

CAMBIOS DE LA CUTÍCULA DURANTE LA ONTOGENIA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L.

CUTICULAR CHANGES DURING THE ONTOGENY OF *Mangifera indica* L. FRUITS

D. Petit-Jiménez¹, A. González-León², G. González-Aguilar²,
R. Sotelo-Mundo² y R. Báez-Sañudo^{2*}

¹ Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto-Estado Lara, Venezuela. ² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Hermosillo-Sonora, México.

* Autor para correspondencia (rbaz@cascabel.ciad.mx)

RESUMEN

La cutícula cubre la superficie de los frutos y una de sus funciones es la de restringir la pérdida de agua en forma de vapor, por medio de sus características físicas y químicas. En este trabajo se determinaron los cambios ocurridos en la cutícula durante la ontogenia de los frutos de mango (*Mangifera indica* L.), de los cultivares 'Tommy Atkins', 'Kent' y 'Keitt'. Los frutos fueron muestrados al azar de un huerto ubicado en Navojoa, Sonora, México. El estudio se hizo en dos fases: durante el crecimiento de los frutos y en el almacenamiento. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones y el muestreo realizado fue aleatorio. En cada muestra se determinaron las variables: contenido de ceras (epicuticulares e intracuticulares) y cutina, masa y grosor de cutícula, y ultraestructura y permeabilidad de la cutícula durante la ontogenia del fruto. Los resultados indicaron diferencias entre cultivares. El contenido de ceras epicuticulares se incrementó en todos los cultivares durante el crecimiento del fruto y en el almacenamiento presentó cambios a través del tiempo de la evaluación. En promedio, la cutina representó entre 60 y 80 % de la masa total de la cutícula y el resto correspondió a las ceras cuticulares. La ultraestructura de las ceras cuticulares mostró diferencias varietales en la cosecha: 'Tommy Atkins' y 'Kent' presentaron mayor proporción de zonas cristalinas (82.6 %) mientras que en 'Keitt' fue principalmente amorfa (74.1 %). La mayor eficiencia de la cutícula en regular la pérdida de agua, se observó al momento de la cosecha y se relacionó con la ultraestructura y el contenido de las ceras cuticulares.

Palabras claves: *Mangifera indica*, cutícula, ceras cuticulares, ultraestructura, permeabilidad.

SUMMARY

Cuticle covers fruits surface and one of its functions is to restrict water loss as water vapor. This barrier is related to the physical and chemical properties of the cuticle. In this work we studied cuticle changes during the ontogeny of 'Tommy Atkins', 'Kent' and 'Keitt' mango (*Mangifera indica* L.) fruits. Fruits were randomly sampled from an orchard at Navojoa, Sonora, México. This study was done at two stages: during fruit growth and storage. A completely

randomized design with three replications was used. The content of waxes (epicuticular and intracuticular) and cutin, cuticle weight and thickness, surface ultrastructure and permeability of cuticles along fruit ontogeny were measured in each sample. Results showed differences among cultivars regarding the variables analyzed. Epicuticular wax content increased during fruit growth, while during storage it presented changes along the evaluation. Cutin represented between 60 and 80 % of cuticle weight, while the rest corresponded to waxes. Waxes ultrastructure showed varietal differences at harvest: 'Tommy Atkins' and 'Kent' presented major proportion of crystalline zones (82.6 %), whereas in 'Keitt' it was mostly amorphous (74.1 %). The best efficiency of cuticles in regulating water losses was at harvest and it was related to wax ultrastructure and WAX content.

Index words: *Mangifera indica*, cuticle, cuticulars waxes, ultrastructure, permeability.

INTRODUCCIÓN

El fruto de mango (*Mangifera indica* L.) al igual que todas las partes aéreas de las plantas, está cubierto por la cutícula (Bally, 1999). La cutícula es un elemento estructural esencial y de importancia funcional y ecológica por ser el primer tejido que interacciona con el ambiente (Kunst y Samuels, 2003). Desde el punto de vista estructural, la cutícula está compuesta por una matriz de cutina, en la cual se entrecruzan las ceras intracuticulares y es cubierta por las ceras epicuticulares (Heredia, 2003; Jeffree, 1996; Post-Beittenmiller, 1996). Su integridad es afectada por factores genéticos, ambientales, fisiológicos y de manejo, tanto en campo como en postcosecha (Jenks *et al.*, 2002). Su estructura, composición química y grosor cambian a través del desarrollo del fruto (Wiedermann y Neinhuis, 1998) y varían ampliamente entre especies (Jeffree, 1996).

El papel fisiológico de la cutícula incluye la regulación en la transpiración y mantenimiento del balance de agua (Veraverbeke *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003), regulación del intercambio de gases (Kolattukudy, 1996), protección contra patógenos y daños mecánicos (Commenil *et al.*, 1997) y protección contra la radiación ultravioleta y agentes contaminantes (Barnes *et al.*, 1996; Holroyd *et al.*, 2002). Además, se asocia con algunos desórdenes en el exocarpo de los frutos (Aloni *et al.*, 1998), como los daños ocasionados por frío (Pesis *et al.*, 2000).

La resistencia que ofrece la cutícula a los daños mecánicos, a la difusión de gases, a los cambios en permeabilidad al agua y a la penetración de microorganismos, no dependen específicamente de su grosor, sino más bien de los cambios de la estructura cuticular (Knoche *et al.*, 2004; Rogiers *et al.*, 2004), de la variación de sus componentes (principalmente lípidos solubles cuticulares) y las proporciones en que éstos se encuentran (Hauke y Schreiber, 1998; Riederer y Schreiber, 2001; Verardo *et al.*, 2003; Matas *et al.*, 2004; Vogg *et al.*, 2004; Schreiber, 2005).

El comportamiento de los componentes estructurales de la cutícula en diversas especies fue investigado por Jeffree (1996), Casado y Heredia (2001), Jetter y Schäffer (2001) y Verardo *et al.* (2003). Sin embargo, los estudios sobre los cambios que ocurren en la cutícula del mango durante la ontogenia del fruto son escasos (Bally, 1999; Gazzola *et al.*, 2004).

