Bangladesh, donde aún puede encontrarse en estado silvestre. Se estima que dicho fruto ha sido cultivado por más de 4,000 años en la India, lugar del cual se dispersó a otras áreas tropicales y subtropicales del mundo (SAGARPA 2009).

La distribución de su cultivo se extendió en primera instancia por el sureste asiático y más tarde al archipiélago Malayo; así los portugueses lo llevaron primero al continente africano y posteriormente a las costas de Brasil, y de ahí se distribuyó al resto de América. El mundo occidental se relacionó con el mango e inició su actual distribución por los portugueses con la apertura de las rutas marítimas hacia el Lejano Oriente, al principio del siglo XVI. Primeramente se lo llevaron de Indochina a la isla de Mindanao y a Sulus en el siglo XIII, siendo hasta fines del siglo XIV y principio del siglo XV que los viajeros españoles llevaron la fruta desde la India hasta Manila, en Luzón. Mientras tanto, los portugueses en Goa, cerca de Bombay, transportaron fruta de mango del sur de África hacia Brasil, alrededor del siglo XVI y unos 40 años después a la Isla de Barbados. Del mismo modo, los españoles introdujeron este cultivo a sus colonias tropicales del Continente Americano, por medio del tráfico entre las Filipinas y la costa oeste de México por los siglos XV y

XVI. Jamaica importó sus primeros mangos de Barbados en 1782 y las otras islas de las Indias Occidentales, al principio del siglo XVII (SAGARPA 2009).

## **2 Producción e importancia económica.**

Hoy en día el mango se cultiva en un área de aproximadamente 3.7 millones de hectáreas en el mundo. De acuerdo con Muchiri y col (2012), el mango ocupa el segundo lugar como planta tropical, solo detrás del plátano en términos de producción y superficie. Se estima que el mango es el tercer fruto tropical a nivel mundial en cuanto a su producción e importación (después del plátano y la piña) y el quinto de todos los frutos que se comercializan a nivel mundial (SAGARPA 2009).

El mango se produce en más de 90 países alrededor del mundo. Asia cultiva aproximadamente el 77% de la producción mundial de este fruto, mientras que América y África contribuyen aproximadamente el 13% y 9%, respectivamente (Matheyambath y col 2016).

En cuanto a producción la India es el país que ocupa el primer lugar a nivel mundial produciendo casi 19 millones de toneladas en el año 2016. China ocupó el segundo lugar con más de 4.6 millones de toneladas (FAOSFAT 2017), mientras que México se posicionó en el quinto lugar con una producción de 1.88 millones de toneladas (FAOSTAT 2017). A nivel nacional, Sinaloa ocupó el segundo lugar (**Cuadro 1**) en la producción de mango con 334,239 mil toneladas (SIAP 2017). En 2016 México aumentó su producción un 36%; a su vez, fue el país exportador principal de este fruto logrando comercializarse a mercados internacionales entre los que se encuentran Estados Unidos, Canadá, Japón entre otros, generando así una ganancia económica importante para el país.

**Cuadro 1.** Principales estados productores de mango en México en 2016.

<b>Estado</b>	<b>Toneladas</b>
Guerrero	358,235
Sinaloa	334,239
Nayarit	312,039
Oaxaca	158,847
Michoacán	146,767
Otros estados	131,012
<b>Total</b>	<b>1,880,000</b>

**Fuente: SIAP (2015)**

### 3 Clasificación taxonómica y aspectos botánicos

El término común mango y el nombre botánico *Mangifera indica* L. se originan del antiguo nombre Tamil “manga”. El mango pertenece a la familia Anacardiaceae que consiste de 64 géneros (Matheyambath y col 2016) **(Cuadro 2)**.

El mango usualmente viene en diferentes formas y tamaños dependiendo del tipo de cultivo, con frutos que varían en peso desde 0.2 kg hasta 2 kg. Internamente su pulpa es jugosa y de color anaranjado-amarillo con numerosas fibrillas suaves irradiando de su semilla plana y de forma ovalada colocada en el centro. Su aroma es placentero y su sabor es dulce con una acidez leve. La fruta es una drupa larga carnosa con un mesocarpio comestible de diferente grosor. El exocarpio (cáscara) es grueso y glandular. El mesocarpio (pulpa) puede ser fibroso o sin fibra con sabor desde ácido hasta dulce. Esta estructura provee pulpa comestible, la cual contiene un jugo dulce y de buen sabor y aroma. El endocarpio es leñoso, grueso, y fibroso y forma una cubierta para la semilla gruesa, dura y glandular **(Figura 1)**. La semilla puede ser monoembriónica o poliembriónica (Yahia y col 2006), es exalbuminosa, grande y plana, ovoide alargada y en su madurez está rodeada por el endocarpio. La testa es delgada. La cáscara es suave y verde en mangos inmaduros pero se vuelve amarilla dorada, rojo carmesí, amarilla, o rojo-anaranjada cuando madura dependiendo del tipo de cultivo (Matheyambath y col 2016). Hay aproximadamente mil variedades de mango alrededor del mundo, dentro de las cuales se incluyen Ataulfo, Haden, Keitt, Kent, Edward, Tommy Atkins, Palmer, Manila, Kesar, y otras variedades exóticas. Además de las numerosas variedades de plantas, se ha reportado que más de mil cultivares de mango han sido propagados vegetativamente

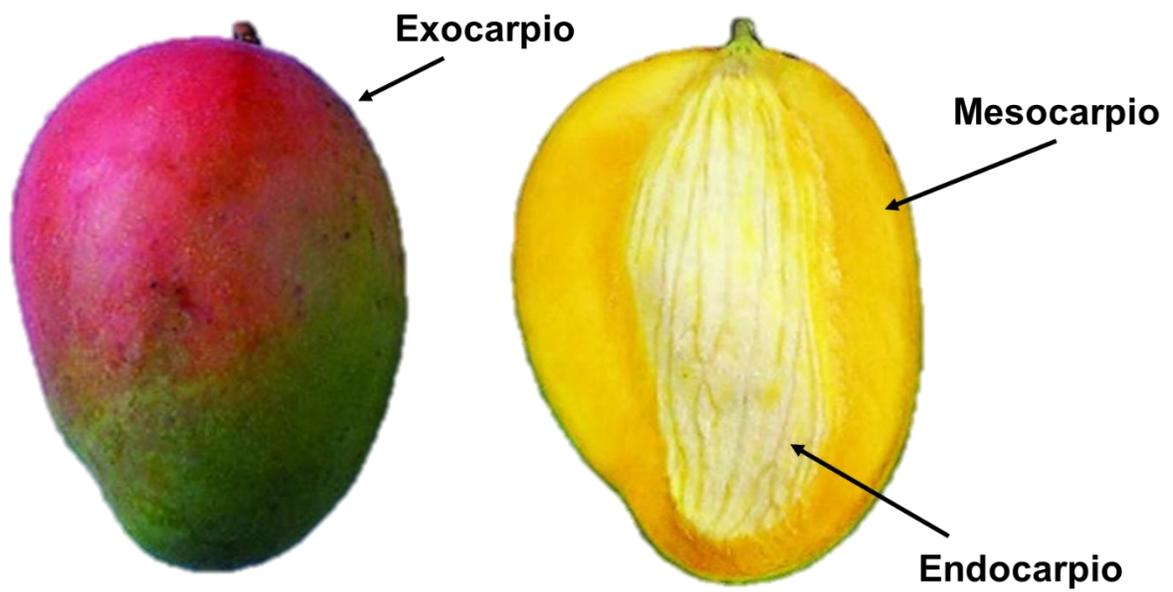
**Cuadro 2.** Taxonomía del mango

---

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Clase</b>	Dicotiledóneas
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Suborden</b>	Anacardiineae
<b>Familia</b>	Anacardiaceae
<b>Genero</b>	<i>Mangifera</i>
<b>Especie</b>	<i>Indica</i>

---

Fuente: Popenoe (1974)



**Figura 1.** Partes anatómicas del fruto de mango.

(Matheyambath y col 2016). México produce numerosas variedades de mango, pero tradicionalmente ha comercializado Tommy Atkins, Haden, Kent y Keitt. En los últimos años ha cobrado auge la exportación de Ataulfo, variedad producida sólo en México. En el caso de Sinaloa, las variedades más importantes en la actualidad son Kent, Keitt, Ataulfo y Tommy Atkins (**Figura 2**) (SIAP 2017).

#### **4 Composición química y valor nutricional**

El fruto de mango es considerado un alimento importante para la nutrición humana en varias partes del mundo y es utilizado en todas las etapas de su desarrollo (Matheyambath y col 2016). Es una fuente importante de carbohidratos, proteínas, grasas y micronutrientes tales como vitaminas y otros fitoquímicos (**Cuadro 3**) (Tharanathan y col 2006). Dentro de los principales micronutrientes del fruto de mango se encuentran vitaminas como el ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, niacina y  $\beta$ -caroteno, además de tener niveles altos de fitoquímicos como mangiferina, catequinas, quercetina, ácido benzoico, entre otros. Evidencias epidemiológicas sugieren que una dieta rica en frutas y vegetales provee beneficios a la salud y previene el desarrollo de enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares y cáncer. En el caso del mango, estos efectos benéficos a la salud son debido a la presencia de varios compuestos bioactivos como los descritos anteriormente que han demostrado tener efecto antioxidante, antialérgico, antiaterogénico, antiinflamatorio, antimicrobiano y antitrombótico (Matheyambath y col 2016).



**Haden**



**Keitt**



**Kent**



**Tommy Atkins**

**Figura 2.** Principales variedades de mango comercializadas en México.

Fuente: Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (2018)

**Cuadro 3.** Composición química y nutricional del fruto de mango

<b>Componente</b>	<b>Contenido por 100 g de tejido fresco</b>
<b>Componentes mayoritarios (g)</b>	
Agua	83.46
Proteína ( $\underline{N} \times 6.25$ )	0.82
Lípidos	0.38
Hidratos de carbono (por diferencia)	14.98
Fibra dietaria total	1.60
Azúcares totales	13.66
<b>Aminoácidos (g)</b>	
Ácido glutámico	0.431
Ácido aspártico	0.135
<b>Ácidos orgánicos (g)</b>	
Cítrico	0.43
Málico	0.08
<b>Vitaminas (mg)</b>	
Vitamina C (ácido ascórbico total)	36.4
Ácido nicotínico	0.594
Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)	0.90
Vitamina B6	0.119
Tiamina	0.037
Riboflavina	0.019
Vitamina A (UI)	1082
Niacina	0.669
<b>Minerales (mg)</b>	
Potasio	168
Fósforo	14
Magnesio	10
Calcio	11
Sodio	1

**Fuente: USDA (2016)**

La pulpa del fruto de mango maduro contiene cerca de un 15% de azúcares. Dentro de éstos se encuentran sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa; siendo la sacarosa, el azúcar principal en mango maduro. Los azúcares libres, incluyendo glucosa, fructosa y sacarosa, generalmente incrementan durante la maduración.

El fruto de mango contiene entre 0.5-1% de proteína en base húmeda. Se ha reportado la presencia de algunos aminoácidos esenciales como lisina, leucina, cisteína, valina, arginina, fenilalanina, y metionina en algunos cultivos. En cuanto a los lípidos, el contenido total de lípidos en siete cultivos comerciales de mango osciló entre 0.26 a 0.67% (**Cuadro 3**). El mango es particularmente una fuente rica de vitamina C. En estado inmaduro contiene más vitamina C que la que posee una vez que alcanza su maduración. En la literatura se indica un amplio rango en contenido de ácido ascórbico, el cual varía de 9.79 hasta 186 mg por 100 g de pulpa de mango. El consumo diario de este fruto por grupos de población de todas las edades puede cumplir con la recomendación de requerimiento dietario de vitaminas A y C. Este rango amplio en el contenido de ácido ascórbico se debe a las variaciones genotípicas, factores climáticos, prácticas de agricultura y la etapa de maduración del fruto (Matheyambath y col 2016).

Los carotenoides son compuestos liposolubles asociados con efectos protectores para la salud, en especial contra el cáncer. Además, algunos como los trans carotenos, son precursores de la vitamina A. A pesar de que se han identificado varios carotenoides en diferentes frutas, solo unos pocos aparecen en concentraciones significativas. Algunos reportes han encontrado que los más predominantes en mango son todos los trans carotenos, trans-violaxantinas y 9-

cisviolaxantinas, llegando a ser el 27, 28 y 18% del total del contenido de carotenoides, respectivamente (Sarawong y col 2004; Kang y col 2008).

Los ácidos orgánicos más abundantes en mango son málico y cítrico, los cuales son los principales responsables de la acidez del fruto. Otros componentes reportados son ácido fólico, vitamina B1, vitamina B2, vitaminas tiamina y riboflavina y niacina. El equivalente de vitamina A en mango oscila entre 1000 y 6000 UI. El  $\beta$ -caroteno representa el 60% de los carotenoides totales en mango, por lo que su consumo es muy importante para algunas poblaciones en regiones tropicales donde la deficiencia de vitamina A constituye un problema de salud pública (Matheyambath y col 2016).

## **5 Maduración**

El mango puede consumirse, comercializarse y transportarse en estado verde o maduro, según las necesidades del mercado y del consumidor final. Para ello, el productor necesita conocer el comportamiento fisiológico del fruto con el fin de identificar el momento más adecuado para iniciar con la cosecha y mantener las características de calidad durante todo el periodo poscosecha. Por lo general los frutos destinados a los mercados locales y transportados por vía aérea son cosechados “coloridos”, verde maduros, mientras que los frutos que deben ser transportados a largas distancias deben ser cosechados firmes y verdes (Quintero y col 2013). La recolección de los mangos se realiza en estado inmaduro organolépticamente, pero fisiológicamente maduro (Joas y col 2009), es decir, en este punto el mango ya ha crecido y desarrollado lo suficiente, pero sus aromas y sabores característicos aún no se han desarrollado. A medida que va madurando, el

mango presenta una disminución en el contenido de almidón y una serie de cambios en el color de la pulpa y de la cáscara. En la mayoría de las variedades estos cambios van acompañados por una disminución de la fuerza de ruptura de la cáscara, aumento del contenido de sólidos solubles y una disminución de la acidez (Morga y col 1979; Mejia y col 2007; Joas y col 2009).

La maduración del mango se caracteriza por una serie de transformaciones químicas que determinan los cambios de sabor, consistencia, color y aroma. Las sustancias acumuladas durante el desarrollo se transforman de manera lenta y progresiva en compuestos químicos que en su gran mayoría son de peso molecular alto como son los polisacáridos, además de los pigmentos y aromas característicos de cada fruto. Esto ocurre hasta que el fruto alcanza las condiciones de aroma y jugosidad que permitan clasificarlo como maduro (Joas y col 2009). El crecimiento y la maduración fisiológica del fruto solo se completan cuando permanece unida a la planta de la cual procede, pero la madurez organoléptica y la senescencia pueden proseguir una vez separada de la planta. Cuando sucede esto último se interrumpe la síntesis de ATP y el flujo de nutrientes, por lo tanto, el fruto comienza a hidrolizar los polímeros para obtener compuestos de peso molecular alto y poder así respirar (Montalvo y col 2007).

El mango es un fruto climatérico que presenta una curva de respiración simple, la cual se puede dividir en 4 etapas: 1) Pre-climacterica que tiene una duración de hasta tres días (26°C y 45-65% H.R.) después de haber sido cosechados. Se caracteriza por una producción baja de CO<sub>2</sub> (70 mg CO/Kg-h), La fruta es firme y cáscara de color verde, 2) Aumento del período climatérico con una duración de hasta el sexto día de poscosecha. Se produce un aumento repentino de

CO<sub>2</sub>, sin embargo los frutos permanecen verdes y firmes, 3) Máximo del climatérico, el cual ocurre al noveno día de poscosecha (cv. Kent) y en donde se produce la mayor liberación de CO<sub>2</sub> (250 mg. CO/Kg-h aprox.) en la fruta se produce un quiebre del color, aumento del jugo y del olor, y 4) senescencia, la cual se produce después de los 10 días de cosecha, en donde los niveles de CO<sub>2</sub> disminuyen bruscamente y se produce el aroma característico del fruto. (Krishnamurthy y Subramanyam 1970).

Después de haber alcanzado la madurez fisiológica el fruto está disponible para la cosecha y es en ese momento cuando se aumenta la producción de etileno, con ello la síntesis de enzimas hidrolíticas produce una serie de cambios en el fruto como son: pérdida de textura, cambio de color, aumento de los grados Brix, pérdida de acidez, entre otros. Un aspecto muy importante a tener en cuenta es que después de cosechado el fruto continúa respirando. Esto se demuestra por la producción masiva de dióxido de carbono acompañado de la combustión interna de glucosa y de metabolitos energéticos (Castrillo y col 1992; Schmilovitch y col 2000). La mayoría de los compuestos de peso molecular bajo, como los ácidos, son producidos a partir de la síntesis de acetil Coenzima A, la cual se produce por la degradación de carbohidratos, lípidos o aminoácidos (Tovar y col 2001). Los sólidos solubles son quizás uno de los parámetros fisicoquímicos de mayor interés en los procesos de maduración, ya que gracias a la hidrólisis de los almidones ocurrida con ayuda de las amilasas propias del fruto, se comienza a liberar una gran cantidad de moléculas de glucosa que hacen que el fruto aumente la cantidad de sólidos solubles lo cual se ve reflejado en el aumento de los grados Brix, provocando que el fruto se vuelva más dulce, por ende, más apetecible para el consumidor, pero a su vez se hace más atractivo para bacterias, roedores e insectos (Quintero y col 2013).

El color es una de las características fisicoquímicas más importantes en el proceso de maduración y es uno de los principales criterios de aceptación por parte de los consumidores (Slaughter 2009), ya que los compuestos químicos como las clorofilas, reaccionan a medida que pasa el tiempo, provocando que el mango vaya cambiando de color diariamente. Las clorofilas, son las responsables del color verde, éstas se van degradando de tal manera que permiten que los compuestos carotenoides, que son los responsables del color amarillo, absorban luz del espectro visible y por tanto la transmitan a la longitud de onda propia del color amarillo (Jha y col 2007; Ornelas y col 2008).

## **6 Almacenamiento**

El almacenamiento se ha convertido en una operación de enorme trascendencia económica, dado que su función primordial consiste en prolongar la vida útil y conservar la calidad de las frutas y hortalizas mediante la aplicación de las condiciones ambientales adecuadas que permitan reducir las velocidades de los procesos vitales de estos productos, la cual implica disponer de frutas y hortalizas por periodos más largos que los normales, ofrecer productos frescos a mercados distantes, regular la oferta y demanda para su distribución racional y reducir pérdidas durante su comercialización (Mc Donald 1994).

El almacenamiento a bajas temperaturas ha sido una de las estrategias poscosecha principales aplicada para prolongar la vida de anaquel de varias frutas y hortalizas, manteniendo su calidad. Este reduce la velocidad de respiración y minimiza el crecimiento de hongos, y por tanto retrasa la senescencia de la planta y de la maduración del fruto. Sin embargo varios productos hortofrutícolas, como el

mango, son susceptibles a este tratamiento de frío conservación, y sufren de un desorden fisiológico conocido como daño por frío (DF). El DF lleva a efectos no deseables en la calidad de frutas y hortalizas susceptibles, tal como maduración irregular, picado u oscurecimiento y marchitez. En los casos donde su impacto es muy severo, lleva a una deterioración significativa del producto y por tanto tiene un efecto muy negativo en su valor final de mercado. Hay una fuerte necesidad de aplicar medidas para reducir el DF y a su vez prolongar la vida de anaquel a su máximo de estos productos hortofrutícolas susceptibles. Diversos tratamientos poscosecha han sido probados para evaluar su grado de éxito en la disminución del impacto del DF en el producto, dentro de los cuales encuentran de tipo químico (tratamientos con salicilato y derivados) y físico (aplicación de pretratamientos de agua caliente/aire caliente, preacondicionamiento a temperaturas media-bajas, aplicación de luz UV-C o almacenamiento en atmósferas enriquecidas con CO<sub>2</sub>) (Soleimani y col 2013).

Los cambios de maduración de los frutos de mango durante el almacenamiento son menores mientras más baja sea la temperatura (Medlicott y col 1990). Vásquez-Salinas y Lakshminarayana (1985) señalan que el mango es un fruto que presenta daños por frío a temperaturas inferiores a 13°C. Sin embargo, el almacenamiento refrigerado de frutos semimaduros y de algunos cultivares presentan una mayor tolerancia a estos daños por tanto tiempo de almacenamiento (Vasquez-Salinas y Laksminarayana 1985). La respuesta de los frutos al almacenamiento a 12°C es dependiente del cultivar, de la madurez del fruto y de la fecha durante la temporada de cosecha. Así tenemos que el cv. Kent presenta un retardo más efectivo de la maduración durante el almacenaje en frutos más

inmaduros, lo que no ocurre con el cv Sensation que madura rápidamente en almacenamiento sin importar el estado de madurez (Seyrnour y col 1990).

## **B DAÑO POR FRÍO**

### **1 Síntomas de daño por frío**

Uno de los principales problemas poscosecha de frutas y vegetales de origen tropical y subtropical, es su alta sensibilidad a las temperaturas bajas, dando como resultado el desarrollo de síntomas de daño por frío (DF) (Kader y Mitcham 1994, Ponce de León 1997 y Offers 1987). Este fenómeno limita considerablemente la vida poscosecha de los productos sensibles y es responsable de un alto porcentaje de las pérdidas. Los síntomas del daño varían en función de la especie, tipo de tejido, su estado de madurez y metabólico (Del Río y col 1999).

El daño por frío a menudo es definido como la aparición de síntomas de daño después de un periodo crítico de exposición a temperaturas menores de 10-15 °C, pero por encima del punto de congelación (Wang 1993; Kaniuga 2008). Los síntomas típicos del DF se manifiestan como decoloración de la cáscara a colores de escala café o gris, picado (Pesis y col 2000), maduración irregular (Lederman y col 1997), reducción en carotenoides, descomposición de la pulpa (Lizada 1991), disminución en el desarrollo del aroma y sabor durante la maduración, fuga de electrolitos, reducción en la concentración de sólidos solubles, mayor propensión a desarrollar podredumbres, y reducción de la vida de anaquel. La gravedad del DF depende principalmente de la madurez del fruto, el tiempo de almacenamiento o transporte a las temperaturas de DF y el tipo de empaque utilizado (Medlicott y col 1990). Los

factores antes de la cosecha tales como bajas temperaturas durante el desarrollo del fruto pueden causar DF después de la cosecha.

