



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

**“EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO PEQUEÑAS (sHSPs) EN FRUTOS DE MANGO
(*Mangifera indica* L.) SOMETIDOS A TRATAMIENTO
HIDROTÉRMICO”**

Por:

JOSÉ MARÍA ANAYA DYCK

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

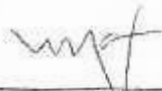
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DE 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José María Anaya Dyck, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Director de Tesis



Dra. Carmen A. Contreras Vergara
Asesor



Dra. Irasema Vargas Arispuro
Asesor

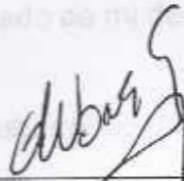


Dr. Miguel A. Martínez Tellez
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación mediante la beca para realizar estudios de posgrado. El recurso financiero para la realización de esta investigación fue otorgado por CONACYT a la Dra. María A. Islas Osuna (proyecto CB2012-01-178296).

A CIAD, por ponerme en contacto con expertos y facilitarme el equipo y las instalaciones necesarias para realizar este trabajo. Al Dr. Tomás Osuna Enciso de CIAD-Culiacán por proporcionar los mangos utilizados en esta investigación.

A mi novia Mayra, sin su apoyo no me habría animado a inscribirme a un segundo semestre.

A mi familia por insistir en el cuidado de mi desarrollo profesional.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por sus sabios consejos.

A la Dra. Maria Islas, por ser la brújula que marco el rumbo de mi trabajo de investigación.

A la Dra. Magda Pacheco por enseñarme las técnicas que utilicé en el laboratorio, igualmente a la cDra. Mitzuko Dautt por su apoyo técnico.

Gracias a la Dra. Irasema Vargas y al Dr. Miguel A. Martínez por saber detectar los errores que yo pasé por alto.

A la Dra. Carmen Contreras por su paciencia incansable.

DEDICATORIA

A mi novia, por siempre estar ahí, apoyándome y alentándome a continuar, por mantener tu fe en mí aun cuando yo la perdí. A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme y a todos los que me apoyaron en la escritura de esta tesis.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 El Mango: Características e Importancia	3
II.2 Problemas en el Manejo Poscosecha de Frutos de Mango	5
II.3 Tratamiento Hidrotérmico	6
II.4. Proteínas de Choque Térmico	10
II.4.1 HSPs en las Plantas	13
II.4.2 HSPs Pequeñas en las Plantas	16
II.4.3 sHSPs en Mango	19
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1 Objetivo General	22
IV.2 Objetivos Específicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.1 Obtención de Mangos 'Ataulfo' y Aplicación de Tratamiento Hidrotérmico	23
V.2 Toma de Muestras	23
V.3 Extracción de RNA Total	24
V.3.1 Evaluación de la Integridad, Concentración y Pureza del RNA Total	25
V.3.2 Eliminación de DNA Genómico	25
V.4 Síntesis de cDNA por Transcripción Reversa	26
V.5 Cuantificación de la Expresión Génica de sHSPs por PCR en Tiempo Real	26
V.5.1 Análisis de Expresión Relativa por PCR Cuantitativa	28
V.6 Análisis Estadístico	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VI.1 Análisis <i>In Silico</i>	30
VI.2 Evaluación de la Expresión Génica de las proteínas de choque térmico pequeñas	36
VI.2.1 Extracción de RNA	36
VI.2.2 Síntesis de cDNA	37

CONTENIDO (Continuación)

VI.2.3 Construcción de modelos estructurales teóricos de sHSPs.....	38
VI.2.4. Expresión Relativa de HSP15.9 en Mangos Testigo Durante su Almacenamiento Poscosecha.....	40
VI.2.5. Expresión relativa de <i>HSP15.9</i> durante el almacenamiento poscosecha de mangos tratados	41
VI.2.6. Expresión Relativa de <i>HSP17</i> en Mangos Testigo en Poscosecha.....	44
VI.2.7. Expresión Relativa de <i>HSP17</i> en Mangos tratados Durante su Almacenamiento Poscosecha.....	45
VI.2.8. Expresión Relativa de <i>HSP17.9</i> en Mangos Testigo.....	48
VI.2.9. Expresión Relativa de <i>HSP17.9</i> en Mangos tratados Durante su Almacenamiento Poscosecha.....	49
VI.2.10. Expresión Relativa de <i>HSP25.8</i>	52
VI.2.11. Expresión Relativa de sHSP 25.8kDa en mangos con TH	53
VI.2.12 Validación de la Expresión Génica Obtenida por RNA-seq	56
VI.3 Resumen de Resultados	58
VII. CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Secuencias nucleotídicas y deducidas de aminoácidos de sHSPs de mango 'Ataulfo'	32
Figura 2. Alineamientos de secuencias de aminoácidos de sHSPs de <i>Mangifera indica</i> variedad 'Ataulfo' y sHSPs de <i>Oryza sativa</i> utilizadas como marcadores biológicos de termotolerancia.....	34
Figura 3. Alineamiento de 3 sHSPs citosólicas de mango 'Ataulfo' analizadas en este trabajo.....	35
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA total extraído de pulpa de mango.....	37
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa con productos de PCR utilizando iniciadores para GAPDH y como templado cDNA y RNA.	38
Figura 6. Modelos estructurales de proteínas de choque térmico pequeñas de mango 'Ataulfo'	39
Figura 7. Expresión relativa del gen que codifica la Hsp15.9 en mangos 'Ataulfo' durante el almacenamiento poscosecha (mangos testigo).....	41
Figura 8. Expresión relativa del gen <i>HSP15.9</i> por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Ataulfo'	42
Figura 9. Comparación de la expresión relativa del gen que codifica para Hsp15.9 entre mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo.	44
Figura 10. Expresión relativa de <i>HSP17</i> en la maduración poscosecha del mango 'Ataulfo' (mangos testigo).	45