Es de interés el conocimiento de los cambios en la cutícula durante la ontogenia de fruto del mango, de tal forma que sirvan de base para la búsqueda de un manejo efectivo para mantener la calidad de los frutos. Con el fin de contribuir al conocimiento de la cutícula del mango, se evaluaron sus cambios asociados a la ontogenia en los frutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron cinco árboles de cada cultivar, de acuerdo con su ciclo de la cosecha: 'Tommy Atkins' (temprana), 'Kent' (intermedia) y 'Keitt' (tardía). El muestreo se hizo en el año 2004, en un huerto experimental establecido en el Valle del Mayo, Sonora, México. La zona se encuentra localizada geográficamente en las coordenadas 27° 00' LN y 109° 30' LO, a una altitud de 39 msnm. La precipitación en la región fluctúa entre 200 y 400 mm anuales, y 70 % se concentra en los meses de julio a septiembre y el resto en los meses de diciembre y enero. La temperatura presenta valores de 23 a 27 °C en promedio anual; la evapotranspiración potencial alcanza valores de

2600 mm anuales y la humedad relativa es de 58 % en promedio.

La textura del suelo en el sitio experimental es migajón-limoso de 0 a 48 cm y de 85-123 cm, y franco de 48-85 cm y de 123-200 cm. El huerto está formado por 10 variedades de mango de seis años, plantadas a una distancia de 5 m entre plantas y 4.5 m entre hileras, con un total de 300 árboles injertados; cuenta con un sistema de riego presurizado, con un microaspersor en cada árbol; la frecuencia del riego se proporcionó con base en humedad aprovechable (entre 40 y 50 %) presente en el suelo, la cual fue medida con tensiómetros establecidos a 45 y 60 cm de profundidad. La fertilización se llevó a cabo durante el riego, con la dosis de 28N-9P-23K-1.26 Ca g por árbol por mes (Ramírez *et al.*, 2004).

El trabajo se llevó a cabo en dos fases: durante la etapa de crecimiento de los frutos y durante el almacenamiento. En la primera, la cosecha de los frutos se hizo a partir de 15 d posteriores al amarre, con muestreos quincenales hasta la madurez fisiológica, la cual se presentó a los 90, 120 y 150 d en 'Tommy Atkins', 'Kent' y 'Keitt', respectivamente. En la segunda fase, los cultivares se almacenaron en condiciones que simulaban las de mercadeo (20 °C y 60 a 65 % HR), con evaluaciones cada 3 d hasta la senescencia; ésta se presentó a los 27, 24 y 18 d durante el almacenamiento en 'Tommy Atkins', 'Kent' y 'Keitt', respectivamente.

Los frutos muestreados se empacaron en bolsas de papel y fueron trasladados en transporte refrigerado al laboratorio de La Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) en Hermosillo, Sonora. En el laboratorio se eligieron los mangos visualmente libres de daños y se homogenizó la muestra por el tamaño de los mismos. En cada muestra se midieron las variables: tamaño del fruto, contenido de ceras (epicuticulares e intracuticulares) y cutina, masa y grosor de la cutícula, y ultraestructura y permeabilidad de la cutícula.

Procedimientos de medición

Tamaño del fruto. Se determinó por el método descrito por Vásquez-Caicedo *et al.* (2002), mediante el peso (g), la longitud (mm) y los diámetros máximo y mínimo (mm). El área se calculó de acuerdo con los cambios de forma que ocurrieron durante la ontogenia; en la etapa inicial del crecimiento (en las tres primeras evaluaciones) se utilizó la fórmula para un elipsoide y para el resto del estudio, la de un ovoide.

Extracción y cuantificación de ceras epicuticulares.

Las ceras epicuticulares se determinaron con el método descrito por Riederer y Schneider (1990). Los frutos se sumergieron en 200 mL de cloroformo a 45 °C durante 1 min. Las disoluciones se filtraron con papel Wathman Núm. 1 y se evaporaron a un volumen aproximado de 5 mL que se transfirieron a tubos previamente tarados, y se dejaron secar en una estufa a 55 °C durante 12 h. La masa del residuo seco representó las ceras epicuticulares totales del fruto, las cuales se expresaron como $\mu\text{g cm}^{-2}$ de área del fruto.

Extracción de cutículas. Ésta se realizó con el método descrito por Schönherr y Riederer (1986), al obtener del exocarpo de los frutos aproximadamente 30 discos de 1.13 cm^2 mediante un sacabocados. Los discos se incubaron por 72 h en un envase de plástico que contenía una disolución digestora de 1 g de cloruro de zinc (ZnCl_2) con 1.7 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado, y se agitó periódicamente. Se lavaron varias veces con agua destilada y posteriormente se transfirieron a una solución de ácido bórico (H_3BO_3) a 2 % durante 24 h, con varias agitaciones para eliminar el resto de materia orgánica adherida a ellas, se lavaron nuevamente con agua destilada y se colocaron en una nueva solución de H_3BO_3 (2 %) hasta que se utilizara.

Extracción y cuantificación de ceras intracuticulares. Se usaron cinco discos de cutículas aisladas obtenidas con el método antes descrito. Después de lavadas con agua destilada, se colocaron en tubos previamente tarados que contenían cloroformo ($\geq 200 \mu\text{L cm}^{-2}$ de cutícula) y se incubaron en un baño de agua a 80 °C por 30 min. La disolución se filtró en papel Wathman Núm. 1 y se transfirió a tubos tarados que se dejaron secar en estufa a 55 °C durante 12 h. La cantidad total de ceras intracuticulares se obtuvo mediante el peso del residuo seco, y se expresó como $\mu\text{g cm}^{-2}$ de cutícula expuesta (Riederer y Schneider, 1990).

Masa de cutículas y contenido de cutina. La masa de cutículas se registró en cutículas aisladas; después de ser lavadas con agua destilada se colocaron cinco cutículas en tubos previamente tarados, y se dejaron secar en estufa a 55 °C durante 12 h, y se expresó en $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Báez *et al.*, 1993). El contenido de cutina se determinó por diferencia de la masa seca de la cutícula y el contenido de las ceras; la masa seca representó la cantidad de cutina, en $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Freeman *et al.*, 1979).

Grosor de cutículas. Se midió en cutículas aisladas; se utilizaron cinco por muestra lavadas anteriormente con agua destilada, se colocaron en tubos y se dejaron secar en estufa a 55° C durante 1 h; posteriormente se hizo la me-

dición con un micrómetro Miltutoyo graduado con una precisión de milésimas de pulgadas, y los resultados se expresaron en μm (Báez *et al.*, 1993).

Ultraestructura de la cutícula. Se evaluó con el método descrito por Suita de Castro *et al.* (2002). De cada fruto de mango se seleccionó la parte superior del mismo y se seccionó con bisturí en tres segmentos de 1 cm^2 del tejido fresco del exocarpo; los segmentos se colocaron sobre papel filtro en un desecador por 72 h. Después de esta deshidratación, se montaron en una lámina de cobre y se fijaron con adhesivo doble faz para metalizarlas con oro por 60 s con un equipo JEOL modelo JFC-1200 Fine.