El oscurecimiento inducido por las temperaturas bajas ha sido asociado con la conversión enzimática de fenólicos libres a o-quinonas, las cuales después polimerizan de manera no enzimática a pigmentos oscuros. La fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés, phenylalanine ammonie lyase) es una enzima que inicia la síntesis de fenólicos libres. En algunos frutos, se ha sugerido que la actividad de PAL es el factor limitante en el oscurecimiento inducido por temperaturas bajas (Chidtragool y col 2011).

En mango, se ha reportado que temperaturas entre 7 y 13°C, como en los cítricos, pueden inducir daño por frío (Hatton 1990). Además, se ha encontrado que el almacenamiento de los frutos en estado de madurez sazón a temperaturas menores de 13°C y de mangos maduros a temperaturas por debajo de 10°C inducen daño por frío, caracterizándose por una maduración irregular, desarrollo pobre de color y sabor, picado de la piel, mayor susceptibilidad a pudriciones y deterioro, desarrollo de color grisáceo en la piel, oscurecimiento de la pulpa (Mendoza y Wills 1984; Kader y Mitcham 1994).

Las respuestas propuestas como posibles causas primarias de daño por frío son: incremento en la concentración de calcio en el citosol, variación conformacional de las enzimas, cambios estructurales a nivel celular y transición en los lípidos de las membranas. Si las condiciones de frío se mantienen, estas respuestas primarias dan lugar a respuestas secundarias como aumento de la producción de etileno, cambios en la actividad respiratoria, pérdida de agua, aumento de la permeabilidad, emisión de aceites esenciales, aumento en volátiles y producción de enzimas implicadas en

el metabolismo de los fenoles (Come 1998). La causa fisiológica de la lesión del frío no tiene aún respuesta definitiva, por lo que no es posible proponer un modelo único para todos los vegetales. Es probable que el suceso primario varíe con la especie y que el subsiguiente desarrollo de la sintomatología varíe además con la manipulación (Martínez-Jávega 1992).

Las plantas o partes de las plantas como sus frutos expuestas a bajas temperaturas con frecuencia lucen sin daño al final del periodo de exposición, pero el DF puede manifestarse rápidamente después de la transferencia a temperaturas más cálidas. En otras especies, el daño es observado durante la exposición a bajas temperaturas, pero los síntomas son agravados después de ser transferidos a temperaturas más cálidas (Wang 1993). No está claro cuál mecanismo fisiológico está detrás de estos efectos. Es posible que químicos tóxicos acumulados no puedan causar tanto daño durante la exposición a bajas temperaturas, ya que la velocidad del metabolismo es lenta, comparado con la posterior exposición a temperaturas más altas lo cual resulta en un aumento a la velocidad metabólica (Chigchatuporn 2013).

El DF generalmente inhibe la biosíntesis y producción de etileno, lo que provoca fallas en la maduración en frutos de mango (Nair y col 2004). El tratamiento de inmersión exógeno con ethrel (50 a 500 mg-L<sup>-1</sup>) mejoró efectivamente la tolerancia al DF y la calidad durante el almacenamiento de mango, sugiriendo que la biosíntesis de etileno podría estar asociada con la aparición de DF (Nair y Singh 2003). El DF también causa daño a la pared celular de mango, lo cual incluye la pérdida de la integridad estructural (Han y col 2006) y anomalía en el metabolismo, lo que involucra cambios en la solubilización de pectina y la pérdida de la actividad de algunas enzimas (Ketsa y col 1999).

## 2 Mecanismos relacionados con el daño por frío

Se han propuesto dos hipótesis principales, que no se excluyen mutuamente, para explicar el efecto dañino del almacenamiento a temperaturas bajas en cultivos sensibles. La primera sugiere que el DF resulta en una mayor rigidez de las membranas celulares, lo cual induce la inhibición de la actividad de las enzimas unidas a la membrana o transportadores (Wolfe 2006; Zhang y col 2010). Esta rigidez dependerá de la composición de ácidos grasos de la membrana. La segunda hipótesis se refiere al desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Las EROs comprenden el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales superóxido e hidroxilo. Si las EROs no son eliminadas, rápidamente reaccionan con algunas moléculas como los lípidos lo que resulta en la peroxidación lipídica de la membrana (Rice-Evans y col 1997), lo cual lleva al daño celular o a la muerte celular (Blokhina y col 2003). En presencia de iones de metales de transición (tales como el  $Fe^+$  y  $Cu^+$ ) el peróxido de hidrógeno puede ser reducido por radicales superóxido a radicales hidroxilo. Entre los radicales primarios producidos, los radicales hidroxilo son los más reactivos y por tanto los más dañinos (Apel y Hirt 2004).

Lee y col (2002) evidenciaron que en la planta mutante *Arabidopsis frostbite1* (fro1) fue sensible al daño por frío y mostró una acumulación de EROs. Así mismo, Moon y col (2003) utilizaron una línea transgénica de *Arabidopsis* observando un incremento en la tolerancia al daño por frío y menores niveles de EROs, particularmente, peróxido de hidrógeno, comparado con el tipo silvestre. Estos reportes apoyan la segunda hipótesis del DF (Moon y col 2003).

El estrés oxidativo es un suceso secundario común en diversos estreses bióticos y abióticos. La pérdida de la integridad de la membrana está a su vez impulsada por procesos oxidativos, debido a que el estrés por frío aumenta los niveles de EROs que estimulan la peroxidación de lípidos en las membranas celulares (Sevillano y col 2009).

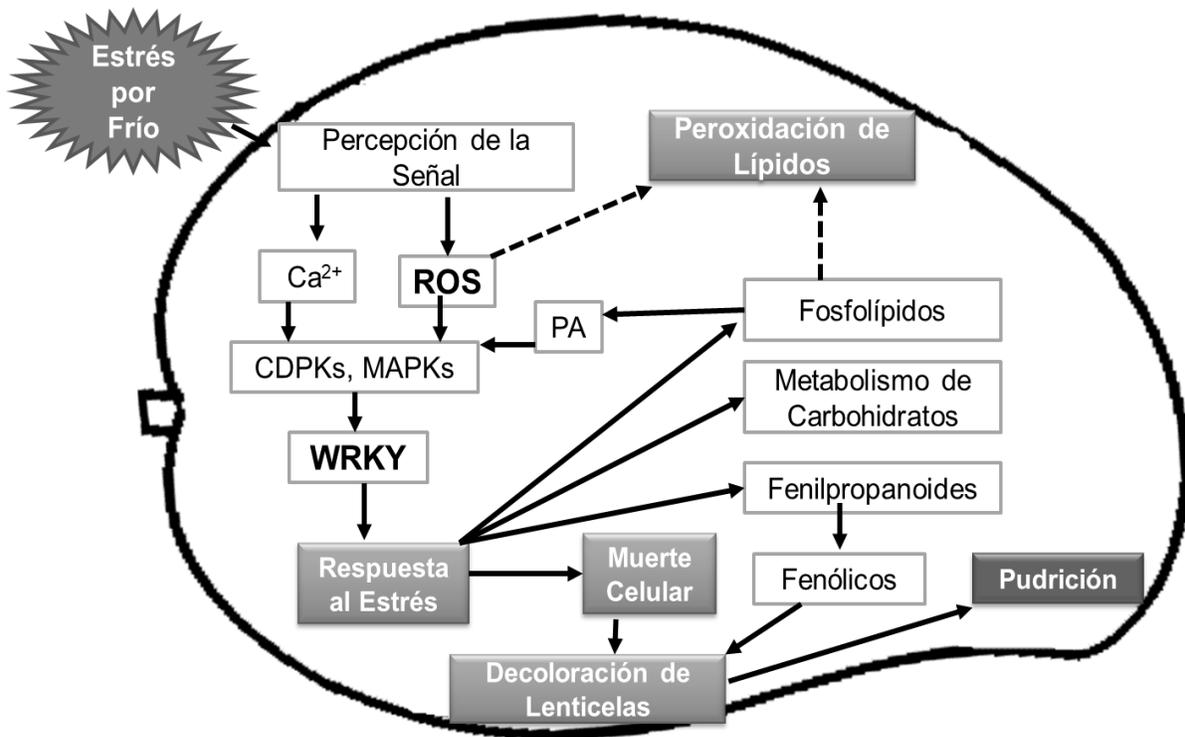
Moller (2001) sugiere que las plantas se defienden del estrés oxidativo a través de dos formas. La primera es por la activación de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la evasión de EROs, tales como la oxidasa alternativa (AOX). La ruta AOX es una rama de la cadena respiratoria de transporte de electrones en mitocondria que emerge del citocromo. Cuando hay una sobre reducción en esta cadena transportadora de electrones interviene AOX inhibiendo la reducción excesiva de ubiquinol y por lo tanto ayuda a evitar la acumulación de EROs (Moller 2001). Esta actividad antioxidante de AOX ha sido reportada en chile y tabaco (Purvis 1997; Maxwell y col 1999). El aumento en la expresión del gen de AOX lleva a un incremento en la resistencia al DF a través del mantenimiento del balance entre la producción de EROS y la actividad del sistema antioxidante general (Purvis 1997).

La segunda defensa en contra del estrés oxidativo es por la inducción de la expresión de genes relacionados con la eliminación de EROS como las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión S-transferasa, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (Moller 2001). Una mayor actividad del sistema antioxidante enzimático lleva a una

reducción de EROs, por lo tanto mejora la integridad de la membrana y en última instancia induce resistencia hacia el estrés abiótico tal como el DF (Mittler 2002).

Es evidente por lo ya reportado en la literatura que el estrés oxidativo es una respuesta temprana de los productos hortofrutícolas al daño por frío ya que podría iniciar la degradación de la membrana como resultado de la peroxidación lipídica (Dat y col 2000; Shewfelt y del Rosario 2000). Wang y col (2008) reportaron un incremento del contenido de malondialdehído en frutos de mango almacenados a bajas temperaturas (4°C), lo cual se asoció con una mayor peroxidación lipídica y pérdida de la integridad de la membrana.

Sivankalyani y col (2016b) realizaron un estudio transcriptómico para entender los mecanismos relacionados con la respuesta al estrés por frío en cáscara de mango cv Keitt (**Figura 3**). Cuando el fruto es almacenado a bajas temperaturas, éste percibe el estrés por frío iniciando la ruta de transducción de señalización por estrés por frío. Una vez percibida la señal por el fruto se genera una cascada de moléculas de señalización, iones de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) y especies reactivas de oxígeno (EROs), que actúan como mensajeros secundarios activando diversas quinasas entre ellas las CDPK y MAPK, las cuales a su vez activan los factores de transcripción WRKY que actúan cuando el fruto se encuentra bajo algún tipo de estrés ya sea biótico o abiótico. De esta manera se genera la respuesta al estrés que conlleva finalmente a la activación de una gran cantidad de rutas metabólicas. Una de estas rutas fue la de los fenilpropanoides, la cual es importante en la síntesis de compuestos fenólicos y lignina. La lignina contribuye en la firmeza y estabilidad de la pared celular en respuesta al estrés (Vogt 2010), mientras que los compuestos



**Figura 3.** Mecanismos propuestos para la respuesta al almacenamiento en frío en cáscara de mango cv Keitt. Adaptada de Sivalyankani y col 2016.

fenólicos son transportados por los ductos de resina acumulándose alrededor de las lenticelas provocando su decoloración al oxidarse; una sobreacumulación de estos compuestos genera un efecto tóxico provocando la muerte celular (Sivanyalkani y col 2016).

El estrés por frío en mango también resultó en la activación de la ruta de los azúcares, la cual está involucrada en la síntesis de varios osmolitos (Sivanyalkani y col 2016), cuya acumulación pudiera estar contribuyendo en la estabilización de los fosfolípidos de la membrana y brindando protección a estas estructuras del daño por frío (Thomashow 1999). También se observó la activación de la ruta de los fosfolípidos de donde se libera ácido fosfatídico, el cuál es un activador de las quinasas CDPKs y MAPKs aumentando la respuesta del fruto al estrés y generándose un ciclo donde la misma respuesta genera compuestos que la retroalimentan. A su vez, la liberación del ácido fosfatídico libera ácidos grasos que son oxidados por la excesiva cantidad de EROs producidos debido al estrés, provocando la pérdida de la integridad de la membrana celular. Por lo anterior, si se mantiene la condición de almacenamiento a bajas temperaturas da lugar a la aparición de áreas necróticas y pudriciones debido a la penetración y ataque de hongos patógenos.

La tolerancia al DF en alimentos hortofrutícolas ha sido atribuida a la habilidad para romper el  $H_2O_2$  y otros oxidantes por la CAT, APX y glutatión reductasa (GR). El método ideal para aliviar el DF es almacenar o enviar cada cultivar de mango a su temperatura ideal, y evitar la exposición a temperaturas más bajas de las adecuadas. Un método alternativo para reducir el DF es el acondicionamiento a bajas temperaturas, lo cual involucra el almacenamiento del mango a temperaturas justo

por encima de la temperatura específica a la que se da el DF, con el fin de inducir tolerancia. El tratamiento de choque en frío a 0°C por 4 h y después el traslado a 20°C por 20 h antes de su almacenamiento a 2°C, 85-95% HR por 12 días mejoró de manera significativa la actividad de CAT y APX en mango (Zhao y col 2006). CAT es parte del sistema de defensa principal contra EROs (Wang y col 2008). APX y GR juegan un papel importante en la protección del mango al DF (Zhao y col 2006). De acuerdo con Zhao y col (2006), el tratamiento con choque en frío aumentó el glutatión y contenido de fenólicos y antioxidantes no enzimáticos en mango, y podría ser considerado como parte de los mecanismos involucrados en la inducción de tolerancia al DF, donde está implicada la ruta ascorbato-glutatión que interviene en la descomposición y desintoxicación del exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células. Sin embargo, se recomienda el almacenamiento del mango a 8-13°C (dependiendo de la variedad y el tiempo de almacenamiento o envío) para prevenir el DF durante la cadena de suministro, aunque esto limita la comercialización a mercados distantes. También se recomienda seleccionar y crear variedades de mango menos susceptibles al DF y que muestren una mejor vida de anaquel a bajas temperaturas (Phakawatmongkol y col 2004).

Los frutos han desarrollado la habilidad para responder al estrés biótico y abiótico gracias a la plasticidad de su genóma, proteóma y metaboloma. Una característica general de estrés es la disfunción de las proteínas, por lo que el mantenimiento de su funcionalidad y la prevención de su agregación es esencial para mantener la homeostasis celular bajo condiciones de estrés. Los frutos tienen proteínas específicas para lograr este objetivo, y entre estas una familia sobresale, las pertenecientes a las proteínas de choque térmico (HSPs por sus siglas en inglés)

(Timperio y col 2008). Las HSPs constituyen una familia de proteínas cuyo peso molecular varía en un rango de 15 a 115 kDa. Se detectaron por primera vez cuando se acumularon en plantas en respuesta a altas temperaturas, y después observaron que tenían un papel importante en la tolerancia al calor, también llamado termotolerancia (Nover 1991; Vierling 1991). Bajo condiciones de crecimiento normal, las HSPs no son detectables usualmente en tejidos vegetales, pero se acumulan rápidamente en respuesta al choque térmico. La síntesis y acumulación de HSPs son proporcionales a la temperatura y duración del periodo de estrés (Waters y col 1996; Howarth 1991).

Se ha reportado que la actividad de las enzimas peroxidasas (POXs) también está relacionada con la prevención al daño por frío, al utilizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un grupo de estas peroxidasas fue evaluado utilizando como sustrato guayacol; sin embargo estas enzimas también pueden utilizar otros compuestos fenólicos como sustratos (Anderson y col 1995). Isozimas de POX (guayacol peroxidasa) se han encontrado en paredes celulares, el citosol, el retículo endoplasmático + Golgi, mitocondria, cloroplastos y la vacuola (Ranier y col., 2001). El incremento en la resistencia de plantas que se habían aclimatado a las temperaturas bajas fue correlacionado con el incremento en la actividad de POX (Prasad y col 1994; Kang y Saltveit 2002; Li y col 2011a).

### **3 Métodos para reducir los síntomas de daño por frío**

Se han desarrollado varios métodos para reducir los síntomas de daño por frío, entre los que se encuentran el acondicionamiento a temperaturas bajas o altas,

calentamiento intermitente, inmersión en agua caliente, empaçado en atmósferas modificadas, atmósferas controladas y reguladores del crecimiento.

La atmósfera modificada (AM) consiste en una reducción de la concentración de oxígeno y un aumento de la de dióxido de carbono en la atmósfera que rodea al fruto. Su efectividad depende fundamentalmente de los niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de la atmósfera y del producto almacenado. Las concentraciones altas de CO<sub>2</sub> son, en general, efectivas en la reducción de los síntomas de daño por frío, pero en ocasiones la respuesta de un mismo cultivar es variable dependiendo del estado fisiológico de la fruta (Wills y col 1989). En mango, Saucedo y Arévalo (1997) mostraron que el empleo de atmósferas controladas o modificadas con fines de conservación presenta ciertas limitantes, principalmente por la alta sensibilidad de estos frutos a los niveles altos de CO<sub>2</sub>.

El empleo de ceras en la superficie del fruto para mejorar su apariencia y reducir la pérdida de peso se encuentra ampliamente difundido (Cuquerrella y col 1981; Melleting y col 1982; Martínez- Jávega 1984). Sin embargo, el efecto de encerado en frutos sensibles al frío es contradictorio, la respuesta está en función de la composición de la cera y del estado fisiológico de los frutos (Martínez-Jávega 1995).

Li y col (2011b) observaron que el tratamiento de mango con brasinolido (BL), perteneciente a la familia de los brasinosteroides, disminuyó el efecto del DF, fenómeno asociado con la reducción de fuga de electrolitos. Este tratamiento con brasinolido en mango provocó un incremento en el contenido de ácidos grasos insaturados tales como los ácidos linoleico y linoléico. Así, la fluidez de la membrana de los mangos tratados con BL mejoró debido a un incremento en la

proporción de ácidos grasos insaturados, por lo tanto tuvo una menor tendencia a las transiciones de fases de un estado líquido-cristalino flexible a un gel sólido rígido. Además, los frutos tratados con BL exhibieron una mayor expresión de genes que codifican para proteínas de membrana, tales como la remorina, abscisic stress ripening-like protein (ASR), lipocalina inducida por temperatura (TIL) y dehidrina tipo II Sk2 (TSD), las cuales dan lugar a un incremento en la integridad de la membrana debido a su importante papel en la biogénesis y reparación de esta estructura, así como en la eliminación de moléculas dañinas, en la estabilización de la membrana, y su participación en la transducción de la señal de temperaturas bajas para activar la expresión de genes dependientes de la aclimatación a éstas condiciones (Li y col 2011b). El acondicionamiento a temperaturas moderadas previo al almacenamiento refrigerado puede aumentar la resistencia al frío. Este comportamiento podría estar relacionado, en algunos frutos, con un aumento de los ácidos grasos insaturados, ácido abscísico, escualeno o poliaminas. Este método se ha utilizado con éxito en pomelos, naranjas, limas y limones. La duración del acondicionamiento debe ser justo el que se requiere para producir el efecto deseado, ya que si se prolonga en exceso, puede ir en detrimento de la calidad de la fruta (Martínez- Jávega y col 1987). El acondicionamiento a temperaturas altas también reduce los síntomas causados por frío probablemente porque se produce la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs) y otras que podrían modificar las propiedades de las membranas celulares proporcionando la base de la tolerancia térmica. Este tipo de acondicionamiento a temperatura y humedad altas ayuda además a sanar las heridas reduciendo las pudriciones y puede llegar a ser beneficioso para la calidad del fruto (Martínez-Jávega, 1997). También se han obtenido buenos resultados en

cítricos y mango con la inmersión previa en agua caliente, probablemente con el mismo mecanismo de acción (Lurie 1998; Báez 1997).

En los tratamientos con calor es fundamental la relación tiempo– temperatura ya que se pueden producir lesiones térmicas. El calentamiento intermitente es otra de las técnicas alternativas para reducir los síntomas de daño por frío que se apoya en la teoría anteriormente expuesta de los desequilibrios reversibles ante el estrés al frío. Este método implica la fluctuación de la temperatura de almacenamiento desde valores bajos a altos y posteriormente, nuevamente a bajos, una o más veces, durante varios períodos de tiempo. Este incremento de la temperatura sobre el punto crítico de daño durante la frigoconservación, puede permitir al tejido recuperarse de la condición de estrés, o por el contrario, acelerar los procesos de degradación, en función del estado de la lesión (Hatton 1990). Diversos reportes han demostrado que el calentamiento intermitente es una estrategia efectiva en la reducción del daño en frutos como pomelos, naranja, mandarina y limón (Martínez-Jávega y Cuquerella 1984; Martínez-Jávega y col 1987; 1991; 1992).

Los primeros reportes del uso de tratamientos hidrotérmicos fueron en 1922 para el control de la pudrición de cítricos (Fawcett, 1992) pero su uso se ha extendido para desinfección de insectos (Lurie 1998). Los efectos benéficos del uso de un tratamiento hidrotérmico (TH) previo al almacenamiento para prevenir el desarrollo de pudriciones han sido demostrados en numerosos frutos, hortalizas y flores subtropicales y tropicales (Hara y col 1996; Luire 1998; Schirra 2000). Este tratamiento tiene un gran número de ventajas que incluyen una relativa facilidad de uso, corto tiempo de tratamiento, un control fiable de los frutos y de las temperaturas del agua, bajo costo de esta tecnología y la eliminación de agentes causantes de

podriciones (Couey 1989; Jordan 1993; Lurie 1998). Sin embargo, las respuestas fisiológicas de las diferentes variedades de frutos a los tratamientos térmicos pueden variar dependiendo la temporada y el lugar de crecimiento (Shellie y Mangan 1994; Hara y col 1996; Schirra y col 1997). La razón por esta variación en respuesta entre las diferentes regiones de producción podría surgir de diferencias en clima, tipo de suelo, temporada, prácticas de producción y el estado de madurez del fruto en la cosecha (Schirra y col 1997; Jacobi y col 2001a). Los dos tipos principales de tratamientos hidrotérmicos son inmersión en agua caliente y lavado y cepillado con agua caliente (Fallik 2004).

La inmersión en agua con fines de cuarentena consiste generalmente en sumergir el fruto en agua a 43-49°C por varios minutos o hasta dos horas, dependiendo del tamaño del fruto, por lo que mientras más grande sea el fruto, mayor será el tiempo de exposición requerida (Jacobi y col 2001b; Shellie y Mangan 2002). Este tratamiento provee una garantía de cuarentena del nivel Probit 9 (99.9683%) contra la mosca mexicana *Anastrepha ludens* sin afectar adversamente la calidad del fruto. Para mango, Jacobi y col (2001 ab) recomiendan un tratamiento para fines de cuarentena de 43-49 °C por 60-90 min.