LISTA DE FIGURAS (continuacion)

Figura 11. Expresión relativa de <i>HSP17</i> en mangos 'Ataulfo' que recibieron el tratamiento hidrotérmico.	46
Figura 12. Comparación de la expresión relativa del gen que codifica para sHSP 17 entre mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo.	48
Figura 13. Expresión relativa del gen <i>HSP17.9</i> en la maduración del mango 'Ataulfo' (mangos testigo).	49
Figura 14. Expresión relativa de <i>HSP17.9</i> por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Ataulfo'.....	50
Figura 15. Comparación de la expresión relativa del gen <i>HSP17.9</i> en mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo.	52
Figura 16. Expresión relativa del gen <i>HSP25.8</i> en la maduración del mango 'Ataulfo' (mangos testigo).	53
Figura 17. Expresión relativa <i>HSP25.8</i> en mangos 'Ataulfo' que recibieron el TH.	54
Figura 18. Comparación de la expresión relativa del gen <i>HSP25.8</i> en mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo.	56
Figura 19. Perfil de expresión (Log2) calculado con datos obtenidos por qPCR y RNA-seq de 4 genes sHSP seleccionados de mangos testigo muestreados el día 1 de almacenamiento poscosecha.	57
Figura 20. Perfil de expresión (Log2) calculado con datos obtenidos por qPCR y RNA-seq de 4 genes sHSP seleccionados de mangos tratados muestreados el día 1 de almacenamiento poscosecha.	58

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Protocolos de Tratamiento Hidrotérmico de USDA APHIS (J.K. 2010).....	8
Tabla 2 Resumen de genes expresados diferencialmente por efecto de la aplicación de Tratamiento Hidrotérmico (TH) en cascara de mango (Luria et al., 2014).	10
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la evaluación génica de sHSP	28
Tabla 4. Predicción de Localización celular de sHSPs de mango Ataulfo.	33
Tabla 5. Comparativo entre sHSPs de Arroz reportadas como marcadores biológicos de termotolerancia y sHSPs de Mango 'Ataulfo'.	33

RESUMEN

El tratamiento hidrotérmico (TH) es una medida cuarentenaria aplicado a mangos para eliminar las larvas de la mosca de la fruta y es un requisito para su exportación a diferentes países. Este consiste en sumergir los frutos en agua caliente a 46.1°C durante 60 a 110 minutos dependiendo de su peso, y genera estrés térmico. Las proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés) protegen a los seres vivos del calor y en particular las HSP pequeñas (sHSPs) son marcadores biológicos de termotolerancia en las plantas. En nuestro transcriptoma de mango 'Ataulfo' se encontraron secuencias aminoacídicas deducidas muy similares a las sHSPs de otras plantas. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los genes putativos *HSP25.8*, *HSP17.9*, *HSP17*, y *HSP15.9* en mango 'Ataulfo' sometido a tratamiento hidrotérmico y frutos testigos, días después de aplicado el tratamiento. Los mangos en estado de madurez fisiológica se obtuvieron en un empaque, donde fue administrado el TH, y se trasladaron al laboratorio donde se lavaron y se almacenaron en una cámara a 20°C. Se muestreó mesocarpio de mangos de los días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento poscosecha, del cual se extrajo RNA total y se sintetizó cDNA. La expresión de sHSPs se evaluó mediante qRT-PCR utilizando *GAPDH* como gen normalizador. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los patrones de expresión génica de las cuatro sHSPs por efecto del tratamiento hidrotérmico. La expresión génica de *HSP17* y *HSP 25.8* se estimuló a las 24 horas de aplicado el tratamiento (día 1) y en los días 3 y 5 por efecto del TH. Estos resultados indican que las Hsp17 y Hsp25.8 protegen a los frutos de mango del estrés por calor. La expresión de otras sHSPs putativas identificadas en el transcriptoma de mango deberá evaluarse para identificar aquellas específicas del estrés por calor.