Las muestras se analizaron en el laboratorio de microscopía electrónica de barrido del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), donde se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM 6360 LV a 20 (kV) de voltaje de aceleración. Se examinaron tres áreas en cada muestra, con cuatro campos de aumento 50, 150, 1000 y 4000x, en cada evaluación. Se hicieron un total de 36 observaciones por unidad experimental, en cada cultivar. Se evaluó la morfología de la superficie cuticular, la forma y arreglo de los cristales de las ceras, con base en la clasificación de Barthlott *et al.* (1998). Se determinó el tipo de borde de las placas cuticulares, mediante el criterio de Hallam y Chambers (1970). Para analizar las imágenes se utilizó el programa Image Processing and Análisis in Java (2005), que determinó el porcentaje (%) de zona cristalina y amorfa de la superficie cuticular, según el método de clasificación Thresholding (Molina, 1998).

Permeabilidad de cutícula. Se midió en 12 cutículas aisladas por unidad experimental, cada una de 1.13 cm^2 . Las mismas fueron adheridas en láminas de teflón cubriendo cuatro orificios de 0.33 cm^2 , y se aplicó silicona líquida alrededor de los orificios. Posteriormente se montaron sobre cajas de Petri plásticas de 5 cm de diámetro a las que previamente se le habían añadido 5 mL de agua destilada, y fueron selladas herméticamente con pinzas de presión. Dicho sistema se incubó a 25 ± 1 °C y se pesaron a intervalos de 1 h durante 8 h. Los datos se expresaron como mg de agua perdida en forma de vapor por cm^2 de cutícula expuesta (Báez *et al.*, 1993).

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar con tres repeticiones y muestreo aleatorio. Los tratamientos fueron los cultivares de mango seleccionados ('Tommy Atkins', 'Kent' y 'Keitt'), que se compararon estadísticamente cada 15 d en la etapa de crecimiento, y cada tres d durante el almacenamiento. Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico Number Cruncher Statistical Systems

versión 6.0 (NCSS, 2000) mediante análisis de varianza (ANOVA) con $\alpha \leq 0.05$. Se hicieron comparaciones de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$). Se calcularon las correlaciones de Pearson entre la permeabilidad y el contenido de ceras epicuticulares e intracuticulares, contenido de cutina, el peso y grosor de cutículas, con la finalidad de establecer la posible asociación de las características cuticulares con la permeabilidad durante la ontogenia de los frutos. Para los datos cualitativos (cobertura de la cera) se utilizó el método de χ^2 -cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido total de ceras epicuticulares e intracuticulares

Durante el crecimiento de los frutos, el contenido de ceras epicuticulares se incrementó en todos los cultivares (Figura 1A). Este aumento se relacionó con la deposición continua de los materiales que la conforman. Se observaron diferencias significativas entre cultivares; 'Tommy Atkins' presentó el valor más alto ($227 \mu\text{g cm}^{-2}$), seguido de 'Keitt' ($193 \mu\text{g cm}^{-2}$) y de 'Kent' ($141 \mu\text{g cm}^{-2}$). Estas diferencias se asocian a las características intrínsecas de los cultivares, ya que éstos estaban bajo las mismas condiciones ambientales, edad de las plantas y de manejo cultural. Kolattukudy (2003) y Curry (2005) encontraron un comportamiento similar en el incremento de ceras epicuticulares en frutos de manzana (*Malus sylvestris* Mill), desde el crecimiento hasta la madurez. De igual modo, Jeffree (1996) afirmó que la cantidad de cera depositada en la superficie difiere entre especies.

El contenido de ceras epicuticulares también mostró deficiencias entre cultivares y variaciones temporales durante el almacenamiento de los frutos (Figura 1B), variaciones que se relacionan con cambios de estructura y composición química. Wiedermann y Neinhuis (1998) señalaron que las ceras epicuticulares se acumulan durante el crecimiento de los frutos como laminillas aplanadas, que se hacen duras y quebradizas, y en la maduración se rompen y forman agregados muy pequeños por lo que disminuye su función como barrera protectora.

En el contenido de las ceras intracuticulares durante el crecimiento de los frutos se presentaron cambios a partir de los 15 d del amarre (DDA) hasta la cosecha, en todos los cultivares, y se observaron diferencias significativas entre los mismos (Figura 1 C). Durante el almacenamiento de los frutos, al tercer día se observó una disminución en el contenido de las ceras intracuticulares en todos los cul-

vares, seguido de un ligero incremento al sexto, para volver a descender al noveno día (Figura 1 D). En 'Tommy Atkins' no varió significativamente y presentó los valores más bajos ($53 \mu\text{g cm}^{-2}$ a los 12 d).

Los cambios observados en el contenido de ceras cuticulares se asocian con la dinámica de síntesis y con alteraciones en la estructura química de sus componentes (Riederer y Markstädter, 1996).

El contenido de las ceras cuticulares en las plantas se relacionan con la regulación a la pérdida de agua en forma de vapor, y se han demostrado diferencias entre especies. Knoche *et al.* (2004) reportaron ceras intracuticulares en frutos de cereza (*Prunus avium* L.) y Casado y Heredia (1999) a ceras epicuticulares en uva (*Vitis vinifera* L.).

Masa cuticular, contenido de cutina y grosor de cutícula

La masa de la cutícula se incrementó durante el crecimiento, con diferencias significativas entre cultivares ya que 'Tommy Atkins' superó a los demás cultivares. 'Tommy Atkins' alcanzó un valor máximo de $4513 \mu\text{g}$ a los 45 DDA, seguido por 'Kent' con $2316 \mu\text{g}$ a los 90 DDA y por 'Keitt' con $1609 \mu\text{g}$ a los 135 DDA. Un comportamiento contrastante fue reportado en uva por Comenil *et al.* (1997), quienes observaron una disminución de la masa cuticular durante el crecimiento del fruto. En la etapa de almacenamiento, la masa cuticular también mostró diferencia significativa entre cultivares (valores no mostrados), donde nuevamente 'Tommy Atkins' superó a los otros dos cultivares, además hubo variaciones temporales, sobre todo en 'Tommy Atkins'.

Bondada *et al.* (2006) asociaron el contenido de la masa cuticular con la penetración de urea en hojas de cítricos (*Citrus paradisi* Macf.) ya que ésta tendió a disminuir al incrementarse la masa cuticular. Oh *et al.* (1999) señalaron el efecto significativo del contenido de la masa cuticular en chile 'Pimiento' (*Capsicum annum* L.) sobre la infección con *Colletotrichum gloesporoides*.