En general, los tratamientos térmicos pueden inhibir rutas bioquímicas involucradas en maduración y otros procesos en varias frutas y hortalizas (Paull y Chen 2000). Se ha observado que los tratamientos térmicos también pueden inhibir el desarrollo del DF y daño externo de la cascara durante el almacenamiento y comercialización (Paull y Chen 2000). El efecto de tratamientos hidrotérmicos poscosecha en DF e inducción de poliamina (PA) se investigó en tejido de flavedo de mandarina (*Citrus reticulata*, Blanco, cv. "Fortune") por Gonzales-Aguilar y col

(1997). Después de 45 días a 2°C, la mayor reducción en DF se encontró en frutos sumergidos por 6 min a 47°C o 3 min a 53°C. Sin embargo, los investigadores concluyeron que el cambio de patrón en el contenido de PA no se relaciona con la tolerancia inducida al frío por el tratamiento hidrotérmico.

El tratamiento de 53 °C por 3 min aumentó la actividad de la catalasa (CAT) en mandarinas “Fortune”, pero después de ser retiradas de las altas temperaturas y transferidas a almacenamiento en frío se observó un descenso en la actividad de CAT que se asoció con el incremento de DF. La efectividad diferente de estos tratamientos térmicos podría estar relacionada con la inducción de la actividad de CAT durante el calentamiento y su persistencia durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Sala y Lafuente 2000). También se encontró que el TH de chiles a 53 °C por 4 min fue efectivo en aliviar el DF después de almacenamiento de 4 semanas a 8 °C (González- Aguilar y col 2000).

Yimyong y col (2011) investigaron los cambios metabólicos en fruto de mango cv. Okrong con TH y almacenados a bajas temperaturas. Frutos verde-maduro tratados con agua caliente ( $50 \pm 1^\circ\text{C}$ ) o ambiente ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 10 min se almacenaron a 8 o 12 °C por 15 días, seguido de un almacenamiento a temperatura ambiente ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 5 días. Se observó que la velocidad de producción de etileno se redujo significativamente por el TH durante el almacenamiento en frío y la maduración en todos los tratamientos. El TH incrementó la actividad de catalasa, suprimió la actividad de ascorbato peroxidasa, y no tuvo efecto en la actividad de la glutatión reductasa durante la fase de maduración pero mostró un efecto estimulador ligero durante el almacenamiento a bajas temperaturas. Los autores también observaron que el TH alteró los niveles de transcritos de genes de las enzimas

manganeso-superóxido dismutasa, pectato liasa,  $\beta$ -galactosidasa, y  $\beta$ -1,3-glucanasa, los cuales exhibieron incrementos durante el almacenamiento a bajas temperaturas. Los patrones de proteínas totales fueron alterados por todos los tratamientos durante el almacenamiento a bajas temperaturas (ABT) y en la maduración a temperatura ambiente, pero el TH disminuyó la pérdida de varias proteínas durante la etapa de maduración. Con los resultados obtenidos concluyeron que el TH incrementa el tiempo de almacenamiento del mango extendiendo su vida de anaquel a través de la regulación de un gran número de parámetros metabólicos; entre ellos un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y APX) y un incremento en los niveles de transcritos de hidrolasas de pared celular, a pesar de observar un muy pequeño cambio en la firmeza del fruto. El TH tuvo gran influencia en los patrones de proteína manteniendo sus niveles estables una vez que los frutos fueron a temperatura ambiente, por lo que ellos proponen que el TH ayuda al desdoblamiento de las proteínas ya existente y evita el doblamiento y la agregación de nuevas proteínas sintetizadas (Yimyong y col 2011).

Zhang y col (2012) evaluaron el efecto de un TH (55 °C, 10 min) sobre el DF, maduración y metabolismo de pared celular después del almacenamiento a 5 °C por 3 semanas, observando un proceso de maduración más rápido, indicado por mayores cambios en la firmeza, velocidad de respiración y producción de etileno en frutos tratados.

Zhu y col (2011) reportaron que dos tratamientos térmicos, uno con agua caliente (55°C, 3-5 min) y el otro con aire caliente (38°C, 12 h), indujeron tolerancia al frío en frutos de mango. La separación electroforética bidimensional de proteínas solubles mostró dos nuevos polipéptidos asociados con la inducción de tolerancia al

frío, aunque no está claro si estos polipéptidos son proteínas de choque térmico (Zhu y col 2003).

Recientemente, López-López y col (2018) estudiaron el efecto de un TH (46.1 °C, 70-90 min) en mango cv Keitt almacenado a 5°C por 20 días más un periodo de maduración de 7 días a 21°C. Los autores observaron que en comparación con los frutos control, los frutos de mango con TH presentaron una menor incidencia de síntomas lo cual se reflejó en un menor índice de daño por frío. También se observó que los frutos con TH presentaron una menor lixiviación de electrolitos y un menor contenido de MDA, mayor contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides, así como mayor actividad de enzimas antioxidantes, concluyendo que la tolerancia al daño por frío inducida por el TH está asociada con la activación del sistema antioxidante enzimático y no enzimático.

## **C PROTEÓMICA EN MANGO**

El término proteoma fue acuñado en 1994 para definir a todas las proteínas que son expresadas por un genoma en un tejido o en una célula. El proteoma de un organismo es un elemento altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimiento celular que se estudie y estos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en su ambiente, como situaciones de estrés, acción de fármacos, requerimientos energéticos, o su estado fisiológico (normal o patológico). La proteómica puede dividirse en proteómica de expresión, que tiene como objetivo la descripción del proteoma total de un tejido, fluido, tipo celular u organelo y las mediciones cuantitativas de los niveles de expresión proteínica, y proteómica funcional, que se encarga del estudio de la función de

proteínas dentro de sistemas biológicos (relaciona cambios de expresión con una función determinada) y la regulación de su expresión, incluyendo las interacciones proteína-proteína, proteínas-ADN, proteínas-ARN y las modificaciones posttraduccionales (Pando-Robles y Ferreira-Batista 2007). Representa una herramienta poderosa para caracterizar las redes bioquímicas y entender la fisiología molecular y el desarrollo del fruto (Palma y col 2011).

La información genómica en mango es limitada. Hasta noviembre del 2014 habían sido depositadas en el GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) 864 secuencias de nucleótidos, 1665 marcadores de secuencia expresadas (ESTs) y 279 proteínas de mango (*M. indica* Linn.). En años recientes, la tecnología de secuenciación (RNA-Seq) a gran escala de Illumina ha proporcionado una nueva puerta para identificar el nivel de expresión génica y de nuevos transcritos, y se ha convertido en una herramienta poderosa para especies donde falta información genómica de referencia (Hong-xia y col 2014). Sin embargo, la comparación entre los niveles de expresión de mRNA, cantidad de proteína y actividades enzimáticas ha mostrado una baja correlación, de manera que el análisis transcriptómico no es suficiente para entender la dinámica de las proteínas o la regulación bioquímica (Gibon y col 2006; Wienkoop y col 2008).

Se ha mostrado que ocurren cambios en la expresión y actividad de las enzimas involucradas en diferentes rutas metabólicas en respuesta a temperaturas bajas (Guy 1990; Hurry y col 1995). Martin (1987) considera que la regulación de los procesos metabólicos depende del control de la actividad enzimática, y uno de los mecanismos que regulan la actividad enzimática es la alteración de la concentración de enzima en la célula. Por tanto, en gran medida los niveles de expresión de

proteínas reflejan la actividad enzimática. La proteómica provee una evaluación directa de las proteínas involucradas en las rutas de respuesta al estrés y consecuentemente es un enlace valioso entre el enfoque fisiológico clásico y las herramientas moleculares (Renaut y col 2004).

La caracterización del genoma y proteoma del mango pudiera ayudar en el mejoramiento de los cultivos (Hong-xia y col 2014). Renuse y col (2012) analizaron la proteína de hoja de mango e identificaron 538 proteínas a través de LC-MS/MS combinado con búsquedas en la base de datos de ESTs derivados de mango basado en la identidad y homología de las secuencias. En el caso particular del fruto de mango, Andrade y col (2012) detectaron 373 proteínas e identificaron 47 proteínas expresadas diferencialmente entre frutos pre-climatéricos y climatéricos utilizando electroforesis bidimensional y la metodología de LC-MS; encontrando que algunas proteínas involucradas en la fijación de carbono y biosíntesis de hormonas eran menos abundantes en frutos climatéricos y proteínas relacionadas con procesos catabólicos, de respuesta a estrés y defensa se acumularon durante la maduración. Fasoli y Righetti en el 2013 realizaron un estudio proteómico en cascara y pulpa de mango donde lograron identificar más de 300 proteínas en cascara y en pulpa 2855. Llegaron a la conclusión de que las proteínas encontradas en cascara están relacionadas principalmente con procesos de defensa y formando parte de la estructura integral de la membrana plasmática teniendo un papel importante en la actividad de transferasa y en el transporte. En cambio las proteínas en pulpa están presentes en cloroplastos y núcleo y están relacionadas con las funciones metabólicas como la unión del grupo hemo, glucolisis, procesos metabólicos de los carbohidratos y de respuesta al estrés oxidativo. También reportaron una lista de

péptidos para ambos tejidos que no pudieron ser asignados a una proteína conocida debido a la falta de conocimiento del proteoma completo del mango. Se encontró una mayor cantidad de péptidos desconocidos en la cáscara que en la pulpa lo que corresponde con el menor número de proteínas identificadas en cascara en las bases de datos. Debido a que el proteoma del mango no se conoce en su totalidad, los autores compararon los datos con compuestos del mismo orden de planta (*Sapindales*) pertenecientes al mismo grupo taxonómico (*Plantae Manoliopsida*). Dentro de las proteínas que identificaron se encuentran proteínas de transferencia de lípidos no específicas, superóxido dismutasa, proteínas tipo germina y profilina. Las proteínas de transferencia de lípidos no específica transfieren fosfolípidos al igual que galactolípidos a través de la membrana, así que juega un papel importante en la deposición de cera y cutina en la pared celular de las células epidérmicas de expansión y algunos tejidos secretores. La superoxido dismutasa destruye radicales, los cuales son producidos normalmente dentro de las células y son tóxicos a los sistemas biológicos, por lo que está involucrada en la respuesta celular a diversos tipos de estrés como UV-B, iones cobre, intensidad de luz y salinidad. Finalmente, las proteínas de tipo germina juegan un papel en la resistencia a un amplio espectro de enfermedades y la profilina en la polimerización y despolimerización de la actina afectando la estructura del citoesqueleto.

A la fecha no se tiene registro de un perfil de proteínas expresadas diferencialmente en frutos de mango en respuesta al estrés por frío o bien que hayan sido sometidos a un tratamiento hidrotérmico previo y que pueda relacionarse con la tolerancia inducida al daño por frío. Sin embargo, existen estudios de este tipo en

otros frutos que demuestran la utilidad de la proteómica para entender las bases bioquímicas de este desorden.

Salazar-Salas y col (2017) estudiaron los cambios en acumulación de proteínas asociados con tolerancia al daño por frío inducida por el tratamiento hidrotérmico en tomate cv. Imperial observando una mayor acumulación de sHSPs, de enzimas antioxidantes como SOD, APX y TPx1, encargadas de la detoxificación de la célula y enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y energía, por lo que sugieren que la tolerancia inducida por el tratamiento hidrotérmico podría estar asociada principalmente al mantenimiento del estado redox y de la homeostasis celular a través de la inducción de proteínas de defensa de la planta.

## IV JUSTIFICACIÓN

El mango es un fruto tropical de gran importancia económica y nutricional a nivel mundial. México es uno de los principales países exportadores y se encuentra entre los primeros cinco países productores, mientras que Sinaloa se encuentra entre los diez principales estados productores de mango.

La refrigeración es un método efectivo para preservar la calidad de productos hortofrutícolas debido a sus efectos positivos sobre el metabolismo. Sin embargo, el mango al ser un fruto climatérico es susceptible al daño por frío (DF) afectando la calidad del fruto y disminuyendo su vida de anaquel. La aplicación de un tratamiento hidrotérmico previo al almacenamiento en frío ha resultado una buena estrategia para disminuir los efectos del DF en mango. Este tratamiento le confiere al fruto mayor tolerancia a las temperaturas bajas manteniendo así la calidad.

Sin embargo, el conocimiento sobre las bases bioquímicas y moleculares involucradas en la tolerancia generada es poco y existe muy poca información acerca de la expresión de proteínas en respuesta a las temperaturas bajas, así como la tolerancia inducida al DF. Por ello, en la presente investigación se estudiaron los cambios en el patrón de expresión de proteínas en mango almacenado a temperatura baja y tratado previamente con un tratamiento hidrotérmico en la idea de aportar información que favorezca un mejor entendimiento de los mecanismos por los cuales los frutos responden al estrés por bajas temperaturas a nivel bioquímico y molecular.

## **V OBJETIVOS**

### **A OBJETIVO GENERAL**

Identificar proteínas asociadas con la tolerancia inducida al daño por frío en mango cv Keitt tratado hidrotérmicamente.

### **B OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el índice de daño por frío en frutos de mango con y sin tratamiento hidrotérmico (TH) durante su almacenamiento a temperatura de daño por frío.
2. Evaluar parámetros fisiológicos (lixiviación de electrolitos y MDA) en frutos de mango con y sin TH almacenados a 5 °C para determinar su relación con la tolerancia inducida al daño por frío.
3. Separar proteínas expresadas diferencialmente en frutos de mango con y sin TH almacenados a temperatura de daño por frío.
4. Identificar por espectrometría de masas proteínas expresadas diferencialmente entre frutos de mango con y sin TH almacenados a temperatura de daño por frío.

## **VI MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A MATERIALES**

Se utilizaron frutos de mango cv Keitt obtenidos de huertos ubicados en la zona centro del estado de Sinaloa, los cuales fueron seleccionados en estado de madurez comercial. Los frutos se llevaron al laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas donde se lavaron con jabón y se sumergieron en hipoclorito de sodio (200 ppm) por 3 min; transcurrido el tiempo se hizo una segunda selección para descartar aquellos frutos que presentaran algún defecto o daño. Posteriormente, se dividieron en dos lotes: un lote fue considerado el control (sin tratamiento hidrotérmico) y el otro recibió un tratamiento hidrotérmico (descrito más adelante). Ambos se almacenaron por 20 días a 5°C, con retiros cada 10 días para un segundo almacenamiento por 7 días a 21 °C.

### **B MÉTODOS**

#### **1 Aplicación del tratamiento hidrotérmico**

El tratamiento hidrotérmico se aplicó tomando como base las condiciones establecidas para los tratamientos cuarentenarios aprobados para el control de plagas de la fruta (USDA 2016). Los frutos se sumergieron en un baño de acero inoxidable que contenía agua a una temperatura de 46.1 °C durante un tiempo de 90 min (501-700g) ó 110 min (701-900g). Posteriormente, fueron enfriados a 25 °C durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de humedad utilizando toallas de papel.

## **2 Índice de daño por frío**

La evaluación del DF se realizó después de 10 y 20 días a 5°C más 7 días a 21°C de acuerdo a lo reportado por Salazar-Salas y col (2017) con algunas modificaciones. Los síntomas considerados fueron: coloración no uniforme, marchitez, picado superficial y áreas necróticas. El nivel de daño (ND) de cada síntoma se evaluó de manera visual tomando una escala de 5 puntos, donde 0=no daño, 1= 1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4≥76%. El promedio del grado de daño para cada síntoma fue expresado como índice de DF utilizando la siguiente expresión:

$$\text{IDF} = \frac{\text{SUM (ND)} \times \text{Número de frutos con ese ND}}{\text{Número total de frutos en la réplica.}}$$

## **3 Lixiviación de electrolitos**

La evaluación de lixiviación se realizó siguiendo la metodología reportada por Campos y col (2003). Se tomaron 30 discos (0.05 cm<sup>2</sup>) de cáscara de mango, obtenidos con ayuda de un sacabocados, los cuales fueron lavados con agua desionizada. Se cubrieron con 30 mL de manitol 0.3 M y se colocaron en agitación por 1 h a 350 rpm. Se midió la conductividad de la solución a 25°C con un conductímetro antes y después de colocarse en una autoclave a 120°C por 30 min, esto para liberar todos los electrolitos. La lixiviación se expresó como porcentaje electrolitos totales.

## **4 Contenido de malondialdehído (MDA)**

Para la determinación de la peroxidación de lípidos se evaluó el contenido de MDA y se utilizó la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA) de acuerdo a lo reportado

por Hodges (1999) con algunas modificaciones. Se homogenizó 1 g de tejido congelado en una mezcla de etanol:agua en una relación 80:20 (v:v) y se centrifugó a 3000 g (Eppendorf, Mod 5804 R, USA ) durante 10 min. Se tomaron dos alícuotas de 1 mL del sobrenadante, una de ellas se combinó con 1 mL de una solución de ácido tricloroacético 20% (p/v) y 0.01 de hidroxitolueno butilado, y a la otra alícuota se le añadió 1 mL de una solución de ácido tricloroacético 20% (p/v), 0.01% de hidroxitolueno butilado y TBA 0.65%. Posteriormente, las muestras fueron agitadas vigorosamente e incubadas a 95 °C por 25 min, se enfriaron y centrifugaron a 3000 g por 10 min. Se registró la absorbancia de las muestras a 440, 532 y 600 nm. Los equivalentes de MDA fueron calculados de la siguiente manera:

$$1) A = [(Abs\ 532_{+TBA}) - (Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})]$$

$$2) B = [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) 0.0571]$$

$$3) \text{Equivalentes de MDA (nmol} \cdot \text{mL}^{-1}) = (A - B / 157,000) 10^6$$

Los equivalentes de MDA se expresaron como nmol de MDA / g de ff.

## 5 Extracción de proteínas

La cáscara de mango almacenada a -70 °C se molió con ayuda de un mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Salazar-Salas y col (2017) con algunas modificaciones. Previo a la extracción, se realizaron lavados para eliminar compuestos que pudieran acomplejarse con las proteínas e impedir su solubilización. Primeramente se homogeneizaron 8 g de cáscara molida con 10 mL de ácido tricloroacético al 10% (p:v) en acetona con DTT 40mM durante 5 min, posteriormente se centrifugó (11,000 g, 4 °C, 15 min) y se retiró el sobrenadante;

este lavado se realizó 10 veces. Posteriormente se lavó con acetato de amonio 0.1 M en metanol al 80% y acetona al 80%. Finalmente, la muestra se transfirió a tubos de 2 mL y se secó a temperatura ambiente hasta eliminar los residuos de los solventes para realizar la extracción de proteínas.

Las proteínas fueron extraídas con una mezcla fenol: amortiguador SDS (Sacarosa 30%, SDS 2%, Tris-HCL 0.1 M pH 8.0 y 2-Mercaptoetanol 5%) en una relación 1:1. La mezcla se centrifugó a 15 000 g durante 12 min para separar la fase fenólica, de la cual se precipitaron las proteínas con 5 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol a -20 °C durante 30 min. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 15 000 g durante 12 min; la pastilla se lavó con metanol y acetona al 80% y se dejó secar para eliminar los residuos de los solventes.

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). En la primera dimensión, las proteínas se separaron en función de sus puntos isoeléctricos (isoelectroenfoque), mientras que en la segunda dimensión se separaron en función del tamaño (SDS-PAGE). Para la primera dimensión, las proteínas se resuspendieron en amortiguador de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2%, DTT 10 mM, Anfolitas pH 3-10 1%, Azul de bromofenol 0.001%). Se cargaron 500 µg de proteína en tiras de pH inmovilizado de 17 cm en un rango de pH de 5-8 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La muestra se cargó en el gel por rehidratación del mismo durante toda la noche y la separación se realizó en un sistema Protean IEF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando las condiciones de voltaje y tiempo recomendadas por el proveedor (250 V, 20 min; 10 000 V, 2.5 h; 10 000 V, 40 000 V). Previo a la segunda dimensión, las proteínas fueron reducidas con DTT 130 mM en Tris-HCl 0.375 mM pH 8.8, Urea 6

M, Glicerol 20%, SDS 2% con agitación durante 15 min, y alquiladas con Iodoacetamina 135 mM en Tris-HCl 0.375 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 20%, SDS 2% durante 15 min. Las tiras se colocaron en la parte superior de un gel de acrilamida al 12.5 % y la separación se realizó en Tris 25 mM pH 8.3, Glicina 192 mM y SDS 0.1% a corriente constante (40 mA) durante aproximadamente 14 h. Los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomassie al 0.1% en metanol 40% y ácido acético 10%. Posteriormente se destiñeron con metanol-ácido acético-agua (40:10:50 y 7:10:83). Las imágenes de los geles se obtuvieron con un sistema de fotodocumentación ChemicDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las diferencias cuali y cuantitativas se analizaron por medio del programa PDQuest (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La separación y análisis se realizó por triplicado.

## **6 Identificación de proteínas**

Las proteínas expresadas diferencialmente entre las muestras se identificaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los geles se lavaron para eliminar exceso de colorante azul de Coomassie y posteriormente las proteínas fueron escindidas utilizando una punta de pipeta. El gel removido se sometió a una serie de lavados con acetonitrilo para eliminar el colorante y se secó a vacío; posteriormente se rehidrató con 45  $\mu$ L de una solución de digestión [5  $\mu$ L de una solución de tripsina [0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L (Promega, Madison, WI, EUA)] más 40  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM] y se incubó a 37 °C durante aproximadamente 18 h. Los péptidos fueron concentrados y desalados utilizando puntas conteniendo resina tipo C18 en la punta (Zip-tip, Milipore, Billerica, MA, EUA). La mezcla de péptidos se analizó con un sistema LC/MS acoplado con un espectro de masas con trampa de iones (LTQ-XL, Thermo

Scientific, San Jose, CA, EUA) utilizando una fuente de iones NanoSpray (3.0 kV). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna capilar de fase reversa usando un gradiente de 5-80% de acetonitrilo durante 120 min. La adquisición de los espectros de masas se realizó con el programa Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific, San José, CA, EUA) en un rango de masa-carga ( $m/z$ ) de 300–2000, y los iones más intensos se fragmentaron por disociación inducida por colisión (CID, del inglés Collision Induced Dissociation). Los datos se analizaron con el programa Proteome Discoverer 1.3 usando el algoritmo SEQuest contra una base de datos referenciada. Los parámetros de búsqueda para modificaciones fueron los siguientes: Cisteína carbamidometilada como fija y oxidación de Metionina como variable. El espectro MS/MS proporcionó información parcial de la secuencia de los péptidos y éstos fueron comparados con secuencias de proteínas en las bases de datos.

## **7 Análisis estadístico**

Las evaluaciones se realizaron por triplicado y los resultados de las características evaluadas se analizaron mediante un ANOVA bifactorial, tomando como factores el tratamiento (control y TH) y las condiciones de almacenamiento (0, 10, 20 a 5°C y 20+7 a 21°C). Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Fisher (LSD) con un  $\alpha=0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa STATGRAPHICS Centurión versión 15.2.06 (Stat Point Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA).

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

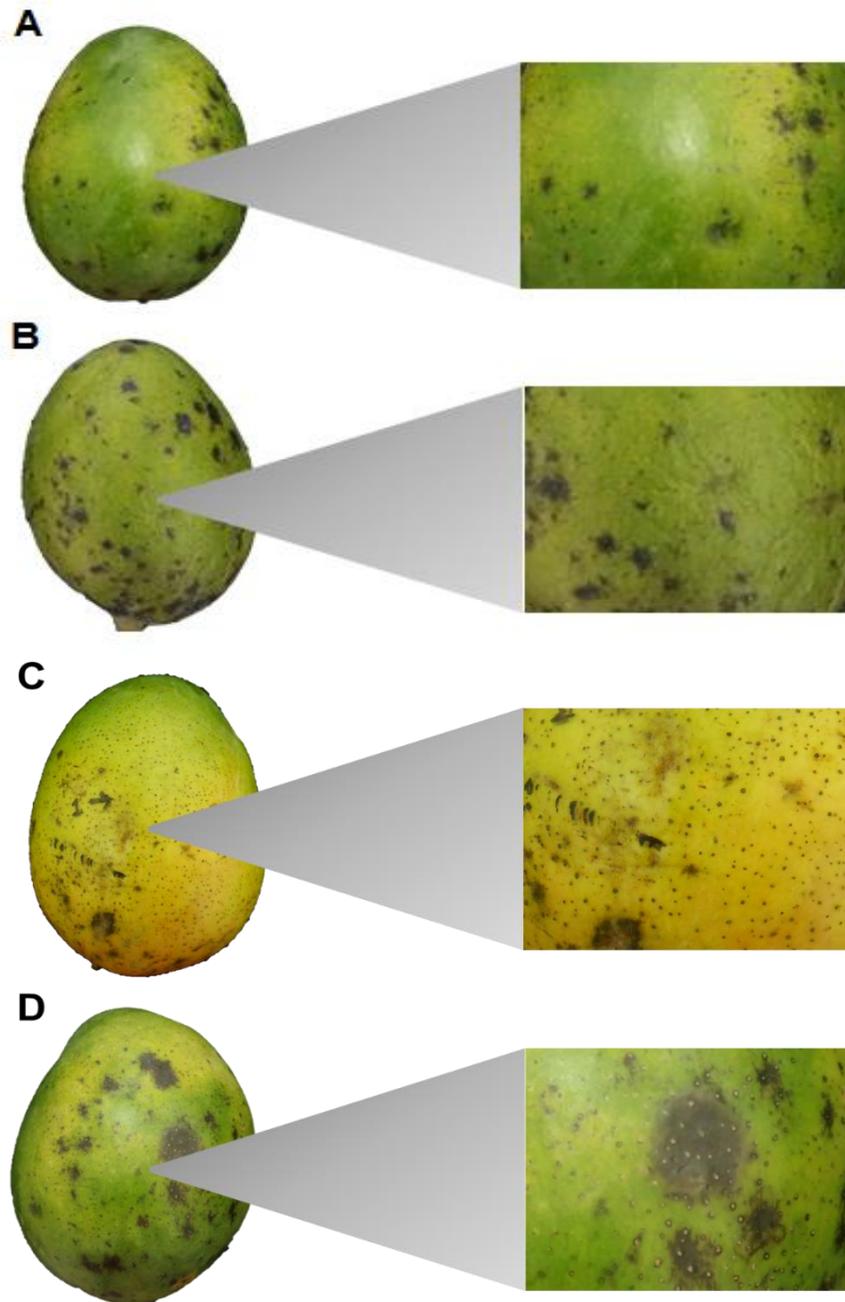
### A ÍNDICE DE DAÑO POR FRÍO

El índice de daño por frío (IDF) fue evaluado después de 10 y 20 días de almacenamiento a 5°C y después de un periodo de maduración de 7 días a 21°C. Los principales síntomas observados fueron desarrollo de color no uniforme, marchitez, picado superficial y áreas necróticas (**Figura 4**). El síntoma de coloración no uniforme fue el primero en manifestarse en el almacenamiento en frío a partir del día 10, mientras que los síntomas de picado superficial, marchitez y áreas necróticas se manifestaron hasta el día 20 en frío, siendo en todos los casos mayor en los frutos control y aumentando la severidad de los síntomas cuando estos se trasladaron a la etapa de maduración a temperatura de 21°C (**Figura 5**).

#### 1 Coloración no uniforme

Uno de los efectos que tiene el DF es inhibir la biosíntesis y producción de etileno lo que provoca que el fruto de mango no pueda madurar de manera regular (Nair y col 2004); así mismo, disminuye la amarillez de la cáscara y pulpa lo cual puede estar relacionado con una menor formación de carotenoides (Cantre y col 2017).

En el **Cuadro 4** se puede observar que se presentó un aumento en el desarrollo de la coloración no uniforme de los frutos con respecto a los días de almacenamiento en frío tanto en los frutos control como los tratados hidrotérmicamente (TH). Después del día 10 de almacenamiento a 5 °C hubo un incremento en la severidad de este síntoma observándose diferencias significativas



**Figura 4.** Principales síntomas de daño por frío en mangos cv. Keitt. **A:** Coloración no uniforme; **B:** Marchitez; **C:** Picadura superficial; **D:** Áreas necróticas

Día	CONTROL	TH
0		
10		
20		
20 + 7d a 21°C	data-bbox="251 658 511 821"/>	

**Figura 5.** Cambios en apariencia y maduración de frutos de mango con y sin tratamiento hidrotérmico durante el almacenamiento a 5°C durante 20 días, más un periodo de maduración de 7 días a 21°C.

**Cuadro 4.** Efecto del almacenamiento y tratamiento hidrotérmico en los síntomas de daño por frío de cáscara de mango cv Keitt almacenado a bajas temperaturas.

Síntoma	Tratamiento	Condición de Almacenamiento		
		10 d a 5 °C	20 d at 5 °C	20 d a 5°C + 7d a 21°C
Coloración no uniforme	Control	0.80 ± 0.0 <sup>Ba</sup>	1.30 ± 0.23 <sup>Aa</sup>	1.93± 0.61 <sup>Aa</sup>
	TH	0.47 ± 0.12 <sup>Ba</sup>	0.60 ± 0.35 <sup>ABb</sup>	1.00± 0.20 <sup>Ab</sup>
Marchitez	Control	0.07 ± 0.12 <sup>Ba</sup>	0.60 ± 0.0 <sup>Aa</sup>	0.73± 0.11 <sup>Aa</sup>
	TH	0.0 <sup>Ba</sup>	0.0 <sup>Bb</sup>	0.47± 0.11 <sup>Ab</sup>
Picado superficial	Control	0.0 <sup>Ca</sup>	0.80 ± 0.20 <sup>Ba</sup>	1.27± 0.20 <sup>Aa</sup>
	TH	0.0 <sup>Ca</sup>	0.27 ± 0.11 <sup>Bb</sup>	0.73± 0.23 <sup>Ab</sup>
Áreas necróticas	Control	0.0 <sup>Aa</sup>	0.0 <sup>Aa</sup>	1.60 ± 0.11 <sup>Ba</sup>
	TH	0.0 <sup>Aa</sup>	0.0 <sup>Aa</sup>	0.67 ± 0.11 <sup>Bb</sup>

El Índice de Daño por Frío (IDF) fue calculado para cada síntoma como se menciona en la sección de materiales y métodos. Los valores son el promedio ± la desviación estándar de tres réplicas. Letras mayúsculas diferentes en una sola fila indican diferencia significativa entre condiciones de almacenamiento y letras minúsculas diferentes para cada condición de almacenamiento indican diferencia significativa entre frutos control y con TH (Fisher,  $\alpha = 0.05$ ).

entre los frutos control y TH a los 20 días a 5 °C y 20 días a 5 °C +7 días de maduración; los frutos con TH presentaron una coloración más uniforme (**Figura 5**), lo que sugiere una maduración más uniforme.

Los resultados del presente estudio son similares a los reportados por Sivankalyani y col (2016b) en mango cv Keitt, donde frutos almacenados a 5 y 8°C mostraron un retardo en el cambio de color con respecto a los frutos almacenados a 12 y 18°C, lo cual sugiere que el almacenamiento a bajas temperaturas retrasa el proceso de maduración del fruto que conduce a una coloración no uniforme. Así mismo, son consistentes con diversos reportes para otros cultivares de mango (Gonzalez-Aguilar y col 2001; Wang y col 2008).

Se ha reportado que el tratamiento hidrotérmico acelera el proceso de maduración en comparación con otros tratamientos. Dang y col (2008) observaron que frutos de mango tratados hidrotérmicamente previo a un almacenamiento en frío presentaron un mejor desarrollo de color. Los tratamientos térmicos aceleran el desarrollo de color amarillo en la cáscara y en algunos casos mejorara la uniformidad en el desarrollo del color, lo cual puede ser atribuido a la degradación acelerada de la clorofila y una acelerada síntesis de carotenoides (Jacobi y col 2001b).

## **2 Marchitez**

El síntoma de marchitez en los frutos de mango almacenados a baja temperatura se presentó hasta el día 20 de almacenamiento a 5°C, apareciendo solamente en los frutos control. Sin embargo, este síntoma se presentó en ambos lotes (control y TH) después del periodo de maduración a 21 °C, aunque el daño fue significativamente mayor en los frutos control con respecto a los tratados (**Cuadro 5**).

La marchitez o pérdida de agua ha sido considerado como un síntoma de DF en frutos de mango. El estudio realizado por Cantre y col (2017) confirmó la presencia de salida de agua intracelular en tejido dañado por frío observando que las células de frutos de mango con DF eran puntiagudas y menos esféricas comparado con frutos no dañados, el cual es un indicador de lixiviación celular. Esta lixiviación de agua intracelular contribuyó a la disminución en porosidad y conectividad de los poros durante el desarrollo de DF, lo cual afectó el intercambio de gases en el fruto aumentando de manera drástica en frutos dañados. De igual manera reportan que la salida de agua pudo ayudar a la formación de cavidades en el mesocarpio exterior, cerca de la cáscara, incrementando la disponibilidad del agua libre la cual pudo fluir fácilmente entre poros más pequeños por capilaridad, difundirse y evaporarse en la superficie del fruto creando cavidades aún más grandes en el mesocarpio.

Lo crítico de la presencia de este síntoma es que provoca de forma directa la aparición de otro síntoma como lo es el oscurecimiento de la cáscara, ya que el agua libre que viaja a través de los capilares y se evapora en la superficie del fruto puede contener compuestos fenólicos (Agillon y Lizada 2010), los cuales pueden causar reacciones de oscurecimiento con polifenoloxidasas en cáscara.

En los resultados obtenidos en este estudio se puede ver que el TH puede estar creando un efecto protector ante este síntoma manteniendo la integridad de la membrana y pared celular impidiendo así la salida de agua intracelular evitando la marchitez del fruto.

### 3 Picado superficial

Una de las alteraciones más notables asociadas con el DF es el efecto que tiene sobre la apariencia externa del fruto lo cual incluye daño en la superficie del fruto, entre ellos el picado (Fernández- Trujillo y col 2006). Cuando el síntoma de picado es visible, la pudrición por el DF es irreversible.

En el **Cuadro 5** se muestra el desarrollo del síntoma de picado superficial entre los frutos control y tratados hidrotérmicamente con respecto a los días de almacenamiento en frío. Este síntoma se hizo visible solamente en frutos control después de 20 días a 5°C; mientras que en la etapa de maduración se pudo observar en ambos tratamientos, siendo significativamente menor en frutos con TH.

En frutos como pepino el picado superficial es el síntoma principal de DF. Zhao y col (2014) realizaron un análisis estructural del daño y encontraron que éste está asociado a grietas en la cutícula y con el hundimiento de las células epidérmicas cercanas a los estomas, los cuales en conjunto llevan a un aumento en la velocidad de respiración, así como en pudriciones debido al crecimiento de hongos necrotróficos (Fernández- Trujillo 2006; Tatsumi y col 1987). En cuanto al fruto calabacín se mostró mediante un análisis microscópico que el picado superficial es causado por la muerte celular y el colapso de la célula, asociados con la solubilización de la pectina y la degradación de la pared celular (Carvajal y col 2015).

Los resultados del presente estudio muestran el efecto protector que tiene el tratamiento hidrotérmico sobre este síntoma de DF, el cual puede estar previniendo la deterioración de la membrana celular y mejorando el estado antioxidante de los frutos pre-tratados (Yi-Wang 1994; Wang y col 2013; Carvajal y col 2015),

disminuyendo y retardando así la aparición del picado superficial en los frutos de mango.

#### **4 Áreas necróticas o pudrición**

Uno de los síntomas más severos del DF en mango es la aparición de áreas necróticas o pudriciones. El aumento en la susceptibilidad a las pudriciones debido al DF ha sido observado previamente en varios frutos, y se ha relacionado con la debilidad del tejido y un incremento de la penetración de patógenos (Lyons 1973).

Al igual que en el síntoma de marchitez la aparición de áreas necróticas fue hasta el día 20 de almacenamiento a 5°C y solamente en frutos control. En el periodo de maduración hubo un incremento de las áreas necróticas de hasta 3 veces en el caso de los frutos control presentándose un nivel de daño de un 25 hasta 50% de la superficie del fruto, mientras que en frutos con TH fueron pocos los que presentaron dicho síntoma siendo menor del 25% de la superficie del fruto, observándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el día 20 y 20+7 entre frutos control y con TH. Esto puede deberse a que durante el almacenamiento a temperaturas de DF hay un incremento en la aparición de manchas rojas y negras, las cuales fueron correlacionados con la acumulación de pudrición en la cascara, sugiriendo que estas aperturas en la cutícula del fruto son los sitios en donde se favorece la penetración y ataque de patógenos fúngicos (Sivalyankani y col 2016).

Como se mencionó, la salida de los contenidos celulares resulta en un cambio drástico en la microestructura de la célula principalmente en la red de poros lo cual afecta la aireación normal del tejido y el metabolismo del fruto (Cantre y col 2017). Como consecuencia, estos cambios facilitan una cascada de reacciones bioquímicas, lo que lleva a un oscurecimiento (Chidtragool y col 2011; Vela y col

2003), oxidación de lípidos (Zhao y col 2009), y deterioración de la membrana (Marangoni y col 1996). Estas reacciones aceleran la senescencia de los frutos las cuales se pueden observar como áreas necróticas y pudriciones. Yimyong y col (2011) mostraron como el TH en mango tuvo una gran influencia en varios procesos metabólicos, incluyendo procesos oxidativos, cambios en la pared celular y el mantenimiento de los niveles de proteína y ARN durante el almacenamiento en frío y durante la maduración. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que el TH altera de manera significativa los procesos metabólicos probablemente mejorando así el mantenimiento de la homeostasis celular; este efecto podría extender la vida de anaquel de los frutos tratados después de ser transferidos del almacenamiento a temperaturas bajas a temperatura de maduración.

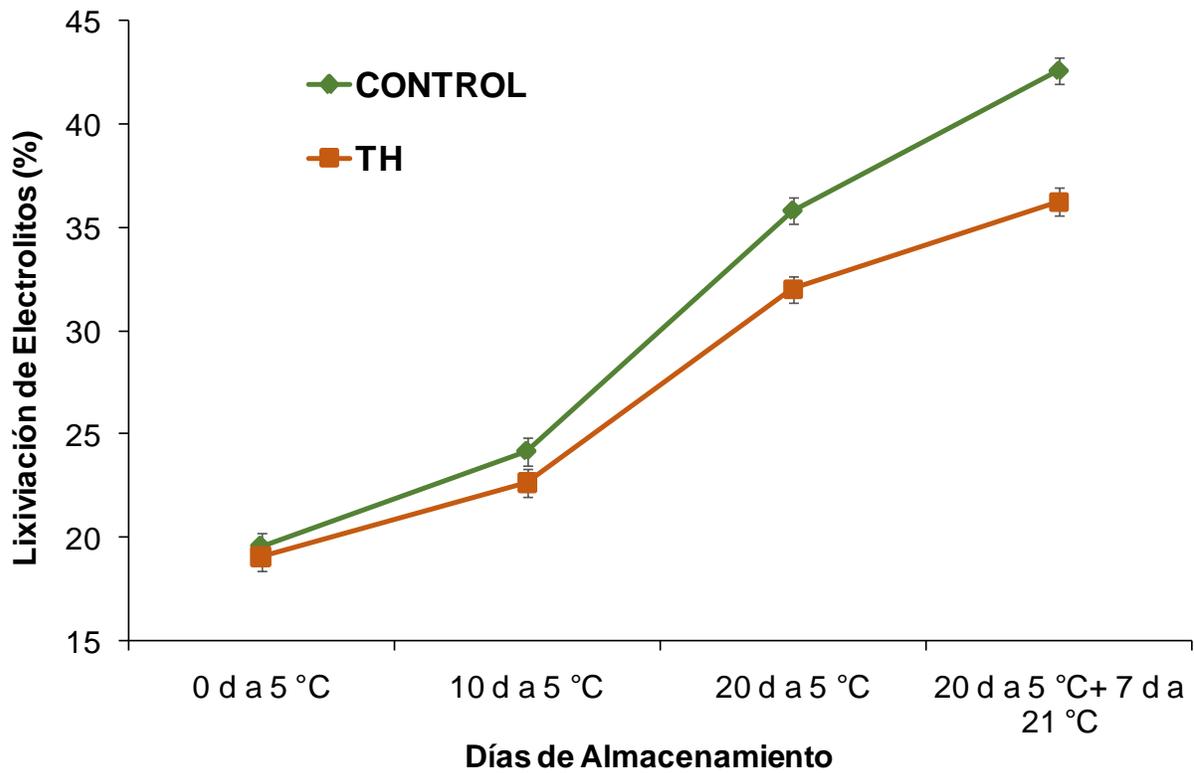
## **B CAMBIOS EN PARÁMETROS RELACIONADOS CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO**

### **1 Lixiviación de electrolitos**

Durante la maduración y el daño por frío hay cambios en la integridad y permeabilidad de la membrana celular (Lacan y Baccou 1996). La lixiviación de contenidos celulares se ha utilizado como un indicador de la permeabilidad de la membrana durante procesos como la maduración, senescencia o daño por frío (King y Kudford 1983; Fuchs y col 1989; McCollum y McDonald 1993; Hakin y col 1995). Por tanto, el analizar los cambios en la lixiviación de electrolitos puede ser útil para determinar los efectos tanto de las temperaturas de daño por frío como el tratamiento hidrotérmico en frutos de mango.

En la **Figura 6** se muestran los valores obtenidos para lixiviación de electrolitos en los frutos de mango almacenados a temperatura de DF (5°C) durante 20 días más un periodo de 7 días de almacenamiento a temperatura de maduración (21°C). Como se puede observar en el gráfico, la lixiviación de electrolitos fue aumentando respecto a los días de almacenamiento en frío (5°C). Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos a partir del día 10 y se mantuvo durante el almacenamiento en frío y la etapa de maduración, siendo menor en frutos tratados hidrotérmicamente. Esto puede deberse a que el estrés por frío puede aumentar la permeabilidad de las membranas de los frutos de mango permitiendo la fuga de electrolitos. Aun cuando los síntomas no fueron visibles hasta los 20 días de almacenamiento en frío y después de la etapa de maduración a 21 °C, durante el estrés por frío se genera una respuesta primaria que involucra la disminución de la fluidez de los microdominios de las membranas celulares, lo cual puede dañar proteínas de membrana importantes resultando en un incremento en la rigidez. Estos cambios en la estructura de la membrana están asociados con la pérdida de la compartimentalización celular y con un incremento en la lixiviación de electrolitos.

Este comportamiento ha sido observado previamente en frutos de tomate cv Imperial y Micro-Tom (Salazar-Salas y col 2017; Malacrida y col 2006; Cruz-Mendivil 2015). Recientemente, López-López y col (2018) trataron hidrotérmicamente al fruto de mango cv Keitt bajo las mismas condiciones y observaron el mismo comportamiento, una menor lixiviación de electrolitos en frutos tratados con respecto a los frutos control encontrando diferencias significativas a partir del día 10 a 5°C y manteniéndose esta diferencia después de 20 días a 5 °C y en la etapa de



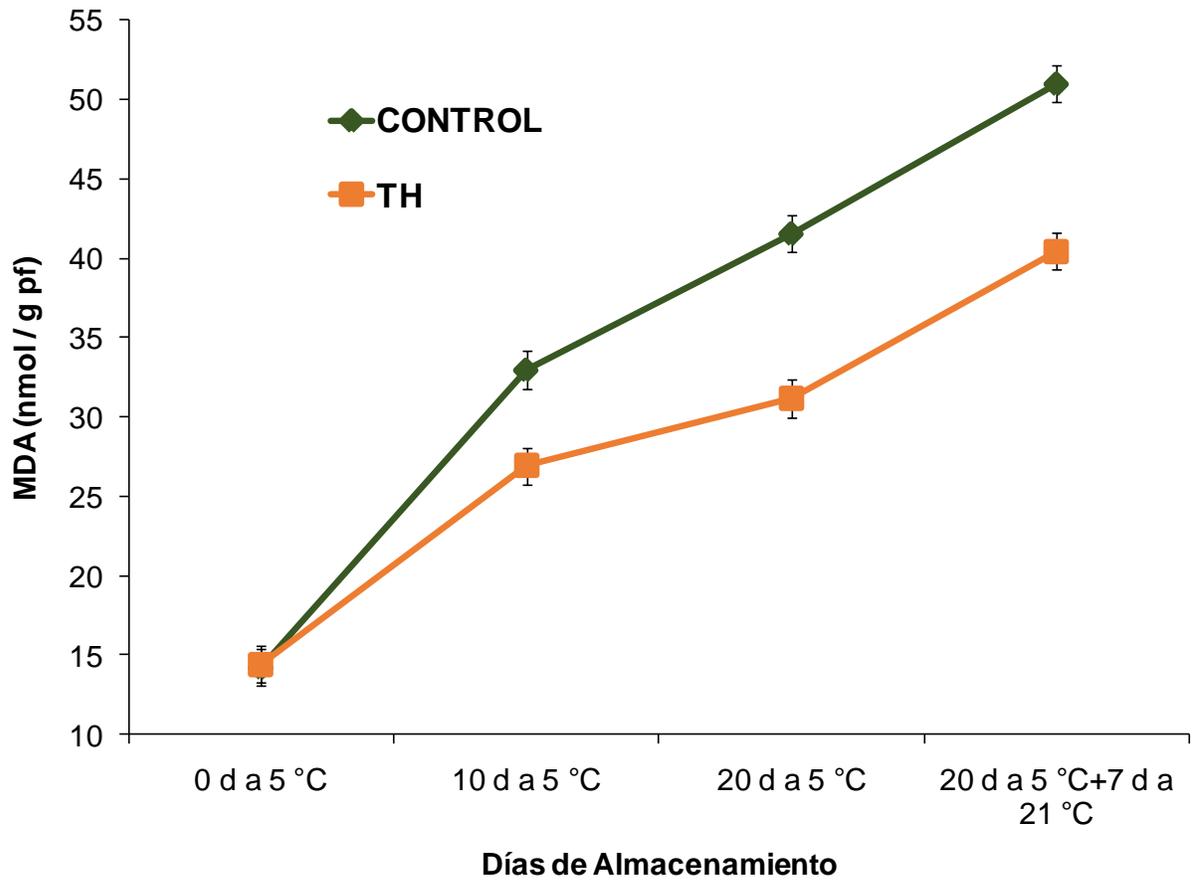
**Figura 6.** Lixiviación de electrolitos en frutos de mango almacenados hasta 20 días a 5°C, más un periodo de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD = 1.312 ( $\alpha=0.05$ ).

maduración. La mejora en la tolerancia del fruto al estrés por frío como fue reportado por McCollum y col (1993) en mangos precalentados con aire a 38°C por 48 h. En el presente estudio la tolerancia generada por el tratamiento hidrotérmico puede ser observada por los niveles menores de lixiviación obtenidos, lo cual pudiera estar relacionado con una menor permeabilidad de la membrana. Resultados similares fueron observados por Midehghan y col (2007) al tratar hidrotérmicamente frutos de granada y almacenarlos en frío. La menor lixiviación de electrolitos en frutos tratados se correlacionó con una mayor proporción de lípidos insaturados/saturados encontrados en estos frutos con respecto al control. El incremento en el grado de insaturación, lo cual ha sido reportado como mecanismo de aclimatación a bajas temperaturas (Stanley 1991; Campos y col 2003), podría estar ayudando al mantenimiento de la fluidez de la membrana a bajas temperaturas, resultando en un menor escape de electrolitos.