El contenido de cutina mostró un comportamiento similar al registrado por la masa cuticular (valores no mostrados), y representó de 60 a 80 % de la masa total de la cutícula. Según Heredia (2003), la cutina es el principal constituyente de la cutícula en plantas y actúa como barrera de defensa a las agresiones físicas, químicas y biológicas.

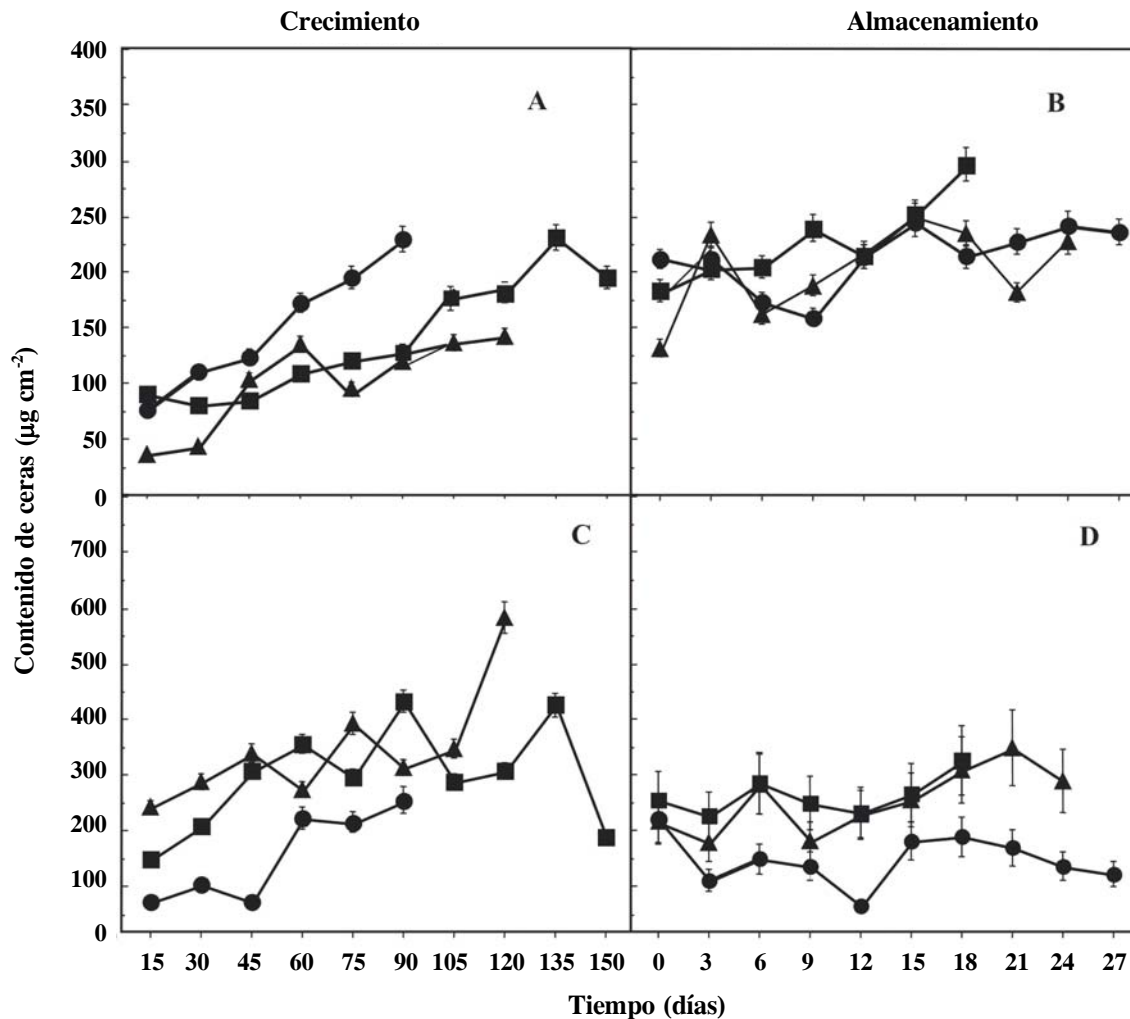


Figura 1. Contenido de ceras en los frutos de mango: ● 'Tommy Atkins', ▲ 'Kent' y ■ 'Keitt'. Epicuticulares durante el crecimiento (A) y el almacenamiento (B). Intracuticulares durante el crecimiento (C) y el almacenamiento (D). Barras verticales indican el error estándar

El grosor de la cutícula se incrementó desde los 15 DDA hasta la cosecha, con variaciones a través de tiempo (valores no mostrados). El cultivar 'Keitt' presentó los mayores valores ($3.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$) en la cosecha, mientras que en 'Kent' y 'Tommy Atkins' fueron de $2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ y $2.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$, respectivamente. Bargel y Neinhuis (2005) observaron un comportamiento similar en el incremento del grosor de la cutícula en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tal incremento ha sido relacionado con la acumulación de cutina y ceras cuticulares durante el crecimiento del frutos (Baker *et al.*, 1982).

El grosor de la cutícula varía entre especies y órganos de una misma planta (Jeffree, 1996). Knoche *et al.* (2004) y Rogiers *et al.* (2004) afirman que la resistencia que ofrece la cutícula a los daños mecánicos, a la difusión de gases, a los cambios en permeabilidad al agua y a la penetración de microorganismos, son características que no de-

penden específicamente de su grosor sino más bien de los cambios de la estructura cuticular y de las proporciones en que se encuentran sus componentes, como han señalado también otros autores (Hauke y Schreiber, 1998; Riederer y Schreiber, 2001; Verardo *et al.*, 2003; Matas *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2004; Schreiber, 2005).

El grosor de la cutícula varió en el transcurso del almacenamiento, con diferencias entre cultivares. En 'Keitt' tendió a disminuir hasta el final de la evaluación, mientras en 'Tommy Atkins' y en 'Kent' hubo fluctuaciones, sobre todo en 'Tommy Atkins'. Verarverveke *et al.* (2001) observaron diferencias en el grosor de la cutícula entre los cultivares de manzana durante el almacenamiento. Tales variaciones entre cultivares pueden ser explicadas por efecto de los múltiples factores que intervienen en su formación, como son los genéticos, fisiológicos, ambientales y de manejo (Jenks *et al.*, 2002).

Ultraestructura de la cutícula

En los tres cultivares se observó la formación de una capa continua de cutícula, interrumpida sólo por las lenticelas (Figura 2A). Según la clasificación de Barthlott *et al.* (1998), el tipo de formación cuticular es lisa y la estructura de las ceras es del tipo amorfo. Resultados similares a los señalados fueron observados en mango 'Kensington Pride' por Bally (1999) y en mango 'Tommy Atkins' por Gazzola *et al.* (2004), quienes indicaron que desde los primeros estados de desarrollo la epidermis del fruto está cubierta completamente por la cutícula.

A los 45 DDA se evidenció ruptura de las ceras para formar agrietamientos y adelgazamientos de la capa cuticular en todos los cultivares (Figura 2B); este rompimiento está asociado con la expansión de la superficie epidermal mientras el fruto crece y a que la deposición de los componentes cuticulares ocurre a diferentes velocidades (Jeffree, 1996). Según la clasificación de Barthlott *et al.* (1998), la formación de la cutícula es del tipo capa fisurada. Los resultados coinciden con estudios previos realizados por Bally (1999) en frutos de mango 'Kensington Pride', quien observó que las grietas formadas en las placas cuticulares parecen ser el sitio más probable en donde los compuestos químicos y el agua pueden penetrar y causar daños en la superficie del fruto. Knoche *et al.* (2004) correlacionaron las fracturas en la cutícula con pérdida de humedad y desorden fisiológico, como las depresiones en la superficie de los frutos de cereza.

En cítricos se reportó una asociación entre la presencia del agrietamiento en la cutícula y la susceptibilidad a desórdenes en el epicarpio (El-Otmani y Coggins, 1985). Commenil *et al.* (1997) también relacionaron el número de grietas formadas durante la maduración con la susceptibilidad de la vid a *Botrytis cinerea*. En manzana 'Golden Delicious', Glenn *et al.* (1985) observaron que las fisuras cuticulares son el principal sitio de entrada de soluciones a las células epidermales.

Se registraron diferencias entre cultivares en el arreglo estructural de las ceras en la superficie cuticular del fruto a la cosecha. En 'Tommy Atkins' (Figura 2C) y 'Kent' (Figura 2D) se observó presencia de zonas cristalinas (82.6 y 82.7 % respectivamente) y zonas amorfas, mientras que en 'Keitt' (Figura 2E) la estructura fue principalmente amorfa (74.1 %). El tipo de formación de ceras epicuticu-

lares fue de plaquetas con bordes ondulados (Barthlott *et al.*, 1998). En contraste, en frutos de mango en la misma etapa de crecimiento, Gazzola *et al.* (2004) observaron formación de estructuras pentagonales. Estas diferencias pudieran ser relacionadas por la diferencias en las características ambientales (Holroyd *et al.*, 2002).

La estructura y composición de ceras cuticulares en plantas varían ampliamente entre especies, órganos y estados de desarrollo (Jenks *et al.*, 2002). Reynhardt y Riederer (1994) afirmaron que las zonas amorfas por su arreglo al azar, presentan mayor permeabilidad. De acuerdo con Casado y Heredia (1999), la presencia de puentes de hidrógeno entre cadenas o moléculas con diferentes estructuras y grupos funcionales resultan en la formación de espacios amorfos; además reportaron que en la superficie cuticular de la uva estas áreas incrementaron la difusión del vapor de agua (Casado y Heredia, 2001).

A los 3 d de almacenamiento la ultraestructura de la cutícula se observó como una placa con deposición de gránulos irregulares cristalinos en los tres cultivares, posiblemente originados por la degeneración de la cutícula, los cuales se incrementaron en número y tamaño a través del tiempo. El modelo de orientación de las ceras epicuticulares fue del tipo plaqueta paralela, según el sistema de clasificación de Barthlott *et al.* (1998). En esta fecha inició la degeneración y separación de las placas cuticulares. De acuerdo con Rashott y Feldmann (1998), cuando una clase de lípidos presenta un homólogo predominante en las ceras epicuticulares, se forman cristales característicos sobre la superficie de las células epidérmicas. En este estudio se evidenció la formación de estructuras tipo placas, y por el tipo de cristaloides posiblemente los compuestos predominantes son alcoholes secundarios, según Barthlott *et al.* (1998) y Meusel *et al.* (1999). Al final del almacenamiento la morfología de la cobertura fue del tipo amorfo en toda la superficie (Figuras 2F).

Permeabilidad de la cutícula

En la etapa de crecimiento del fruto, la permeabilidad de las cutículas aisladas, varió a través del tiempo (Figura 3A). En el estado temprano del desarrollo, 'Tommy Atkins' y 'Kent' mostraron los valores más altos, que luego fueron disminuyendo, sobre todo en la cosecha.