## **2 Contenido de malondialdehído (MDA)**

El estrés oxidativo inducido por el DF incrementa la producción de EROs como anión superóxido, peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilo, óxido nítrico y peroxinitrato, los cuales reaccionan con los lípidos de membrana, induciendo la peroxidación, lo que lleva a la degradación de la misma. El malondialdehído es un producto de la peroxidación de lípidos, y es utilizado como indicador de estrés en algunos tejidos (Parkin y col 1989).

En la **Figura 7** se muestran los valores obtenidos para el contenido de MDA. El almacenamiento a temperatura baja ocasionó un aumento en el contenido conforme transcurrieron los días de almacenamiento en frío, observándose



**Figura 7.** Contenido de MDA en frutos de mango almacenados hasta 20 días a 5°C, más un periodo de maduración de 7 días a 21°C. Las barras verticales indican LSD = 1.312 ( $\alpha=0.05$ ).

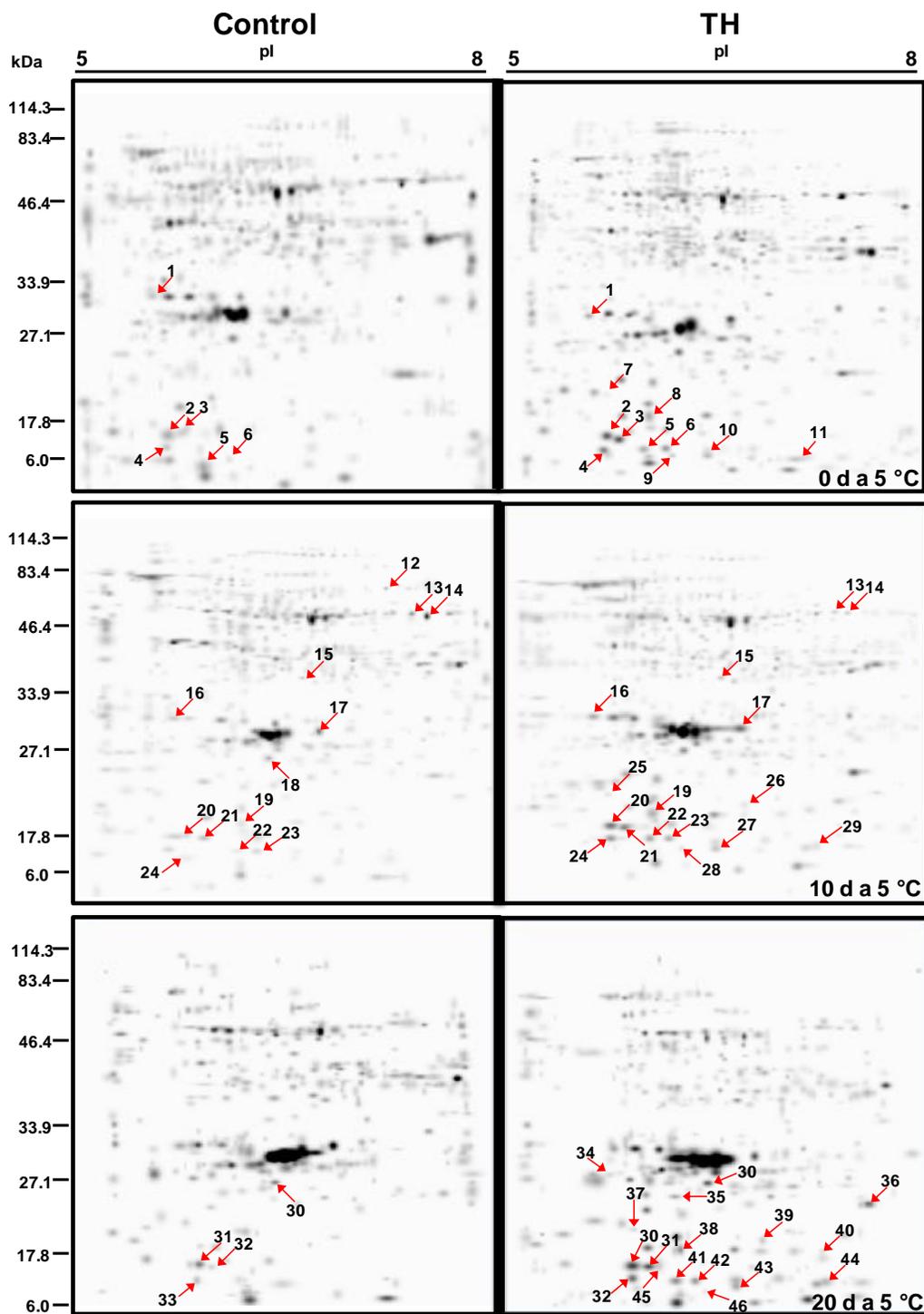
diferencias significativas a partir del día 10 de almacenamiento a baja temperatura y durante la etapa de maduración. Esto ha sido observado previamente en cáscara de mango Keitt por Sivankalyani y col (2016b), reportando una mayor acumulación de MDA a partir del día 7 a 5°C, aumentando de manera gradual a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento en frío. Los frutos sometidos al TH presentaron valores de MDA significativamente ( $p < 0.05$ ) menores que los no tratados. Estos resultados son consistentes con los reportados por López-López y col (2018) para cáscara de frutos de mango cv Keitt tratados hidrotérmicamente, lo cual relacionaron con un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, APX y CAT que podrían estar reduciendo las especies reactivas de oxígeno e impidiendo su interacción con los lípidos de membrana. Este efecto del TH sobre el contenido de MDA ha sido observado en otros frutos como tomate cv Micro-Tom (Malacrida 2005) y kiwi (Ma y col 2014), donde los frutos con TH presentaron una menor acumulación de MDA. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el tratamiento hidrotérmico reduce la peroxidación de lípidos generando un efecto protector y tolerancia al estrés por frío manteniendo la integridad de la membrana. En estos estudios se ha demostrado la importancia de la aplicación de un TH en la inducción de la tolerancia al DF, lo cual se vio reflejado en la reducción de los síntomas visuales de este desorden y de los parámetros fisiológicos relacionados con disrupción del funcionamiento adecuado de la membrana celular.

## **C CAMBIOS EN LA ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA Y TOLERANCIA INDUCIDA AL DAÑO POR FRÍO**

Se obtuvieron mapas bidimensionales de proteínas extraídas de la cáscara de frutos de mango almacenados a 5°C durante 0, 10 y 20 días. Se llevó a cabo un análisis para detectar las proteínas acumuladas diferencialmente entre frutos control y tratados hidrotérmicamente, las cuales pudieran estar relacionadas con el estrés y tolerancia inducida al daño por frío.

En la **Figura 8** se muestran los mapas bidimensionales de proteínas de cáscara de mango almacenados a temperatura de daño por frío a los días 0, 10 y 20; las flechas indican las proteínas acumuladas diferencialmente entre los frutos control y con tratamiento hidrotérmico. El análisis de cada uno de los mapas bidimensionales con el programa PDQuest detectó alrededor de 400 proteínas, de las cuales 33 se acumularon diferencialmente entre los frutos. Debido a la poca abundancia de algunos de los polipéptidos, sólo en 23 de las 33 proteínas que difieren entre los mapas de frutos control y TH fue posible obtener espectros de masas en tándem aptos para su utilización en la búsqueda en las bases de datos.

En el día 0 se detectaron 12 proteínas acumuladas diferencialmente, de las cuales 5 de ellas fueron cualitativas, es decir se encontraron sólo en uno de los tratamientos, mientras que las otras 7 proteínas presentaron diferencias cuantitativas entre ambos tratamientos. Después de 10 días a 5°C se encontraron 18 proteínas acumuladas diferencialmente; 6 cualitativas y 12 cuantitativas, de las cuales 11 corresponden a proteínas acumuladas diferencialmente en el día 0. Al día 20 de



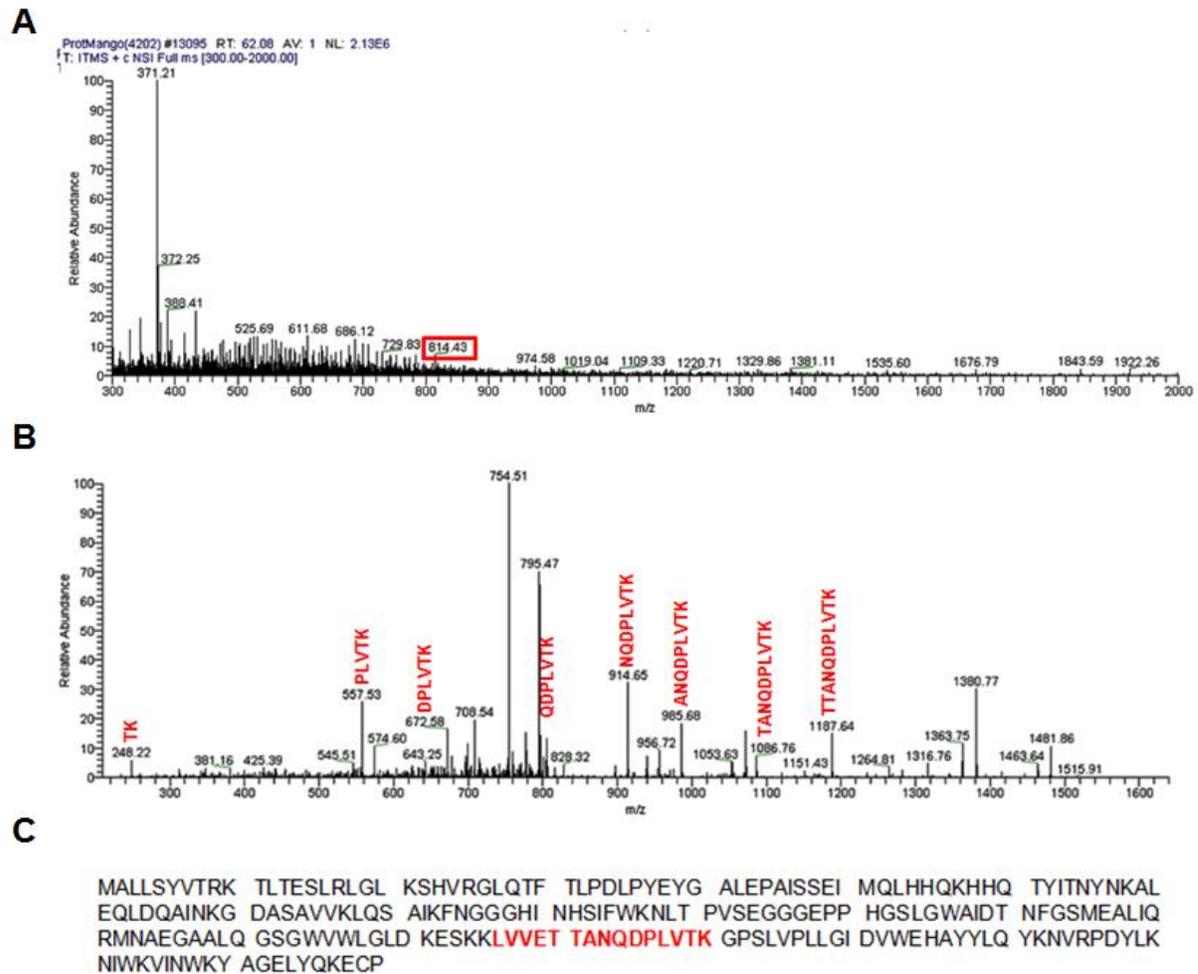
**Figura 8.** Cambios en la acumulación de proteínas de cáscara de mango tratados hidrotérmicamente y frutos control almacenados a 5°C durante 0, 10 y 20 días. Las flechas indican las proteínas acumuladas diferencialmente entre los frutos control y TH, cuya identificación por LC-MS se indica en el cuadro 5.

almacenamiento en frío se encontraron 17 proteínas diferenciales; 4 cuantitativas y 11 cualitativas, 11 coincidieron con las del día 0 y 11 con las del día 10, siendo 6 de ellas las que se expresaron diferencialmente solo en este día de almacenamiento.

En la **Figura 9** se muestra la identificación por espectrometría de masas en tándem de la proteína indicada con los números 2 y 36 en la Figura 5. En la **Figura 9A** se presenta la huella peptídica de la proteína obtenida en el primer analizador de masas. El ión con una relación masa / carga ( $m/z$ ) de 814.43 (cuadro rojo) fue uno de los que se seleccionó para inducir su disociación y posterior análisis en el segundo analizador de masas; la **Figura 9B** muestra el espectro MS/MS de este ión, donde además se indica la secuencia parcial de aminoácidos predicha para algunos de los iones resultantes de la disociación.

La búsqueda en las bases de datos determinó que este péptido forma parte de la proteína superóxido dismutasa, cuya secuencia completa se indica en la **Figura 9C**. La identidad y función de las proteínas asociadas al estrés por frío y que pudieron ser identificadas por espectrometría de masas se muestra en el **Cuadro 5**.

De las proteínas identificadas en estos mapas (**Figura 8, Cuadro 5**), ocho están relacionadas con procesos de estrés y defensa [Proteína de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP clase II 17.6 kDa), #3, 5, 9, 20, 21 y 25; Peroxidasa (POX), #35; Superóxido dismutasa (SOD), #2 y 36; Factor de transcripción de choque térmico A1 (HsfA1), #12, 30 y 45; Chalcona sintasa (CHS), #16; y Catalasa (Cat), #15], seis de ellas participan en el desarrollo y maduración del fruto [Fitoeno desaturasa (PDS), #19 y 31; Pectato liasa (PL), #46; GTPasa pequeña Rab X (GTPasa RabX), #7, 24 y 43; Isocorismato hidrolasa (IsoCH), #10, 29 y 37;  $\beta$ -



**Figura 9.** Identificación por espectrometría de masas de las proteínas 2 y 36 indicadas en la Figura 8. A) Huella peptídica de la proteína después de su digestión con tripsina. B) Espectro MS/MS del ión encerrado con un cuadrado en la Figura A. C) Secuencia completa de aminoácidos de la proteína identificada (las letras en rojo indican la secuencia del péptido seleccionado en A).

**Cuadro 5.** Identidad y función de las proteínas asociadas al daño por frío en cáscara de mango cv. Keitt sin y con TH almacenados durante 20 días a 5°C.

No.	ID	Descripción	Función	pI/pM(kDa) Experimental	pI/pM Teórico	% Cobertura
1, 17	Q2ERX5	$\beta$ -1,3-glucanasa ( <i>Mangifera indica</i> )	Patogénesis	5.6/30.9	6.1/19.5	45.86
2,36	B2BD28	Superóxido dismutasa ( <i>Pistacia vera</i> )	Estrés y defensa	6.1/25.8	7.66/25.7	23.91
3,21,31	A0A0H3UZ5 1	sHSP clase I 17.6 kDa ( <i>Mangifera indica</i> )	Estrés y defensa	5.8/17.6	6.06/17.5	56.49
4,22,33	XP_0103205 93.1	Methyl-CpG-binding domain-containing protein 9 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Desconocida	5.8/17.6	4.94/19.0	16.47
5,25,34	A0A0H3UZ5 1	sHSP clase I 17.6 KDa ( <i>Mangifera indica</i> )	Estrés y defensa	5.8/13.6	6.06/17.5	61.69
6,23,42	Q42918	Acetil-CoA C aciltransferasa ( <i>Mangifera indica</i> )	B-oxidación	6.0/15.1	8.21/45.2	18.6
7,24,43	Q43554	GTPasa pequeña Rab X ( <i>Mangifera indica</i> )	Desarrollo y Maduración	6.3/40	6.81/25	8.37

**Cuadro 5 (Continuación)**

8,26,38	G3M0D4	Oxygen evolving enhacer protein 1 ( <i>Dimocarpus longan</i> )	Fotosíntesis	5.7/22.7	5.96/35.2	15.32
9,20,39	A0A0H3UZ5 1	sHSP clase I 17.6 kDA ( <i>Mangifera indica</i> )	Estrés y defensa	9.1/19.1	6.06/17.5	53.25
10,29,47	D3TIB2	Isocorismato hidrolasa ( <i>Mangifera indica</i> )	Desarrollo y maduración	6.3/13.3	5.12/20.3	12.5
11,28,44	Q8H2B8	Albumina 2S ( <i>Anacardium occidentale</i> )	Patogénesis	6.5/13.3	5.68/16.3	18.84
12,30,45	K4D9B2	Factor de transcripción de choque térmico A1 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Estrés y defensa	7.3/13.2	7.69/29.8	9.6
13	Q4AYX3	B-galactosidasa ( <i>Mangifera indica</i> )	Desarrollo y Maduración	7.2/71.5	5.22/92.1	10.76
14	Q40294	Ubiquinol oxidasa ( <i>Mangifera indica</i> )	Respiración	7.3/55.0	8.5/36.6	58.18
15	K4BAE6	Catalasa ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Estrés y defensa	7.4/56.4	7.2/56.9	9.35

**Cuadro 5 (Continuación)**

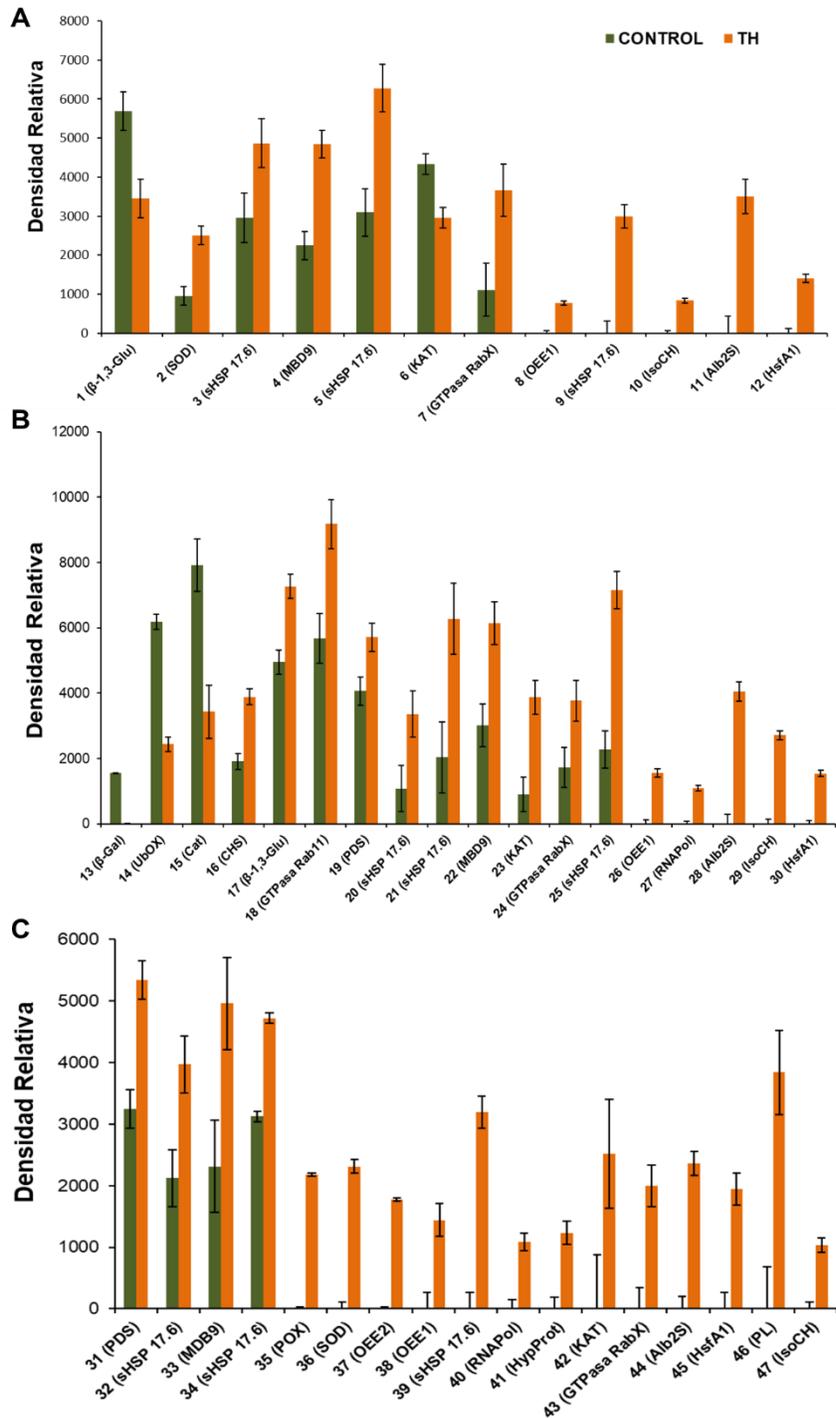
16	A0A060D9S4	Chalcona sintasa ( <i>Mangifera indica</i> )	Estrés y defensa	6.6/36.8	6.47/43.3	17.63
18	W0IAJ5	GTPasa pequeña Rab11 ( <i>Mangifera indica</i> )	Desarrollo y maduración	6.7/29.2	5.73/24	44.5
19,31	A0A0U2UEQ 0	Fitoeno desaturasa ( <i>Mangifera indica</i> )	Biosíntesis de carotenoides	6.4/27.5	5.20/20.9	32.26
27,39	K4B0L9	DNA-directed RNA polymerase V ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Transcripción	6.8/20.6	7.88/26.2	13.22
35	K4BAZ5	Peroxidasa ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Estrés y defensa	5.6/28.7	9.11/29.8	15.38
37	K4CEP4	Oxygen-evolving enhacer protein 2 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Fotosíntesis	7.6/25.1	7.83/27.7	14.34
41	XP_0064206 34.1	Hypothetical protein CICLE V ( <i>Citrus clementina</i> )	Desconocida	7.2/18.8	7.33/12.9	19.49
46	Q52PJ2	Pectato liasa ( <i>Mangifera indica</i> )	Desarrollo y Maduración	6.0/17.4	7.71/48.2	18.08

galactosidasa ( $\beta$ -Gal), #13, GTPasa pequeña Rab 11, #18]; una involucrada en procesos de transcripción [DNA-directed RNA polimerasa V, #27 y 41]; tres en fotosíntesis y respiración [Oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE1), #19; Oxygen evolving enhacer protein 2(OEE2), #11; ubiquinol oxidasa (UbOX), #14]; dos en patogénesis [Albumina 2S (Alb2S), #11, 28 y 44;  $\beta$ -1,3-glucanasa ( $\beta$ -1,3-Glu), #1 y 17], una en  $\beta$ -oxidación [acetil-CoA aciltransferasa (KAT) , #6, 23 Y 42], y dos para las cuales aún no está muy clara su función [Hypothetical protein CICLE v (HypProt), #41; methyl-CpG-binding domain-containing protein 9 (MBD9), #6, 23 y 42]. El análisis y discusión de estos resultados se presenta en la siguiente sección.

## **1 Proteínas relacionadas con respuesta al estrés y defensa**

### **a Proteínas de choque térmico**

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son parte de un grupo de proteínas inducidas por estrés ambiental para proteger o ayudar a reparar el daño a la planta (Sabehat y col 1998). Tres de los polipéptidos identificados (#3, 5, 9, 20 21 y 25) corresponden a proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSPs) de 17.6 kDa (**Cuadro 5**). Como era de esperarse, se presentó una mayor acumulación de estas proteínas en los frutos sometidos al TH con respecto a los no tratados desde la aplicación del TH (día 0) hasta el día 20 en almacenamiento a 5°C (**Figuras 8 y 10**). Esto coincide con estudios previos donde se ha reportado que temperaturas moderadamente altas inducen la síntesis de proteínas de bajo peso molecular en frutos de tomate (Sabehat y col 1996), las cuales podrían estar contribuyendo en la adquisición de la termotolerancia por parte de los frutos y podrían tener un papel específico en la adquisición de la tolerancia al DF.



**Figura 10.** Cuantificación de proteínas acumuladas diferencialmente entre los frutos de mango tratados hidrotérmicamente y frutos control almacenados por 0 (A), 10(B) y 20(C) días a 5°C. La intensidad de la proteína es el promedio de tres réplicas. Las barras verticales indican el LSD ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamiento por proteína. Las medias son diferentes significativamente cuando las barras no se traslapan horizontalmente.

La abundancia de las sHSPs en las plantas y sus características funcionales de unirse y estabilizar proteínas desnaturalizadas sugieren su papel tan importante en la adquisición de tolerancia al estrés (Sun y col 2002).

Una de las teorías del desarrollo de DF en los frutos es la alteración de la membrana celular. Las HSPs podrían asociarse con proteínas de membrana estabilizando su estructura y función durante y después del estrés por frío, proporcionando un efecto protector. Lee y col (1995) demostraron que las sHSPs forman complejos que previenen la inactivación de la enzima citrato sintasa. Este efecto protector de proteínas citosólicas y su asociación con la membrana podría ser una vía por la cual las HSPs le confieren tolerancia al DF a los frutos.

## **b Peroxidasa**

Otra de las proteínas identificadas fue Peroxidasa (#35) (**Figura 8, Cuadro 5**). La acumulación de esta enzima se observó solamente en frutos tratados hidrotérmicamente a los 20 días de almacenamiento a 5°C (**Figura 8**).

Las enzimas peroxidasas son proteínas que contienen un grupo hemo y utilizan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la oxidación de varias sustancias orgánicas e inorgánicas (Prasad y col 1995). Esta enzima juega diversos papeles bioquímicos y fisiológicos en plantas como en es el crecimiento, procesos de diferenciación y desarrollo, síntesis de etileno, sistemas redox de las membranas plasmáticas, acidificación y lignificación de la pared celular, así como en respuesta a infecciones por patógenos.

Matto y Modi (1975) mostraron que peroxidasa es una de las enzimas clave regulatorias en el proceso de maduración de mango, al observar un aumento significativo en la actividad de esta enzima durante el pico climatérico asociado con

el inicio de la maduración (Biale y Young 1982). Esto podría explicar la aparición de esta enzima hasta el día 20 de almacenamiento en frío, ya que al estar a 5 °C hay una disminución del metabolismo retrasando el proceso de maduración. Sin embargo, solo se observó en frutos con TH quizá porque son los que alcanzaron una maduración más uniforme. La actividad de esta enzima se ve influenciada por la temperatura. Toraskar y Modi (1984) observaron que en frutos de plátano dañados por frío había una disminución en la actividad de peroxidasa; ya que la enzima tenía una menor afinidad hacia el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De igual manera Anderson y col (1995) reportaron una disminución de la actividad de peroxidasa en plántulas de maíz dañadas por frío. Esto podría explicar porque no se observó acumulación de esta proteína en los frutos control después de 20 días a 5 °C.

El rol de peroxidasa no está del todo establecido, pero se ha sugerido que podría contribuir a mantener los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajos en la mitocondria (Prasad y col 1995) ya que se ha mostrado que la mitocondria es uno de los lugares donde se genera un mayor estrés oxidativo inducido por el daño por frío (Prasad y col 1994). Así mismo, la enzima peroxidasa está involucrada en el proceso de lignificación en la pared celular (Siegel 1993), el cual se ha relacionado con la tolerancia inducida al frío (Anderson y col 1995). También peroxidasas localizadas en vacuola podrían contribuir al secuestro de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citosólico (Takahama 1992). Estas funciones podrían estar relacionadas con la tolerancia adquirida al daño en los frutos de mango tratados hidrotérmicamente.

### **c Superóxido dismutasa**

Uno de los mecanismos relacionados con la incidencia de DF es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, ya que si estas no son inactivadas rápidamente pueden interaccionar con otras moléculas como lípidos, ADN y proteínas, resultando en su oxidación (Rive-Evans y col 1997). La enzima superóxido dismutasa (SOD) forma parte del sistema enzimático antioxidante y cataliza la conversión de los radicales superóxido produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, por lo que esta enzima es clave para la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Gómez y col 2009).

La acumulación de SOD fue mayor en frutos tratados hidrotérmicamente durante el almacenamiento en frío (#2 y 36) pero sólo se observó diferencia significativa al día 20 de almacenamiento a 5°C (**Figura 8**). El efecto del TH en la acumulación de esta enzima puede ser de gran importancia en la eliminación de EROs producidos por el estrés por frío. Al disminuir la cantidad de estos compuestos tóxicos se reduce la probabilidad de interacción con estructuras de gran importancia como los lípidos de membrana celular disminuyendo la peroxidación de estos, lo cual coincide con lo observado en nuestro estudio en el contenido de MDA en frutos tratados hidrotérmicamente (**Figura 7**). Por otra parte, los frutos control almacenados a 5°C presentaron una mayor incidencia de síntomas de DF, lo cual podría relacionarse con una menor capacidad de contrarrestar EROs debido a la menor acumulación de SOD. Esta enzima podría ser clave en la adquisición de la tolerancia al daño por frío en frutos de mango con un tratamiento hidrotérmico.

Resultados similares han sido reportados en estudios previos. Safizadeh y col (2007) trataron hidrotérmicamente frutos de limón cv Lisbon y obtuvieron una mayor

actividad de SOD durante el almacenamiento por frío comparado con los frutos control, así como una menor incidencia de los síntomas de daño por frío y un menor contenido de MDA, sugiriendo un papel protector de esta enzima mediante la detoxificación de los radicales libres. Por otro lado, Yimyong y col (2011) encontraron mayores niveles de transcritos de SOD en frutos de mango cv Okrong tratados hidrotérmicamente que en el control durante el almacenamiento a bajas temperatura.

#### **d Factor de transcripción de choque térmico A1**

Los factores de transcripción de choque térmico (Hsfs) son los componentes terminales de una cadena de transducción de señales, intermediarios en la activación de genes de respuesta al calor y un gran número de estresantes químicos (Nover 1991; Morimoto 1992). Estos factores de transcripción son los reguladores principales de la respuesta al estrés térmico. Cuando las células detectan este tipo de estrés rápidamente se activan los Hsfs y se mejora la expresión de varios genes que codifican para proteínas de choque térmico (Ohama y col 2016). La acumulación del factor de transcripción de choque térmico A1 (HsfA1) solo fue observada en frutos con tratamiento hidrotérmico en los tres diferentes días evaluados (**Figura 8 y 10**).

En particular, el HsfA1 es uno de los más importantes al ser de los reguladores principales indispensable en la activación de redes transcripcionales. Se ha predicho que HSFA1 regula directamente los niveles de expresión de genes que codifican para diferentes factores de transcripción de respuesta al estrés térmico (Ohama y col 2017). El HsfA1 parece tener una función única como regulador principal en la termotolerancia adquirida, y no puede ser reemplazado por otro HSF.

En tomate, se ha identificado a este como el responsable de generar la respuesta al estrés térmico y posteriormente, por interactuar con otros Hsf (A1 y B1) teniendo efectos en diferentes aspectos de la respuesta térmica y el mantenimiento y/o restauración de la expresión de los genes constitutivos (von Koskull-Döring y col 2007).

Diferentes estudios han mostrado que una planta puede generar un efecto de tolerancia cruzada, es decir, al exponer a una planta a ciertas condiciones de estrés moderado induce tolerancia a otro tipo de estrés. El estrés con altas temperaturas se ha encontrado que protege contra DF en diferentes frutos y verduras como aguacate (Woolf y col 1995), chile (Mencarelli y col 1993) y tomate (Lurie y Klein 1991). Uno de los mecanismos podría ser la activación de estos factores de transcripción que llevan a la expresión de otros genes que codifican para proteínas involucradas en termotolerancia, uno de ellas y de las más importantes, las proteínas de choque térmico las cuales también fueron identificadas en este trabajo, incluso sólo en frutos tratados hidrotérmicamente.

## **2 Proteínas relacionadas con procesos de desarrollo y maduración del fruto**

### **a Fitoeno Desaturasa**

El cambio de color durante la maduración incluye la conversión de cloroplastos a cromoplastos. Como resultado de la pérdida de capacidad fotosintética de los cloroplastos, los tilacoides se convierten en sitios para la acumulación de carotenoides en las células de los frutos (Klee y Giovannoni 2011). La acumulación de pigmentos depende del cultivar de mango, pero en general, este fruto tiene un alto

contenido de carotenoides en el mesocarpio responsable del color amarillo intenso (Singh y col 2013).

Una de las proteínas identificadas fue la enzima fitoeno desaturasa (**Figura 8, Cuadro 5**), cuya acumulación fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en frutos con TH con respecto a los control en todos los días evaluados (**Figura 10**). Esta enzima está involucrada en la síntesis de carotenoides, donde introduce dobles enlaces para la formación de licopeno a partir de fitoeno (Ye y col 2000).

El DF está asociado con una reducción en la síntesis de carotenoides (Gutierrez y col 1997), lo cual ha sido reportado por varios autores en mango. Talcott y col (2005) reportó una menor formación de carotenoides en mango cv Tommy Atkins almacenados por 8 d a 5°C previo a un periodo de maduración, comparado con frutos almacenados a 20°C. Medlicott y col (1990) observaron el mismo efecto en el mismo cultivar almacenado a 12°C por 16 días, observando una reducción del 70% en carotenoides comparado con frutos no dañados por frío después de la etapa de maduración. Por otro lado, dentro de las respuestas generadas por el tratamiento hidrotérmico en mango, además del incremento en la maduración, es la acumulación de carotenoides responsables del típico color anaranjado del fruto (Talcott y col 2005).

El tratamiento hidrotérmico podría estar involucrado en el mantenimiento de la estructura y función de fitoeno desaturasa. Como se mencionó anteriormente el estrés generado por el calor genera la producción de proteínas con actividad chaperona (HSPs) las cuales pueden unirse a diversas proteínas estabilizándolas y así mantener su función. De esta manera, el TH puede estar ayudando a que la actividad de esta enzima se lleve a cabo de forma normal, lo cual se vio reflejado en

un mejor desarrollo de color y una maduración más uniforme en los frutos tratados (**Figura 4, Cuadro 4**).

#### **b Pectato Liasa**

La enzima pectato liasa (#46) fue otra enzima identificada en el análisis entre frutos de mango tratados hidrotérmicamente y los frutos control. Esta enzima es responsable de los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos en homogalacturonanos demetilesterificados por  $\beta$ -eliminación y produce 4,5-oligogalacturonidos insaturados en sus extremos reductores (Palusa y col 2007). La presencia de esta proteína se detectó hasta el día 20 de almacenamiento a 5 °C y solamente en frutos de mango tratados hidrotérmicamente (**Figuras 5 y 7**).

Durante el proceso de maduración hay una serie de cambios estructurales y de composición en la pared celular lo que conlleva a la pérdida de firmeza y el ablandamiento del fruto. El ablandamiento en frutos climatéricos como el mango incluye modificaciones estructurales de la pared celular, depolimerización de hemicelulosas y poliurónidos (Fisher y Bennet 1991; Brummell y Hapster 2001). Todos estos cambios son debidos a la acción de diversas enzimas, entre ellas pectato liasa. Debido a que las pectinas son componentes principales de la pared celular, su degradación es un proceso importante en el ablandamiento del fruto durante la maduración (Chourasia 2006).

Chourasia y col (2006) mostraron que pectato liasa es la principal enzima responsable del proceso de ablandamiento en mango, ya que este proceso se correlacionó con un incremento en los niveles de transcrito de un gen que codifica

para esta enzima durante la maduración del fruto. No se detectó la presencia de este transcrito en otros tejidos o en frutos inmaduros.

También se ha estudiado el efecto del tratamiento hidrotérmico sobre la expresión de este gen. Yimyong y col (2011) reportaron una mayor acumulación de transcritos de pectato liasa en frutos tratados hidrotérmicamente comparado con frutos control durante el almacenamiento a bajas temperaturas, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio. El tratamiento hidrotérmico en mango puede estar ayudando a mantener el proceso de maduración de forma regular.

### **c GTPasa Pequeña tipo Rab X y Rab11**

Dentro de las proteínas identificadas se incluyen GTPasa pequeñas tipo Rab (Spots #7, 24, 43 y 18; **Figura 8, Cuadro 5**). En el caso de la GTPasa pequeña RabX spot (#7,24,43) presentó una mayor acumulación en frutos con TH en los tres días de evaluación del almacenamiento en frío. En el caso de la proteína GTPasa pequeña Rab11 (#18) solo mostró diferencias significativas a los 10 días a 5 °C y también presentó mayor acumulación en frutos con TH.

Las proteínas GTPasas pequeñas son una superfamilia (tamaño de 21-30 KDa). Su interacción con varios reguladores y efectores generan una diversidad funcional y crean funciones novedosas en diferentes organismos. En plantas, estas proteínas proporcionan la capacidad de utilizar GTPasas pequeñas como interruptores moleculares clave en la modulación de varias rutas de señalización específicas y funciones (Yang 2002). El equilibrio entre las formas activas e inactivas de estas proteínas es controlado por proteínas regulatorias positivas y negativas en respuesta a diferentes condiciones celulares y estímulos extracelulares (Abbal y col

2008). La familia de GTPasas pequeñas se divide en al menos 5 familias, incluyendo Ras, Rho, Rab, ARf y Ran (Bischoff y col 1999; Takai y col 2001).

Las GTPasas pequeñas tipo Rab se ha encontrado que están presentes en vesículas; las cuales están involucradas en el traslado de proteínas y moléculas grandes a través de la célula (Olkkonen y Stenmark 1997). Cada tipo de Rab está asociado con un tipo específico de vesícula y probablemente juegan un rol en asegurar una fusión correcta (Takai y col 2001). Además se ha mostrado que son reguladores importantes en el tráfico endomembranoso (Molendjik y col 2004), mediando la comunicación entre vacuola, membrana plasmática, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y pared celular.

Estudios previos han mostrado la importancia de algunas GTPasas tipo Rab en el desarrollo y maduración de algunos frutos como tomate y mango (Lu y col 2001; Zainal y col 1996). El desarrollo de los frutos viene acompañado de un número de cambios incluyendo división y elongación celular, metabolismo primario y secundario con cambios en color, sabor y textura (Brady 1987; Seymour y col 1993). Estos cambios son resultado de la acción de diversas enzimas, las cuales son movilizadas a través del sistema endomembranoso de la célula, transportadas a la vacuola y secretadas en el apoplasto para el ablandamiento de la pared celular (Lu y col 2001).

Zainal y col (1996) encontraron una clona de ADNc de longitud completa (RabX) en mango que tenía homología con una clase de GTPasa pequeña tipo rab11/YPT3. Al analizar cuatro diferentes estados de madurez se encontró que el gen RabX de mango es expresado en una manera ampliamente regulada. A pesar de que aún no es clara la función de esta proteína en el proceso de maduración, el

hecho de que la expresión de este gen sea inducida durante este proceso sugiere su relación con esta ruta de secreción regulada.

Como ya se mencionó, durante la maduración los frutos sintetizan de manera específica un número de enzimas que actúan en la pared celular y por tanto necesitan ser secretadas específicamente y dirigidas activamente al apoplasto. Nuevos componentes y polisacáridos de la pared celular pueden ser secretados durante la maduración. La proteína RabX podría estar involucrada en el movimiento de estas enzimas o componentes de la pared celular alterados durante la maduración, quizás actuando como proteínas de unión específica dentro del aparato de Golgi o facilitando la fusión entre elementos del aparato de Golgi y la membrana plasmática (Zainal y col 1996). La mayor acumulación de estas proteínas en frutos tratados hidrotérmicamente apoya la hipótesis de que el tratamiento hidrotérmico ayuda a mantener una maduración regular y el metabolismo de pared celular, al ser proteínas clave durante este proceso.

#### **d Chalcona Sintasa**

Otra de las proteínas identificadas fue la enzima chalcona sintasa (#16). Esta proteína presentó una mayor acumulación en frutos tratados hidrotérmicamente en el día 10 de almacenamiento en frío con respecto al control (**Figuras 8 y 10**).

Chalcona sintasa (CHS) es una enzima clave en la ruta de biosíntesis de flavonoides/isoflavonoides. Los flavonoides son sintetizados por la ruta de los fenilpropanoides y policétidos, la cual empieza con la intervención de chalcona sintasa en la condensación de una molécula de éster-CoA de ácido cinámico, o derivados como ácido cumárico o ferúlico, y tres moléculas de malonil-CoA,

resultando en la chalcona naringenina como producto mayoritario. Los flavonoides tienen un papel crítico en la defensa de plantas por lo que chalcona sintasa tiene una gran importancia en la regulación de esta ruta considerándose una enzima clave. Durante las condiciones de estrés biótico o abiótico en plantas un gran número de genes son expresados como parte de su defensa. Dentro de estos genes, chalcona sintasa es uno comúnmente inducido en diferentes plantas lo que resulta en la producción de compuestos con diferentes actividades como antimicrobiana, insecticida, antioxidante, entre otras (Dao y col 2011).

Leyva y col (1995) observaron una acumulación de transcritos de PAL (Fenilalanina amonio liasa) y CHS en hojas de *Arabidopsis thaliana* tolerante al frío. También diversos autores han reportado un incremento tanto de antocianinas como de flavonoides en respuesta al daño por frío (Christie y col 1994; Lo Piero y col 2005; Sanchez-Ballesta y col 2007). En frutos de naranja se ha reportado un incremento de antocianinas y genes involucrados en su síntesis inducido por bajas temperaturas (Lo Piero 2005). En durazno, SNPs relacionados con antocianinas fueron ligados a la tolerancia del fruto al daño por frío (Martinez-Garcia y col 2013). En cuanto a los flavonoides es bien conocida su actividad antifúngica (Hammerschmidt 1999). Para ambos compuestos, flavonoides y antocianinas se ha demostrado una correlación alta con la actividad antioxidante en frutos de mango (Ma y col 2011; Zhang y col 2013).

Como se mencionó anteriormente, durante el daño por frío se generan especies reactivas de oxígeno, y uno de los sistemas involucrados en la disminución de estos compuestos es el sistema antioxidante no enzimático, en donde compuestos como los flavonoides y las antocianinas pueden actuar contrarrestando

estas especies dañinas (Sivankalyani y col 2016). También se sabe que durante el daño por frío el fruto se vuelve más susceptible al ataque por hongos lo que conlleva a pudriciones; los flavonoides al tener esta actividad antifúngica (Goodman y col 2004) podrían estar interviniendo para la disminución de este síntoma de daño por frío en frutos tratados hidrotérmicamente.

### **3 Proteínas relacionadas con respiración**

#### **a Ubiquinol Oxidasa**

En plantas, ubiquinol oxidasa, u oxidasa alternativa (UbOX), es una proteína de membrana interfacial orientada hacia el lado de la matriz de la membrana mitocondrial interna uniendo la oxidación de ubiquinol a la reducción de cuatro electrones de  $O_2$  a agua. UbOX reduce dramáticamente el rendimiento de energía (ATP) de respiración ya que no está bombeando protones, ya que los electrones que fluyen a UbOX evitan lo complejos III y IV que son bombeadores de protones (Vanlerberghe 2013).