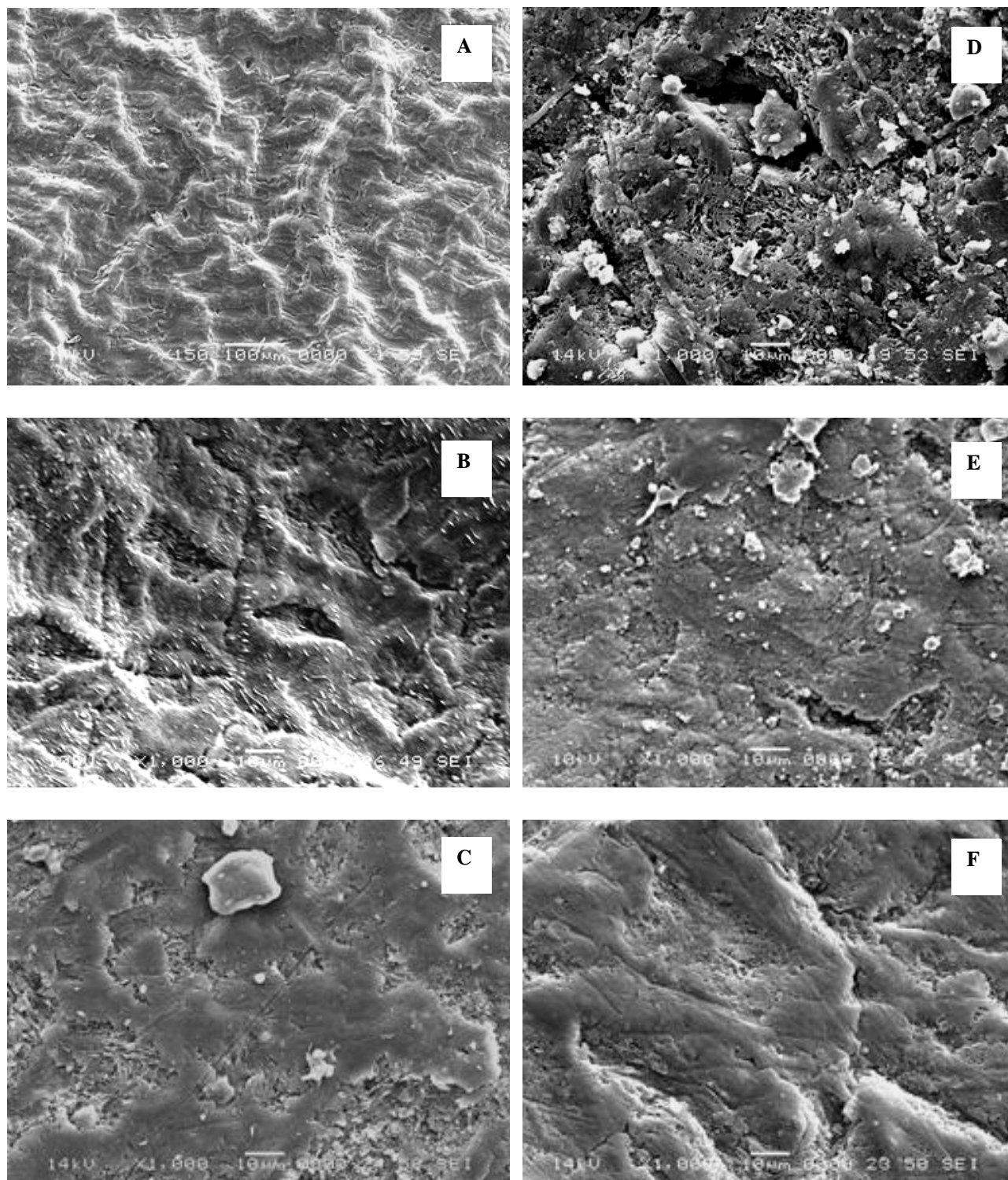


Figura 2. Electromicrografías de barrido de la cutícula del fruto de mango a los 15 d después del amarre (A) y a los 45 d después del amarre (B). En cosecha: cultivares 'Tommy Atkins' (C), 'Kent' (D) y 'Keitt' (E). Almacenamiento a los 12 d (F)

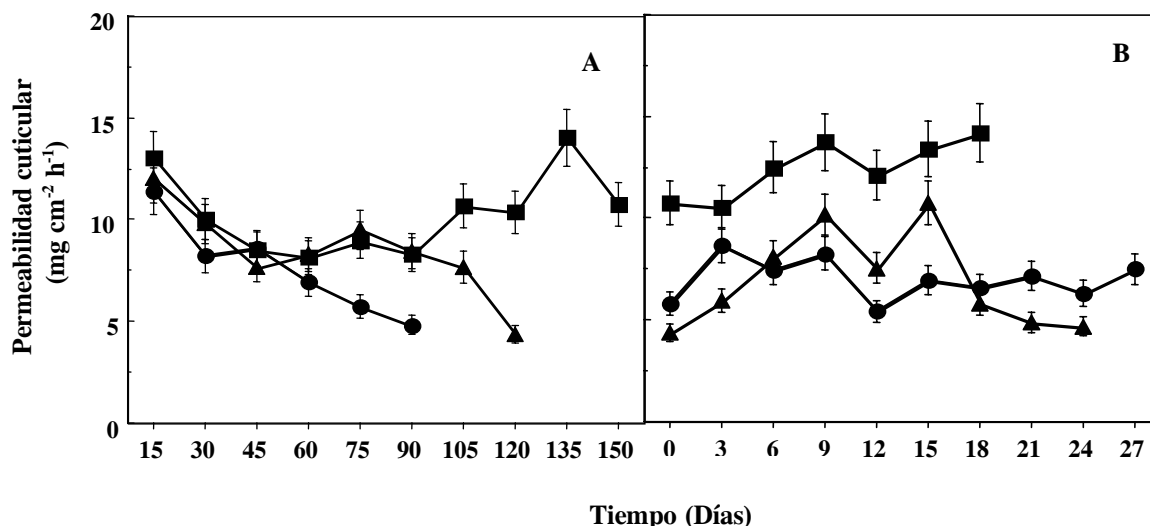


Figura 3. Cambios de la permeabilidad al vapor de agua en ($\text{mg cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) de cutículas aisladas de frutos de mango —●— 'Tommy Atkins', —▲— 'Kent' y —■— 'Keitt' durante el crecimiento (A) y durante el almacenamiento (B). Barras verticales indican el error estándar.

'Keitt' mostró resultados contrastantes a los de los otros dos cultivares, pues presentó un aumento en las últimas fechas del estudio.

Un comportamiento similar al encontrado en 'Tommy Atkins' y 'Kent' se reportó en frutos de manzana por Verardo *et al.* (2003); en durazno (*Prunus persica* L.) por Gibert *et al.* (2005) y en cereza (*Prunus avium* L.) por Knoche *et al.* (2004). De acuerdo con Baur (1997), la variabilidad de la permeabilidad de la cutícula durante el crecimiento está asociada con las estructuras de la epidermis (estomas, lenticelas, tricomas), con cambios en la estructura de la superficie cuticular y con cambios en la composición química de la cutícula.

En el exocarpo del mango el número de las lenticelas (Bezuidenhout *et al.*, 2005), está determinado desde la antesis y permanece constante durante el desarrollo del fruto (Hieke *et al.*, 2002); con la expansión del mismo disminuye su densidad (Knoche *et al.*, 2001). Los valores altos de permeabilidad en 'Keitt' pueden deberse a que en este cultivar presenta mayor densidad de lenticelas que 'Tommy Atkins' y 'Kent' (Dietz *et al.*, 1988). La disminución de la permeabilidad se debe a la incorporación de ceras en la matriz de cutina, tanto epicuticulares como de intracuticulares. Según Kunst y Samuels (2003), conforme avanza el desarrollo del fruto la cutícula aumenta su efectividad como barrera a la pérdida de vapor de agua.

Durante el almacenamiento (Figura 3B) la permeabilidad varió a través del tiempo, con diferencias

significativas entre cultivares, ya que 'Keitt' presentó los valores más altos (de 10.8 a 14.2 mg de vapor de agua $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$). Estas diferencias son atribuidas a los cambios de la estructura de la cutícula, como el incremento de las zonas amorfas en la superficie al final del almacenamiento, y el cultivar 'Keitt' presentó mayor proporción de estas zonas desde antes de la cosecha. Según Kunst y Samuels (2003), la morfología y estructura de las ceras varía con el tiempo, lo que favorece la pérdida de las funciones de la cutícula.

Similar incremento de la permeabilidad durante el almacenamiento se reportó en frutos de tomate y de chile Pimiento Baur (1998), y en cereza por Beyer *et al.* (2005); en manzana, Veraverbeke *et al.* (2003) observaron una disminución de la permeabilidad. Harz *et al.* (2003) relacionaron esta disminución con el incremento en la fracción de ceras cuticulares cristalinas, las cuales se consideran menos permeables al vapor de agua que las ceras amorfas.

La relación entre la permeabilidad de la cutícula y los componentes cuticulares resultó significativa y negativa ($P \leq 0.05$) en la cosecha. En el caso las ceras epicuticulares, el coeficiente de correlación de Pearson alcanzó valores de -0.84, -0.75 y -0.69 en 'Tommy Atkins', 'Kent' y 'Keitt', respectivamente. Estos valores mejoraron sensiblemente para las ceras intracuticulares: $r = -0.91$, -0.95 y -0.85 , en el mismo orden. Esto indica que la permeabilidad disminuyó a medida que se incrementó la cantidad de ceras.

El coeficiente de determinación (R^2) indicó que los cambios en la permeabilidad pueden ser explicados por el contenido de las ceras intracuticulares en 83, 90 y 73 %. Estos resultados confirman que las ceras son la principal barrera a la difusión de la cutícula, y coinciden con Riederer y Schreiber (2001) quienes señalaron que son estas estructuras y no la cutina, las responsables de limitar la difusión del vapor de agua. También concuerda con los resultados de Petrcek y Bukovac (1995) y Wiedermann y Neinhuis (1998), quienes afirmaron que la barrera protectora a la permeabilidad al vapor de agua es independiente del grosor de la cutícula del fruto, pero dependientes de los diferentes compuestos químicos que forman las ceras.

CONCLUSIONES

El contenido de ceras epicuticulares, intracuticulares, de cutina y el peso cuticular, se incrementaron durante el crecimiento de los frutos. La cutina representó entre 60 y 80 % de la masa total de la cutícula y el resto correspondió a las ceras cuticulares. Existen diferencias marcadas en la ultraestructura de la cutícula durante la ontogenia de los frutos de mango. A la cosecha, los cultivares 'Tommy Atkins' y 'Kent' mostraron mayor proporción de zonas cristalinas (82.6 %), mientras que en 'Keitt' fue principalmente amorfa (74.1 %). El contenido de ceras epicuticulares e intracuticulares juega un papel importante en el tipo de estructura y permeabilidad de la cutícula. La mayor eficiencia de la cutícula para regular la pérdida de agua, ocurrió al momento de la cosecha y se relacionó con los cambios en la ultraestructura y con el contenido de las ceras cuticulares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración al Ing. Ernesto Sánchez del (INIFAP), al Dr. Francisco Brown de la Universidad de Sonora (UNISON)) y a la Dra. Maria Goreti del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

BIBLIOGRAFÍA

- Aloni B, L Karni, I Rytski, Y Cohen, Y Lee, M Fuchs (1998) Cuticular cracking in pepper fruit. I. Effects of night temperature and humidity. J. Hort. Sci. Biotechnol. 73:743-749.
- Báez R, F Tadeo, E Primo-Millo, L Zacarias (1993) Physiological and ultrastructural changes during the ripening and senescent of clementine mandarin. Acta Hort. 343:18-24.
- Baker E, J Bukovac, G Hunt (1982) Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. In: The Plant Cuticle. D Cutler, K Alvin, C Price (eds). London. Academic Press, pp:33-44.
- Bally I (1999) Changes in the cuticular surface during the development of mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kensington Pride. Sci. Hort. 79:13-22.
- Bargel H, C Neinhuis (2005) Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. J. Exp. Bot. 56:1049-1060.
- Barnes J, K Percy, N Paul, P Jones, C McLaughlin, P Mullineaux, G Creissen, A Wellburn (1996) The influence of UV-radiation on the physiochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surface. J. Exp. Bot. 47:99-109.
- Barthlott W, C Neinhuis, D Cutler, F Ditsch, I Meusel, I Theisen, H Wilhelmi (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Bot. J. Soc. 126:237-260.
- Baur P (1997) Lognormal distribution of water permeability and organic solute mobility in plant cuticles. Plant Cell Environ. 20:809-837.
- Baur P (1998) Mechanistic aspects of foliar penetration of agrochemicals and the effects of adjuvants. Rec. Res. Dev. Agri. Food Chem. 2:809-837.
- Beyer M, S Lau, M Knoche (2005) Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: IX. Comparing permeability in water uptake and transpiration. Planta 220:474-485.
- Bezuidenhout J, P Robbertse, C Kaiser (2005) Anatomical investigation of lenticel development and subsequent discolouration of 'Tommy Atkins' and 'Keitt' mango (*Mangifera indica* L.). J. Hort. Sci. Biotechnol. 80:18-22.
- Bondada R, P Petrcek, J Syvertsen, G Albrigo (2006) Cuticular penetration characteristics of urea in citrus leaves. J. Hort. Sci. Biotechnol. 81:219-224.
- Casado C, A Heredia (1999) Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). J. Exp. Bot. 50:175-182.
- Casado C, A Heredia (2001) Ultrastructure of the cuticle during growth of the grape berry (*Vitis vinifera* L.). Physiol. Plant. 111:220-224.
- Commenil P, L Brunet, J Audran (1997) The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. J. Exp. Bot. 48:1599-1607.
- Curry E (2005) Ultrastructure of epicuticular wax aggregates during fruit development in apple (*Malus domestica* Borkh.) J. Hort. Sci. Biotechnol. 80:668-676.
- Dietz T, K Thimma, S Sundar (1988) Studies on loss weight of mango fruits as influenced by cuticles and lenticels. Acta Hort. 231:685-687.
- El-Otmani M, C W Coggins (1985) Fruit age and growth regulator effects on the quantity and structure of the epicuticular wax of Washington navel orange fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:371-378.
- Freeman B, L Albrigo, R Biggs (1979) Ultrastructure and chemistry of cuticular waxes of developing *Citrus* leaves and fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104:801-808.
- Gazzola R, R Alves, H Filgueiras (2004) Physical state of epicuticular waxes during development of 'Tommy Atkins' mangoes. Acta Hort. 645:595-599.
- Gibert C, F Lescourret, M Génard, G Vercambre, A Pérez (2005) Modelling the effect of fruit growth on surface conductance to water vapour diffusion. Ann. Bot. 95:673-683.
- Glenn G M, B W Povaiah, H P Rasmussen (1985) Pathways of calcium penetration through isolated cuticles of 'Golden Delicious' apple fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:166-171.
- Hallam N, T Chambers (1970) The leaf waxes of the genus *Eucalyptus* L'Héritier. Aust. J. Bot. 18:335-386.
- Harz M, M Knoche, M Bukovac (2003) Epidermal segments: a useful model system for studying water transport through fruit surfaces. HortScience 38:1410-1413.
- Hauke V, L Schreiber (1998) Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Heredia helix* L.) sun and shade leaves. Planta 207:67-75.
- Heredia A (2003) Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. Bioch. Biophys. Acta 1620:1-7.