Ubiquinol oxidasa (#14) fue identificada en el día 10 de almacenamiento. En frutos control hubo una acumulación dos veces mayor que en frutos tratados hidrotérmicamente (**Figuras 8 y 10**).

La mitocondria es el centro del metabolismo de respiración. El malfuncionamiento de este organelo usualmente está relacionado con el estrés oxidativo, el cual lleva a la inducción de UbOX tanto al nivel de transcrito como de proteína. Por lo que esta proteína es utilizada como marcador general de disfunción en la mitocondria o de estrés oxidativo celular, el cual es uno de los mecanismos relacionados con el daño por frío (Vanlerberghe 2013). Estudios en varias especies

han mostrado un incremento en transcritos de UbOX y de proteína después de ser transferidos o crecidos a bajas temperaturas (Taylor y col 2006; Umbach y col 2009; Wang y col 2011). Tras un almacenamiento en frío de maíz sensible a baja temperatura se observó un incremento en la actividad de UbOX, de tal manera que el 60% de toda la respiración estaba ocurriendo a través de UbOX (Ribas-Cabo y col 2000) relacionado con el daño por frío generado.

También se ha demostrado que una sobreexpresión de UbOX disminuye o hace más lenta la regulación positiva del sistema de atrapamiento de EROs (Pasqualini y col 2007), lo que sugiere que esta proteína tiene una influencia negativa en la ruta de señalización capaz de incrementar el sistema para la eliminación de EROs de la célula. A su vez en un estudio realizado por Wang y col (2011) en plantas se suprimió la expresión de esta proteína demostrando una mayor acumulación de transcritos que codifican para enzimas secuestradoras de EROs.

El haber observado la acumulación de esta proteína en frutos sin tratamiento es un indicador del estrés generado debido a las bajas temperaturas de almacenamiento, ya que el fruto busca una ruta alternativa de respiración. Una mayor expresión de esta proteína tiene un efecto negativo sobre el sistema antioxidante enzimático, el cual es necesario para la eliminación de EROs generados durante el estrés por frío, por tanto, la acumulación de UbOX favorece el daño por frío en los frutos control.

## 4 Proteínas relacionadas con patogénesis

### a $\beta$ -1,3- glucanasa

Otra proteína identificada por MS/MS fue la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa (#1 y 17). Esta enzima presentó una mayor acumulación en frutos tratados hidrotérmicamente a los 10 días de almacenamiento a 5°C; mientras que para el día 20 no se observaron diferencias significativas entre los frutos con TH y control (**Figura 8 y 10**). Esto coincide con lo reportado por Yimyong y col (2011) quienes observaron un incremento significativo en los transcritos de esta enzima al día 10 de almacenamiento a bajas temperaturas en frutos de mango tratados hidrotérmicamente y posteriormente los niveles de transcrito disminuyen igualándose a los del fruto control.

El objetivo primordial de la aplicación del tratamiento hidrotérmico es librar al fruto de esporas de hongos y de infecciones que se puedan dar en la superficie (Pavoncello y col 2001). Sin embargo, en algunas plantas se ha reportado que el tratamiento hidrotérmico también induce resistencia contra la inoculación de varios patógenos (Stermer y Hammerchmidt 1984; Schweizer y col 1995). Durante el tratamiento hidrotérmico dos grupos de proteínas pueden activarse para inducir resistencia al fruto dentro de ellas aquellas que le confieren resistencia a patógenos como las proteínas  $\beta$ -1,3-glucanasas, las cuales son un grupo importante ya que junto con las quitinasas hidrolizan los polímeros de las paredes celulares de hongos; por tanto, se cree están involucradas en el mecanismo de defensa contra infecciones fúngicas (Schlumbaum y col 1986; Collinge y col 1993).

Los resultados obtenidos por Sanchez-Ballesta y col (2006) muestran que el incremento de un gen que codifica para  $\beta$ -1,3-glucanasa durante la exposición a

bajas temperaturas en mandarinas sensibles al daño por frío puede ser importante para reducir este daño, por tanto esta proteína podría estar involucrada en mecanismos de defensa en frutos cítricos para reducir el daño en la cáscara inducido por bajas temperaturas.

Se ha documentado ampliamente el papel que juegan las proteínas como glucanasas en la defensa contra ataques por patógenos. Como se ha mencionado el DF favorece la incidencia de pudriciones debido al ataque por hongos (Saltveit y Morris 1990) por lo que el tratamiento hidrotérmico podría estar favoreciendo la acumulación de esta enzima evitando la presencia de pudriciones, lo cual se vio reflejado en la ausencia de este síntoma antes del día 20 de almacenamiento en frutos con TH, mientras que para el día 20 a 5°C y tras el periodo de maduración por 7 días a 21 °C fue significativamente menor en estos frutos (**Cuadro 4**).

## **5 Proteína relacionada con $\beta$ -oxidación**

### **a Acetil coA acil transferasa o 3-cetoacil-coA tiolasa**

Acetil-coA acil transferasa o 3-cetoacil-coA tiolasa b (Spot #6, 23 y 42) presentó una mayor acumulación en frutos tratados hidrotérmicamente (**Figuras 8 y 10**). A partir del día 10 se observó diferencia significativa en la acumulación entre tratamientos, siendo hasta 4 veces mayor en frutos con TH.

Los ácidos grasos y sus derivados participan en diferentes eventos biológicos, incluyendo rutas metabólicas, endocrino y procesos de señalización (Reddy y Hashimoto 2001). A su vez son una fuente de energía debido a su degradación mediante la  $\beta$ -oxidación que consta de varias etapas catalizadas por diferentes enzimas (Hiltunen y Qin 2000; Kim y Battaile 2002). Una de las más importantes es

3-cetoacil-coA tiolasa (KAT), la cual cataliza el último paso en el proceso de  $\beta$ -oxidación, llevando a cabo el rompimiento del  $\beta$ -ceto éster en una condensación inversa de Claisen resultando un nuevo acil-CoA derivado de la pérdida de dos átomos de carbono, los cuales son utilizados posteriormente para producir acetil-CoA (Sundaramoorthy y col 2006).

En el estudio realizado por Bojórquez y Gómez-Lim (1995) detectaron el mRNA de una tiolasa en mango cv Manila la cual fue fuertemente inducida durante la maduración del fruto. Esto también fue observado en otros frutos como tomate y aguacate donde el transcrito para esta proteína incrementó gradualmente a medida que fue avanzando el proceso de maduración. Como se mencionó esta enzima está involucrada en el metabolismo de lípidos y se sabe que los ácidos grasos son metabolizados de manera activa durante la maduración del mango (Bandyophadyay y Gholap 1973a; Lakshminarayana 1980). Aunque el fruto de mango no almacena lípidos (Lakshminarayana 1980), existen reportes del metabolismo de lípidos en estos frutos. Los cambios en los ácidos grasos y triglicéridos han sido asociados con cambios en aroma y sabor y producción de volátiles durante la maduración del fruto (Bandyophadyay y Gholap 1973b). Por tanto, el papel de esta enzima podría ser importante para la producción de estos compuestos responsables de características sensoriales específicas del fruto. El tratamiento hidrotérmico de manera indirecta podría estar manteniendo la actividad de esta enzima ya que no se logra observar en los frutos control donde la maduración no se llevó a cabo de manera normal, a diferencia de los frutos tratados que si presentaron características típicas de olor y sabor.

## VIII CONCLUSIONES

- La efectividad del TH para inducir tolerancia al DF en los frutos de mango se vió reflejada en una menor incidencia de los síntomas de DF, así como en una menor fuga de electrolitos y menor peroxidación de lípidos en la cáscara.
- El TH indujo una mayor acumulación de las proteínas choque térmico (sHSPs 17.6) y de HsfA1, las cuales podrían estar contribuyendo a la adquisición de la tolerancia al DF manteniendo el funcionamiento correcto de las proteínas y evitando su plegamiento o desnaturalización.
- La acumulación de las enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa fue mayor en frutos con TH y menor incidencia de síntomas, lo que sugiere un papel importante de estas enzimas en la tolerancia del tejido al frío, probablemente a través de la eliminación de radicales libres.
- Enzimas relacionadas con el desarrollo y maduración del fruto, entre ellas fitoeno desaturasa, mostraron mayor acumulación en frutos con TH, lo cual puede estar relacionado con una coloración más uniforme en estos frutos.
- Los resultados sugieren que la tolerancia al DF inducida por el TH está asociada con una mayor protección de las proteínas ante el estrés por frío, una mayor actividad del sistema antioxidante y de protección contra patógenos, favoreciendo un mejor desarrollo y maduración del fruto con menor incidencia de síntomas de daño con respecto a frutos no tratados.

## IX BIBLIOGRAFÍA

- Abbal P, Pradal M, Muniz L, Sauvage FX, Chatelet P, Ueda T, Tesniere C. 2008. Molecular characterization and expression analysis of the Rab GTPase family in *Vitis vinifera* reveal the specific expression of the VvRab A protein. *Journal of Experimental Botany* 59: 2403-2416.
- Agillon AB, Lizada MCC. 2010. Responses of carabao mango (*Mangifera indica* L.) fruit to chilling stress. *Acta Horticulturae* 877: 467-474.
- Anderson D, Prasad K, Stewart R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and Glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109: 1247-1257.
- Andrade JM, Toledo TT, Nogueira SB, Cordenunsi BR, Lajolo FM, do Nascimento JRO. 2012. 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening. *Journal of Proteomics* 75:3331-3341.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Báez-Sañudo R, Bringas-Tadei E, Ojeda J. 1997. Capítulo 6. Selección y Clasificación. En: R. Báez Sañudo (Compilador). Manejo post-cosecha del mango. Empacadoras de Mango de Exportación A.C. México: 25-29.
- Bandyopadhyay C, Gholap AS. 1973a. Changes in fatty acids in ripening mango pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21: 496-497.
- Bandyopadhyay C, Gholap AS. 1973b. Relationship of aroma and flavor characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) to fatty acid composition. *Journal of Science Food and Agriculture* 24:1497-1503.
- Biale JB, Young RE. 1982. Respiration and ripening in fruits – retrospect and prospect. In: Friends J, Rhodes MJC (Eds), Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables, pp.1-39. Academic Press, London.
- Bischoff F, Molendijk A, Rajendrakumar CS, Palme K. 1999. GTP-binding proteins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 233-256.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Brady CJ. 1987. Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 155-178.

- Bojórquez G, Gómez-Lim MA. 1995. Peroxisomal thiolase mRNA is induced during mango fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 28: 811-820.
- Brummell DA, Harpster MH. 2011. Cell wall metabolism of fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47:311-340.
- Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 283-292.
- Cantre D, Herrremans E, Verboven P, Ampofo-Asiama J, Marteen LA, Hertog TM, Nicolai BM. 2017. Tissue breakdown of mango (*Mangifera indica* L. cv. Carabao) due to chilling injury. *Postharvest Biology and Technology* 125: 99-111.
- Carvajal F, Palma F, Jamilena M, Garrido D. 2015. Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest cold storage in zucchini fruit. *Postharvest Biology and Technology* 108: 68-77.
- Castrillo M, Kruger, Whatley R. 1992. Sucrose metabolism in mango fruit during ripening. *Plant Science* 84: 45-51.
- Chidtragool S, Ketsa S, Bowen J, Ferguson JB, van Doorn WG. 2011. Chilling injury in mango fruit peel: Cultivar differences are related to the activity of phenylalanine ammonia lyase. *Postharvest Biology and Technology* 62: 59–63.
- Chongchatuporn U, Ketsa S, van Doorn WG. 2013. Chilling injury in mango (*Mangifera indica*) fruit peel: Relationship with ascorbic acid concentrations and antioxidant enzyme. *Postharvest Biology and Technology* 86: 409–417.
- Chourasia A, Sane VA, Nath P. 2006. Differential expression of pectate lyase during ethylene-induced postharvest softening of mango (*Mangifera indica* var. Dashehari). *Physiologia Plantarum* 128: 546-555.
- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541-549.
- Collinge B, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K. 1993. Plant chitinases. *Plant Journal* 3: 31-40.

- Come D. 1998. Cellular and metabolic effects of cold on fruits and vegetable. Procc. of Madrid 98- Cost 915. Conference Physiological and Technological aspects of gaseous and thermal treatments of fresh fruits and vegetable.
- Couey HM. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruit. HortScience 24: 198–202.
- Cruz-Mendivil A, López-Valenzuela JA, Calderón-Vázquez CL, Vega-García MO, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A. 2015. Transcriptional changes associated with chilling tolerance and susceptibility in 'Micro-Tom' tomato fruit using RNA-Seq. Postharvest Biology and Technology 99:141-151.
- Cuquerella J, Martínez-Jávega JM y Jiménez-Cuesta M. 1981. Some physiological effects off different wax treatments on Spanish citrus fruit during cold storage. Proceedings of the International Society of Citriculture 2: 734-737.
- Dang TH, Singh Z, Swinny EE. 2008. Impact of postharvest disease control methods and cold storage on volatiles, color development and fruit quality in ripe 'Kensington Pride' mangoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 10667-10674.
- Dao TT, Linthrost HJ, Verpoort R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. Phytochemistry Reviews 10: 397-412.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences 57: 779–795
- Del Río NA, Martínez-Jávega JM, Navaro P, Navaro J y Cuquerella J. 1999. Aplicaciones del frío en post-cosecha de cítricos: Panorama actual. Levante Agrícola 348: 253-262.
- Fallik E. 2003. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharvest Biology and Technology 32:125-134.
- FAOSTAT 2018. Food and Agriculture Organization. Statistical Database. Disponible en: <http://faostat.fao.org> (Consultado el 18 de marzo de 2018).
- Fasoli E, Righetti PG. 2013. The peel and pulp of mango fruit: A proteomic samba. Biochimica et Biophysica Acta 1834: 2539-2545
- Fawcett HS. 1992. Packing house control of brown rot. Citrograph 7: 232–234.

- Fernández-Trujillo JP, Martínez JA. 2006. Ultrastructure of the onset of chilling injury in cucumber fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 80:100-110.
- Fischer RL, Bennet AB. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 675-703.
- Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M y Trethewey R. 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biology* 7:R76.
- Gómez JM, Jiménez A, Olmos E, Sevilla F. 2004. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 55:119-30.
- González-Aguilar GA, Zacarias L, Mulas M, Lafuente MT. 1997. Temperature and duration of water dips influence chilling injury, decay and polyamine content in 'Fortune' mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 12: 61–69.
- González-Aguilar, GA, Gayosso L, Cruz R, Fortiz J, Baez R, Wang CY. 2000. Polyamines induced by hot water treatments reduce chilling injury and decay in pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 18: 19–26.
- González-Aguilar GA, Buta JG, Wang CY. (2001). Methyl jasmonate reduces chilling injury symptoms and enhances colour development of 'Kent' mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1244-1249.
- Goodman CD, Casati P, Walbot V. 2004. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 16: 1812-1826.
- Guy C. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance; role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:187-223.
- Hakim A, Kaukovirta E, Pehu E, Voipio I, Purvis AC. 1997. Reducing chilling injury of cold-stored tomato fruits by intermittent warming. *Horticultural Science* 11: 142-146.
- Hammerschmidt R. 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37: 285-306.

- Han J, Tian SP, Meng XH, Ding ZS. 2006. Response of physiologic metabolism and cell structures in mango fruit to exogenous methyl salicylate under low-temperature stress. *Physiologia Plantarum*. 128:122-133.
- Hara AH, Hata TY, Tenbrink VL, Hu BKS, Kaneko RT.1996. Postharvest heat treatment of red ginger flowers as a possible alternative to chemical insecticidal dip. *Postharvest Biology and Technology* 7:137-144.
- Hatton TT. 1990. Reduction of chilling injury with temperature manipulation. En: *Chilling injury on Horticultural crops*. Wang. C. Y. Ed. Boca Raton, CRC Press. Florida. U.S.A. p. 269-280.
- Hiltunen JK, Qin Y. 2000.  $\beta$ -Oxidation strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482:117-128.
- Hong-xia W, Hui-min J, Ciao-wei M, Song-biao W, Quan-sheng Y, Wen-tian X, Yi-gan g Z, Zhong-shan G, Ru-lin Z. 2014. Transcriptome and proteomic analysis of mango (*Mangifera indica* Linn) fruits. *Journal of Proteomics* 19-30.
- Howarth CJ. Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock. *Plant, Cell and Environment* 14:831-841.
- Hurry VM, Strand A, Tobiasson M, Gardestrom P, Oquist,G. 1995. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. *Plant Physiology* 109: 697-706.
- Jacobi KK, MacRae EA, Hetherington SE. 2001a. Effect of fruit maturity on the response of 'Kensington' mango fruit to heat treatment. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41: 793–803.
- Jacobi KK, MacRae EA, Hetherington SE. 2001b. Postharvest heat disinfection treatments of mango fruit. *Scientia Horticulturae* 89: 171-193.
- Jha S, Chopra S, Kingsly A. 2007. Modeling of color values for nondestructive evaluation of maturity of mango. *Journal of Food Engineering* 78: 22-26.
- Joas J, Caro Lechaudel M. 2009. Comparison of postharvest changes in mango (cv Cogshall) using a ripening class index (Rci) for different carbon supplies and harvest dates. *Postharvest Biology and Technology* 54: 25-31.
- Jordan RA. 1993. The disinfestation heat treatment process. *Plant quarantine in Asia and the Pacific. A Report of an Asian Productivity Organization Study Meeting*,

- Taipei, Taiwan, 17–26 March 1992. Asian Productivity Organization, Tokyo, pp. 53-68.
- Kader A, Mitcham B. 1994. Optimum Procedures for Ripening Mangoes. Perishables Handling Newsletter Issue No. 80. P. 16. University of California.
- Kang HM, Saltveit ME. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and riceseedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum* 115: 571–576.
- Kang P, East R, Trujillo J. 2008. Colour vision system evaluation of bicolour fruit: A case study with “B74” mango. *Postharvest Biology and Technology* 49:77-85.
- Kaniuga Z. 2008. Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals. *Journal of Plant Biology* 10:171-184.
- Ketsa S, Chidtragool S, Klein JD, Lurie S. 1999. Firmness, pectin components and cell wall hydrolases of mango fruit following low temperature stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74: 685-689
- Kim JJ, Battaile KP. 2002. Burning fat: the structural basis of fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Current Opinion in Structural Biology* 12:721-728.
- King MM, Ludford PM. 1983. Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of different tomato cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108:74-77.
- Klee HJ, Giovannoni JJ. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics* 45: 41-59.
- Krishnamurthy S, Subramanyam H. 1970. Respiratory climacteric and chemical changes in the mango fruits, *Mangifera indica*. *Journal of American Society of Horticultural Science* 95:333-337.
- Lacan D, Baccou JC. 1996. Changes in lipids and electrolyte leakage during nonnetted muskmelon ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 54:1488-1491.
- Lakshminarayana S. 1980. Mango. En: tropical and subtropical fruits. S Nagy, PE Shaw (eds). AVI Publishing CT. USA. p 184-257.

- Lederman I, Zauberger G, Weksler A, Rot I, Fuchs Y. 1997. Ethylene-forming capacity during cold storage and chilling injury development in 'Keitt' mango fruit. *Postharvest Biology and Technology* 10:107-112.
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM. 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* 108: 39-46.
- Lee BH, Lee H, Xiong L, Zhu JK. 2002. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell* 14:1235-1251.
- Li Q, Yu B, Gao Y, Dai AH, Bai JG. 2011a. Cinnamic acid pretreatment mitigates chilling stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology* 168: 927–934.
- Li X, Yun J, Fan X, Xing Y, Tang Y. 2011b. Effect of 1-methylcyclopropene and modified atmosphere packaging on chilling injury and antioxidative defensive mechanism of sweet pepper. *African Journal of Biotechnology* 10: 6581-6589.
- Lizada MC. 1991. Postharvest physiology of the mango - A review. *Acta Horticulturae* 291: 437-453.
- Lo Piero AR, Puglisi I, Rapisarda P, Petrone G. 2005. Anthocyanins accumulation and related gene expression in red orange fruit Induced by low temperature storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 9083-9088.
- López-López ME, Lopez-Valenzuela JA, Delgado-Vargas-F, López-Angulo G, Carrillo-López A, Ayón-Reyna LE, Vega-García MO. 2018. A treatment combining hot water with calcium lactate improves the chilling injury tolerance of mango fruit. *HortScience* 53:217-223.
- Lu C, Zainal Z, Tucker GA, Lycett GW. 2001. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab 11 GTPase gene. *The Plant Cell* 13: 1819-1833.
- Lurie S. 1998. Postharvest heat treatments of horticultural crops. *Horticultural reviews* 22: 91-121.
- Lurie S, Klein JD. 1991. Acquisition of low-temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:1007-1012.