- Hieke S, C Menzel, P Lüdders (2002) Effects of leaf, shoot and fruit development on photosynthesis of lychee trees (*Litchi chinensis*). Tree Physiol. 22:955-961.
- Holroyd G, A Hetherington, J Gray (2002) A role for the cuticular waxes in the environmental control of stomatal development. New Phytol. 153:433-439.
- Image Processing and Analysis in Java. Disponible <http://rsb.info.nih.gov/ij/> (Consulta: Febrero 28, 2005).
- Jeffree C (1996) Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach. G. Kerstiens (ed). Oxford: Bios Scientific Publishers. pp:33-82.
- Jenks M, S Eigenbrode, B Lemieux (2002) Cuticular waxes of *Arabidopsis*. J. Cell Biol. 17: 208-212.
- Jetter R, S Schäffer (2001) Chemical composition of the *Prunus lauro-cerasus* leaf surface dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. Plant Physiol. 126:1725-1737.
- Knoche M, S. Peschel, M Hinz, M Bukovac (2001) Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: II. Conductance of the cuticle in relation to fruit development. Planta 213:927-936.
- Knoche M, M Beyer, S Peschel, B Oparlakov, M Bukovac (2004) Changes in strain and deposition of cuticle in developing sweet Cherry fruit. Physiol. Plant. 120:667-677.
- Kolattukudy P (1996) Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: Plant Cuticles. G. Kerstiens (ed). Oxford: BIOS Scientific Publishers. pp:83-108.
- Kolattukudy P (2003) Natural waxes on fruits. Postharvest Information Network. <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/REP2003A.pdf>. (Consulta: Octubre 15, 2005).
- Kunst A, L Samuels (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. Progr. Lipid Res. 42:51-80.
- Matas A, J Cuartero, A Heredia (2004) Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticle. Thermoch. Acta 409:165-169.
- Meusel I, C Neinhuis, C Markstädter, W Barthlott (1999) Ultrastructure, chemical composition and recrystallization of epicuticular waxes: transversely ridged rosettes. Can. J. Bot. 77:706-720.
- Molina R (1998) Introducción al procesamiento y análisis de imágenes digitales. Departamento de Ciencias de la Computación e I. A. Universidad de Granada. Disponible http://www-ts2.ugr.es/depar/ccia/mia/complementario/Procesamiento_Imagenes.pdf (Consulta: Febrero 26, 2005).
- Number Cruncher Statistical Systems (NCSS) (2000) Statistical Systems 6.0 for Windows. Kaysville, Utah.
- Oh B, K Kim, Y Kim (1999) Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Phytopathol. 147:547-552.
- Pesis E, D Aharoni, Z Aharon, R Ben Arie, N Aharoni, N Fuchs (2000) Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury in mango fruit. Postharv. Biol. Technol. 19:93-101.
- Petracek P, M Bukovac (1995) Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. Plant Physiol. 109:675-679.
- Post-Beittenmiller D (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:405-430.
- Ramírez D, J Jiménez, E Pacheco, J Lagarda, A Ortega, P Valenzuela, M Zapata (2004) El INIFAP en Sonora. Publicación especial. CIRNO-INIFAP. México. 103 p.
- Rashott A, K Feldmann (1998) Correlations between epicuticular wax structures and chemical composition in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Sci. 159:773-779.
- Reynhardt E, M Riederer (1994) Structures and molecular dynamics of plant waxes. II. Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. Europ. Biophys. 23:59-70.
- Riederer M, C Markstädter (1996) Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. In: Plant Cuticles. G Kerstiens (ed). BIOS Scientific, Oxford, UK. pp:189-200.
- Riederer M, G Schneider (1990) The effect of the environment on the permeability and composition of citrus leaf cuticles. II. Composition of soluble cuticular lipids and correlation with transport properties. Planta 180:154-165.
- Riederer M, L Schreiber (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. J. Exp. Bot. 52:2023-2032.
- Rogiers S, J Hatfield, V Gunta, R White, M Keller (2004) Grape berry cv. Shiraz epicuticular wax and transpiration during ripening and preharvest weight loss. Amer. J. Enol. Vitic. 55:121-127.
- Schönherr J, M Riederer (1986) Plant cuticle sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. Plant Cell Environ. 9:459-466.
- Schreiber L (2005) Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. Ann. Bot. 95:1069-1073.
- Suita de Castro L, R Valdebenito, R Flores, N Moreira (2002) Metodologia para observação da camada de cera em maçãs, utilizando microscopia eletrônica de varredura. Rev. Brasil. Frut. 24:774-775.
- Vásquez-Calcado A, S Neidhartl, P Pathomrungsriyonggul, P Wiriyacharee, A Chatrakul, P Srumsiri, P Manochai, F Bangert, R Carle (2002) Physical, chemical and sensory properties of nine Thai mango cultivars and evaluation of their technological and nutritional potential. In: http://www.uni-hohenheim.de/symposium2002/frame_contributions_pa.htm. International Symposium Sustaining Food Security and Managing Natural Resources in Southeast Asia Challenges for the 21st Century January 8-11, 2002 at Chiang Mai, Thailand. pp:1-13.
- Verardo G, E Pagani, P Geatti, P Martinuzzi (2003) A thorough study of the surface wax of apple fruits. Analyt. Bioanal. Chem. 376: 659-667.
- Veraverbeke E, P Van, I Decastro, B Nicolai (2001) Analysis of apple (*Malus domestica* Borkh.) wax by means of chromatographic techniques and confocal microscopy. Acta Hort. 553:519-522.
- Veraverbeke E, P Verboven, P Van, B Nicolai (2003) Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestris* subsp. Mitis (Wallr)) during storage. Part 1. Model development and determination of diffusion coefficients. Postharv. Biol. Technol. 30:75-88.
- Vogg G, S Fischer, J Leide, E Emmanuel, R Jetter, A Levy, M Riederer (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. J. Exp. Bot. 55:1401-1410.
- Wagner P, R Fürstner, W Barthlott, C Neinhuis (2003) Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. J. Exp. Bot. 54:1-9.
- Wiedermann P, C Neinhuis (1998) Biomechanics of isolated plant cuticles. Bot. Acta 111:28-34