- Lyons JM. 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 24:445-466.
- Ma XW, Wu HX, Liu LQ, Yao QS, Wang SB, Zhan RL, Xing SS, Zhou YG. 2011. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae* 129: 102-107.
- Ma Q, Suo J, Guber DJ, Dong X, Han Y, Zhang Z, Rao J. 2014. Effect of hot water treatments on chilling injury and expression of a new C-repeat binding factor (CBF) in 'Hongyang' kiwifruit during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology* 97:102-110.
- Malacrida C, Valle EM, Boggio SB. 2006. Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar 'Micro-Tom'. *Physiologia Plantarum* 127: 10-18.
- Marangoni G, Palma T, Stanley DW. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology* 7: 193-217.
- Martin BR 1987. The regulation of enzyme activity. En: Martin BR (Ed) *Metabolic regulation, a molecular approach*. Blackwell Scientific, Oxford, p. 12-27
- Martinez-Garcia PJ, Fresnedo-Ramirez J, Parfitt DE, Gradziel TM, Crisosto CH. 2013. Effect prediction of identified SNPs linked to fruit quality and chilling injury in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Molecular Biology* 81:161-174.
- Martínez- Jávega JM, Cuquerella, J. 1984. Factors affecting cold storages of Spanish oranges and mandarines. *Proceeding Internat. Society Citriculture* 1:511- 514
- Martínez- Jávega JM, Mateos M, Navarro P. 1987. Factors affecting chilling injury of citrus fruit. *Proc. II World Congress of Food Technology*. Barcelona. 3:1419-1427.
- Martínez- Jávega JM, Cuquerella J, Navarro P. 1991. Influencia de la temperatura de conservación y condiciones de almacenamiento en la calidad final de mandarina "Nova". *III Congreso Mundial Tecnologías Alimentos*. Barcelona. Resúmenes.
- Martínez-Jávega JM, Del Río MA, Mateos M, Saucedo C. 1992. Influence of storage temperature and coating on the keeping quality for "Fortune" mandarines. *Proceedings International Society Citriculture* 3:1102-1103.
- Martínez-Jávega JM. 1995. Avances en el uso de productos químicos, embalajes y manejo de la temperatura para reducir desórdenes y alteraciones fisiológicas. *IV*

- Simposio Internacional de Manejo, Calidad y Fisiología Poscosecha de Fruta. Universidad de Chile. Publicaciones Misceláneas Agrícolas 42: 59-69.
- Martínez-Jávega JM, Cuquerella J, Del Río MA, Navarro P. 1997. Estudios de tratamientos cuarentenarios mediante bajas temperaturas en frutos cítricos. CYTED. Proyecto XI. 10, pp:15-23. La Habana (Cuba). Ed. C.Saucedo y R. Báez.
- Martínez- Jávega JM. 1997. La frigoconservación en naranjas y mandarinas. Revista Phytoma. 90: 136-140.
- Masibo M, He Q. 2009. Mango bioactive compounds and related nutraceutical properties – A review. Food Review International, 25:346-370.
- Matheyambath AC, Subramanian J, Paliyath G. 2016. Mangoes: Encyclopedia of Food and Health, University of Guelph, Guelph, ON, Canada: Elsevier 641-64pp.
- Matto AK, Modi VV. 1975. Palmitic acid activation of peroxidase and its possible significance in mango ripening. Biochimica et Biophysica Acta 397:318-330.
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. 1999. The alternative oxidase lower mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 96: 8271-8276
- McCollum TG, D'Aquino S, McDonald RE. 1993. Heat treatment inhibit mango chilling injury. HortScience 28:197-198.
- McDonald. 1994. Postharvest Technology of Tropical horticultural comodities procedings of the colloquium. HortScience 29:974-996.
- Medlicott A, Sigrist J, Sy O. 1990. Ripening of mango following low-temperature storage. Journal of the American Society for Horticultural Science 115: 430-434.
- Mejía LF, Martínez H, Betancourt J, Castrillón C. 2007. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. Ingeniería y Ciencia 3:41-62.
- Mellething WP, Chen M, D Borgic. 1982. In line application of porous wax coating materials to reduce frection discoloration of Bartlett and Anjou Pears. HortScience. 17: 215-217.
- Mencarelli F, Ceccantoni B, Bolini A, Anelli G. 1993. Influence of heat treatment on the physiological response of sweet pepper kept at chilling temperature. Acta Horticulturae 343:238-243.

- Mendoza DB, Willis BH. 1984. Mango: Fruit postharvest physiology and marketing in ASEAN. Assn. Southeast Asian Nations Food Handling Bureau, Kuala Lumpur, Malasya.
- Mirdehghan SH, Rahemi M, Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde JM, Zapata PJ, Serrano M, Valero D. 2007. Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: role of polyamines. *Postharvest Biology and Technology* 44: 19-25.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Molendijk AJ, Ruperti B, Palme K. 2004. Small GTPases in vesicle trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 694-700.
- Moller IM. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport nadph turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 52: 561–591.
- Montalvo E, Garcia HS, Tovar B, Mata M. 2007. Application of exogenous ethylene on postharvest ripening of refrigerated 'Ataulfo' Mangoes. *Food Science and Technology* 40:1466-1472.
- Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, Kwak SS, Kim DH, Nam,J, Bahk J, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Lim CO, Yun DJ. 2003. NDP kinase 2interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:358-363.
- Morga S, Lustre O, Tunac M, Bagalot H, Soriano R. 1979. Physico-chemical changes in Philippine Carabao mangoes during ripening. *Food Chemistry* 43:225-234.
- Morimoto R, Sarge RD, Abracaya K. 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. *Journal of Biology and Chemistry* 267:946-950.
- Muchiri DR, Mahungu SM, Gituanja SN. 2012. Studies on Mango (*Mangifera indica* L.) kernel fat of some Kenyan varieties in Meru. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 89:1567-1575.

- Nair S, Singh Z. 2003. Pre-storage ethrel dip reduces chilling injury, enhances respiration rate, ethylene production and improves fruit quality of 'Kensington Pride' mango. *Food Agriculture and Environment* 1:93-97.
- Nair S, Singh Z, Tan SC. 2004. Chilling injury in relation to ethylene biosynthesis in 'Kensington Pride' mango fruit. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79:82–90.
- Nover L. 1991. *Heat Shock Response*. CRC Press, Boca Raton, FL. CRC Press 5-334 pp.
- Offers JA. 1987. Defects. In: *Citrus diseases and defects found in the marketplace*. Licenced Citrus Survey and Consulting Bureau Publications, Papendrecht, The Netherlands p 41.
- Ohama N, Kusakabe K, Mizoi J, Zhao H, Kidokoro S, Koizumi S, Takahashi F, Ishida T, Yanagisawa S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2016. The transcriptional cascade in the heat stress response of Arabidopsis is strictly regulated at the level of transcription factor expression. *The Plant Cell* 28:181-201.
- Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2017. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in Plant Science* 22:53-65.
- Olkkonen VM, Stenmark H. 1997. Role of rab GTPases in membrane traffic. *International Reviews in Cytology* 176: 1-85.
- Ornelas J, Yahia E, Gardea A. 2008. Changes in external and internal color during postharvest ripening of "Manila" and "Ataulfo" mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCI time of flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology* 50:145-152.
- Palma JM, Corpas FJ, Del Rio LA. 2011. Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *Journal of Proteomics* 74:1230-1243.
- Palusa SG, Golovkin M, Shin SB, Richardson DN, Reddy ASN. 2007. Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in Arabidopsis. *New Phytologist* 174: 537-550.

- Pando-Robles V y Ferreira-Batista. 2007. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas Biotecnología V14 CS3.indd 98 p: 99-108. Link [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_09.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_09.pdf)
- Parkin KL, Marangoni A, Jackman RL, Yada RY, Stanley DW. 1989. Chilling injury, a review of possible mechanisms. *Journal of Food Biochemistry* 13:127-153.
- Pasqualini S, Paolocci F, Borgogni A, Morettini R, Ederli L. 2007. The overexpression of an alternative oxidase gene triggers ozone sensitivity in tobacco plants. *Plant Cell and Environment* 30: 1545-1556.
- Paull RE, Chen NJ. 2000. Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* 21: 21-38.
- Pavoncello D, Lurie S, Droby S, Porat R. 2001. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitarum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiologia Plantarum* 111:17-22.
- Pesis E, Aharoni D, Aharon Z, Ben-Arie R, Aharoni N, Fuchs Y. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19:93–101.
- Phakawatmongkol W, Ketsa S, van Doorn WG. 2004. Variation in chilling injury among mango cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 32:115-118.
- Ponce de León L, Bózquez ME. 1997. Técnicas de almacenamientos. Manejo post-cosecha del mango. Ed. EMEX. A. C. p. 22 -24.
- Popenoe W. 1974. *Manual of tropical and subtropical fruits*, McMillan, New york. 474 p.
- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR. 1994. Acclimation, hydrogen peroxide and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedling. *Plant Physiology* 105:619-627.
- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR. 1995. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling acclimated maize seedlings. *Plant Physiology* 108: 1597-1605.
- Purvis AC. 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 100: 165–170.

- Quintero V, Giraldo G, Lucas J, Vasco J. 2013. Caracterización fisicoquímica del mango común (*Mangifera indica* L.) durante su proceso de maduración. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 11(1):10-18.
- Ranieri A, Castagna A, Baldam B, Soldatini GF. 2001. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany* 52: 25-35.
- Reddy JK, Hashimoto T. 2001. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annual Review of Nutrition* 21:193-230.
- Renaut J, Lutts S, Hoffmann I, Hausman JF. 2004. Responses of popular to chilling temperatures; proteomic and physiological aspects. *Plant Biology* 6:81-90
- Renuse S, Harsha HC, Kumar P, Acharya PK, Sharma J, Goel R, 2012. Proteomic analysis of an unsequenced plant—*Mangifera indica*. *Journal of Proteomics* 75:5793-5796.
- Ribas-Cabo M, Aroca R, González-Meler MA, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M. 2000. The electro partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivar of maize differing in chilling sensitivity. *Plant Physiology* 122: 199-204.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.
- Sabehat A, Weiss D, Lurie S. 1996. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiology* 110: 531-547.
- Sabehat A, Lurie S, Weiss D. 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiology* 117:651-658.
- SAGARPA 2009. Identificación de las necesidades logísticas para la comercialización del sistema producto Mango en la Región Noroeste. Link: [www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios.../Mangos.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios.../Mangos.pdf). Consultado 15 de Marzo del 2016.

- Safizadeh MR, Rahemi M, Aminlari M. 2007. Effect of postharvest calcium and hot-water dip treatments on catalase, peroxidase and superoxide dismutase in chilled lisbon lemon fruit. *International Journal of Agricultural Research* 2: 440-449.
- Sala JM, Lafuente MT. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruit to chilling. *Postharvest Biology and Technology* 20: 81-89.
- Salazar-Salas NY, Valenzuela-Ponce L, Vega-Garcia MO, Pineda-Hidalgo KV, Vega-Alvarez M, Chavez-Ontiveros J, Delgado-Vargas F, Lopez-Valenzuela JA. 2017. Protein changes associated with chilling tolerance in tomato fruit with hot water pre-treatment. *Postharvest Biology and Technology* 134:23-30.
- Saltveit ME, Morris LL. 1990. Overview of chilling injury of horticultural crops. In: Chien Yi Wang (Ed.), *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 3-15.
- Sanchez-Ballesta MT, Gosalbes MJ, Rodrigo MJ, Granell A, Zacarias L, Lafuente MT. 2006. Characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology* 40:133-140.
- Sanchez-Ballesta MT, Romero I, Jiménez JB, Orea JM, González-Ureña Á, Escribano MI, Merodio, C. 2007. Involvement of the phenylpropanoid pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO<sub>2</sub> levels. *Postharvest Biology and Technology* 46: 29-35.
- Saranwong S, Sornsrivichai J, Kawano S. 2004. Prediction of ripe-stage eating quality of mango fruit from its harvest quality measured nondestructively by near infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* 31:137-145.
- Saucedo CL Arévalo. 1997. Fisiología y tecnología post-cosecha de mango. *Memorias I Taller regional de manejo de productos de interés para el trópico*. San José de Costa Rica. p. 1-10.
- Schirra M, Agabbio M, D'Hallewin G, Pala M, Ruggiu R. 1997. Response of Tarocco oranges to picking date, postharvest hot water dips, and chilling storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3216–3220.
- Schirra M, D'hallewin G, Ben-Yehoshua, S, Fallik E. 2000. Host-pathogen interaction modulated by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology* 21:71-85.

- Schlumbaum A, Mauch F, Vogeli U, Boller T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365- 367.
- Schmilovitch Z, Mizrach A, Hoffman A, Egozi H, Fuchs. 2000. Determination of mango physiological indices by near-infrared spectrometry. *Postharvest Biology and Technology* 19:245-252.
- Schweizer P, Vallelian-Bindschedler L, Mosinger E. 1995. Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 47:51-66
- Sevillano L, Sanchez-Ballesta MT, Romojaro F, Flores FB. 2009. Physiological hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89:555-573.
- Seymour G, N'Dia M, Wainwright H, Tucker G. 1990. Effects of cultivar and harvest maturity on ripening of mangoes during storage. *Journal of Horticultural Science* 65:479-483.
- Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA. 1993. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall, Nueva York, pp.83-106
- Shellie KC, Mangan RL. 1994. Disinfestation: effect of non-chemical treatments on market quality of fruit. In: Champ, B.C., Highly, E., Johnson, G.I. (Eds.), *Postharvest Handling of Tropical Fruit*. ACIAR Proceedings No. 50. ACIAR, Canberra, Australia, pp. 304-310.
- Shellie KC, Mangan RL. 2002. Hot water immersion as a quarantine treatment for large mangoes: artificial versus cage infestation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:430-434.
- Shewfelt RL, Del Rosario BA. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortScience* 35:575-579.
- SIAP 2017. Link <http://www.siap.gob.mx/>. (Consultado el 15 de Marzo del 2017).
- Singh Z, Singh RK, Sane VA, Nath P. 2013. Mango- postharvest biology and technology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 32:217-236.
- Sivakumar D, Jiang Y, Yahia EM. 2010. Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Research International* 44:1254-1263.

- Sivankalyani V, Feygenberg O, Diskin S, Wright B, Alkan N. 2016a. Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. *Postharvest Biology and Technology* 111:132-139.
- Sivankalyani V, Sela N, Feygenberg -O, Zemach H, Maurer D, Alkan N. 2016b. Transcriptome dynamics in mango fruit peel reveals mechanisms of chilling stress. *Frontiers in Plant Science* 7:1-17
- Slaughter DC. 2009. Nondestructive maturity assessment methods for mango: A Review of Literature and Identification of Future Research Needs. *Biological and Agricultural Engineering* 1-18.
- Soleimani M. 2013. Mitigation of postharvest chilling injury in tomato fruit by prohexadione calcium. *Journal of Food Science and Technology* 50:1029-1033.
- Stanley DW. 1991. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30: 487-553.
- Stermer BA, Hammerschmidt R. 1984. Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerinum* and enhances peroxidase activity in cucumbers. *Physiology Plant and Pathology* 25: 239–249.
- Sun W, Motangu MV, Verbruggen, N. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577:1-9.
- Sundaramoorthy R, Micossi E, Alpey MS, Germain V, Bryce JH, Smith SM, Leonard GA, Hunter WN. 2006. The crystal structure of a plant 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals the potential for redox control of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Journal of Molecular Biology* 359:347-357.
- Takahama U. 1992. Hydrogen peroxide scavenging systems in vacuoles of mesophyll cells of *Vicia faba*. *Phytochemistry* 31:1127-1133.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews* 81: 153-208.
- Talcott ST, Moore JP, Lounds-Singleton AJ, Percival SS. 2005. Ripening associated phytochemical changes in mangos (*Mangifera indica*) following thermal quarantine and low-temperature storage. *Journal of Food Science* 70:337-341.

- Tatsumi Y, Maeda K, Murata T. 1987. Morphological changes in cucumber fruit surfaces associated with chilling injury. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 56:187-192.
- Taylor NE, Glocka P, Liang M, Cowley AWJr. 2006. NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to saltsensitive hypertension in Dahl S rats. *Journal of Hypertension* 47: 692-698.
- Tharanathan RN, Yashoda HM, Prabha TN. 2006. Mango (*Mangifera indica* L.), “the king of fruits” – A review. *Food Reviews International* 22: 95–123.
- Thomashow MF. 1999. Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571:599.
- Timperio AM, Egidi MG, Zolla L. 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* 71:391-411.
- Toraskar MV, Modi VV. 1984. Peroxidase and chilling injury in banana fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:1352-1354.
- Tovar B, Garcia H, Mata M. 2001. Physiology of pre-cut mango. I. ACC and ACC oxidase activity of slices subjected to osmotic dehydration. *Food Research International* 34: 207-215.
- Umbach AL, Lacey EP, Richter SJ. 2009. Temperature-sensitive alternative oxidase protein content and its relationship to floral reflectance in natural *Plantago lanceolata* populations. *New Phytology* 181: 662-671.
- USDA. 2016. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory Home Page. Consultado el 16 de Abril de 2016. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
- Vanlerberghe G. 2013. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 6805-6847.
- Vasquez-Salinas C, Lakshminarayana S. 1985. Compositional changes in mango fruit during ripening at different storage temperatures. *Journal of Food Science* 50: 1646-1648.

- Vela G, Leon DM, Garcia HS, De la mid J. 2003. Polyphenol oxidase activity during ripening and chilling stress in Manila mangoes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78: 104-107.
- Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42:579-620.
- Vogt T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3:2-20
- Von Koskull- Döring P, Scharf KD, Nover L. 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science* 12: 452-457
- Wang CY. 1993. Alleviation of chilling injury in horticultural crops. En: Wang CY (Ed.), *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press, Bacon Raton, FL, p. 282–283.
- Wang B, Wang J, Liang H, Yi J, Zhang J, Lin L. 2008. Reduced chilling injury in mango fruit by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the antioxidant response. *Postharvest Biology and Technology* 48:172-181.
- Wang J, Rajakulendran N, Amirsadeghi S, Vanlerberghe GC. 2011. Impact of mitochondriasingal alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiologia Plantarum* 142: 339-351.
- Wang H, Qian Z, Ma S, Zhou Y, Patrick JW, Duan X, Jiang Y, Qu H. 2013. Energy status of ripening and postharvest senescent fruit of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *BMC Plant Biology* 13: 55.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E. 1996. Evolution, structure and function on the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 325–338.
- Wienkoop S, Morgenthal K, Wolschin F, Scholz M, Selbig J, Weckwerth W. 2008. Integration of metabolomic and proteomic phenotypes: analysis of data covariance dissects starch and RFO metabolism from low and high temperature compensation response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Proteomics* 7:1725-1736.
- Wills BH, McGlasson WB, Graham D, Lee TH, Hall EG. 1989. Postharvest. An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables. U.S.A. 174
- Wolfe J. 2006. Chilling injury in plants – the role of membrane lipid fluidity. *Plant, Cell & Environment* 1: 241–247.
- Woolf AB, Watkins CB, Bowen JH, Lay-Yee M, Maindonald JH, Ferguson IB. 1995. Reducing external chilling injury in stored ‘Hass’ avocados with dry heat

- treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120:1050-1056.
- Yahia EM, Ornelas-Paz JJ, Ariza FR. 2006. *The Mango*. Editorial Trillas, México City, Mexico, pp. 224.
- Yang Z. 2002. Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 2787–2797.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. 2000. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.
- Yimyong S, Datsenka TU, Handa AK, Seraypheap K. 2011. Hot water treatment delays ripening-associated metabolic shift in 'Okrong' mango fruit during storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136:441–451.
- Yi-Wang C. 1994. Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology* 4: 65-73.
- Zainal Z, Tucker GA, Lycett GW. 1996. A rab11-like gene is developmentally regulated in ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Biochimica et Biophysica Acta* 1314: 187–190.
- Zhang C, Fei SZ, Arora R, Hannapel DJ. 2010. Ice recrystallization inhibition proteins of perennial ryegrass enhance freezing tolerance. *Planta* 232: 155–169.
- Zhang Z, Gao Z, li M, Hu M, Gao H, Yang D, Yang B. 2012. Hot water treatment maintains normal ripening and cell wall metabolism in mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *HortScience* 47:1466-1471.
- Zhang Y, Butelli E, De Stefano R, Schoonbeek HJ, Magusin A, Pagliarani C, Wellner N, Hill L, Orzaez D, Granell A, Jones JDG, Martin C. 2013. Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Current Biology* 23: 1094-1100.
- Zhao Z, Jiang W, Cao, J, Zhao Y, Gu Y. 2006. Effect of cold-shock treatment on chilling injury in mango (*Mangifera indica* L. cv. "Wachengp") fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:2458-2462.

- Zhao Z, Cao J, Jiang W, Gu Y, Zhao Y. 2009. Maturity-related chilling tolerance in mango fruit and the antioxidant capacity involved. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89:304-309.
- Zhao Y, Chen J, Tao X, Zheng X, Ma L. 2014. The possible role of BAX and BI-1 genes in chilling-induced cell death in cucumber fruit. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1345-1351.
- Zhu S, Ji Zuoliang, Lu W, Zhang Z. 2003. The link between heat-induced polypeptides and chilling tolerance in mangoes (*Mangifera indica* L.), with evidence from the same fruit partially heated. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 7:523-527.

## ABREVIATURAS

%	Por ciento, porcentaje
2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis)
ABT	Almacenamiento a bajas temperaturas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALB2S	Albumina 2S
AOX	Oxidasa Alternativa
APX	Ascorbato peroxidasa
ARN	Ácido ribonucleico
ASR	Abscisic stress ripening-like protein
ATP	Adenosín trifosfato (adenosine triphosphate)
$\beta$ -1,3-GLU	$\beta$ -1,3-Glucanasa
$\beta$ -GAL	$\beta$ – Galactosidasa
BL	Brasínolido
CAT	Catalasa
CHAPS	Ácido 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfónico
CHS	Chalcona sintasa
cm	Centímetro (s)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cv	Cultivar
DF	Daño por frío
DTT	Ditiotreitol

EROs	Especies reactivas del oxígeno
EST	Segmentos de secuencias expresadas (expressed sequence tag)
FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (food and agriculture organization of the united nations)
g	Gramo (g)
<i>g</i>	Fuerza gravitacional
GR	Glutación reductasa
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HsfA1	Factor de transcripción de choque térmico A1
HSP	Proteína de choque térmico (inglés Heat Shock Protein)
HypProt	Hypothetical protein CICLE v
IDF	Índice de daño por frío
IEF	Isoelectroenfoque
IsoCH	Isocorismato hidrolasa
KAT	Acetil-CoA aciltransferasa
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
LE	Lixiviación de electrolitos
LSD	Diferencia mínima significativa (least significant difference)
M	Molar, molaridad
m/z	Masa/carga

Ma	Miliampere (s)
MBD9	Methyl-CpG-binding domain-containing protein 9
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleíco mensajero
MS	Espectrometría de masas (mass spectrometry)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológico
ND	Nivel de daño
NDP	Nucleósido difosfato
NDPK	Nucleósido difosfato kinasa
<u>N<sub>2</sub></u>	Nitrógeno
N	Newton (s)
ng	Nanogramo (s)
NO	Óxido nítrico
No.	Número
°	Grado (s)
O <sub>2</sub>	Oxígeno
°C	Grado (s) centígrado (s)

OEE	Oxigen evolving enhacer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDS	Fitoeno desaturasa
pH	Potencial de hidrógeno
Pi	Punto isoeléctrico
PL	Pectato liasa
PM	Peso molecular
PME	Pectinmetil esterasa
POX	Peroxidasa
ppm	Partes por millón
PR	Proteínas relacionadas a patogénesis
PRx	Peroxiredoxina
Q	Cuadrupolo (quadropole)
Redox	Óxido-reducción
SDS	Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulphate)
sHSP	Proteína de choque térmico de bajo peso molecular (small heat shock protein)
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TDS	Dehidrina tipo II Sk2
TIL	Lipocalina inducida por temperatura
TH	Tratamiento hidrotérmico
TI	Trampa de iones

Ton	Tonelada (s)
TPI	Triosa fosfato isomerasa (triose phosphate isomerase)
TPx	Tioredoxin peroxidasa
TR	Temperatura de refrigeración
UbOX	Ubiquinol oxidasa
UI	Unidades internacionales
USA	Estados Unidos de America (United States of America)
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)
UV	Ultravioleta
V	Volt (s)
µg	Microgramo (s)
µL	Microlitro (s)