Palabras claves: Tratamiento hidrotérmico, *Mangifera indica* L., sHSPs, RNA, expresión génica.

ABSTRACT

Hot water treatment (HWT) is applied to mango fruit as a quarantine operation to eliminate fruit fly larvae, and it is a requirement for these fruit to be exported to different countries. The HWT consists of immersing fruits in hot water at 115°F for 60 to 110 minutes depending on fruit weight, generating heat stress. Plants counteract heat stress with the production of heat shock proteins (HSPs) and specific small HSPs (sHSPs) have been proposed as thermotolerance biomarkers. In our 'Ataulfo' mango transcriptome some deduced amino acid sequences are very similar to sHSPs from other plants. In this work, the expression of putative *Hsp17.9*, *Hsp17*, *y Hsp15.9* (cytosolic) and *Hsp25.8* (chloroplastic) coding genes was evaluated on physiologically mature mangoes that received the HWT and controls. Mangoes were obtained in a commercial orchard where the HWT was applied, they were transported to the laboratory and stored at 20°C. Mesocarp samples were taken at days 1, 3, 5, 7 and 9 after the treatment was applied, total RNA was prepared and cDNA was synthesized. *sHSPs* expression was evaluated by qRT-PCR using *GAPDH* as the housekeeping gene. There were differences between the expression patterns of the four *sHSPs* by the HW treatment; however, the expression of *HSP17* and *HSP 25.8* was stimulated on mesocarp from mango of day 1 by the application of the HWT. These results suggest that *Hsp17* and *Hsp25.8* proteins protect mango fruits from heat stress. The expression of other putative sHSPs should be evaluated to uncover those that are specific for heat stress in this fruit.

Keywords: Hot Water Treatment, *Mangifera indica* L., sHSPs, RNA, cDNA, gene expression.

I. INTRODUCCIÓN

Los tratamientos a base de temperaturas altas aplicados en frutos, han demostrado ser eficaces en el control de plagas y patógenos además de no ser contaminantes (Álvarez et al., 2012). Éstos métodos son utilizados en varios países y su aplicación es reglamentaria, sobre todo en frutos de mangos de exportación por ser un fruto climatérico altamente perecedero expuesto al ataque de plagas y enfermedades, como la mosca de la fruta y la antracnosis (Bibi y Baloch, 2014). El tratamiento hidrotérmico (TH) consiste en sumergir el fruto en agua caliente a una temperatura específica por un periodo de tiempo determinado. Su costo es relativamente bajo, además de no causar efectos negativos al ambiente y al consumidor. La aplicación del TH causa efectos visibles en el fruto acelerando su maduración y modificando la expresión de algunos genes relacionados con este proceso (Vicente et al., 2006).

Todos los organismos comparten un mecanismo de respuesta al estrés, el cual es considerado una adaptación ubicua. Este método de defensa consiste en la síntesis de un número pequeño de proteínas altamente conservadas (proteínas de choque térmico o HSPs) responsables del fenómeno de termotolerancia adquirida (Wang, Zhang et al. 2014). Las HSPs ayudan a la célula a conservar la funcionalidad de las proteínas actuando como chaperonas o bien ayudando a degradar las proteínas desnaturalizadas (Coronato, Di Girolamo et al. 1999). Las proteínas de choque térmico pequeñas sHSPs tienen una importancia especial para las plantas ya que son requeridas para su desarrollo normal y estas han sido localizadas en todos sus organelos. La abundancia y diversidad de sHSPs existente en los tejidos vegetales es un reflejo de la necesidad de adaptación de las plantas a diversos factores de estrés (Sun et al., 2002).

Los conocimientos actuales sobre la aplicación de los tratamientos hidrotérmicos son empíricos, los fundamentos bioquímicos y/o moleculares que expliquen los resultados obtenidos por su aplicación aún se desconocen. Esta falta de información limita la optimización de los TH sobre bases científicas definidas (GUIDI, NANNI et al. 2012). El estudio de la expresión de genes que codifican sHSPs abre nuevos caminos para la manipulación de los mismos con el fin de aumentar su tolerancia a las altas y bajas temperaturas así como otros factores de estrés. Este estudio permite comparar los niveles de expresión génica de cuatro sHSPs en mango con las de otras especies vegetales.

II. ANTECEDENTES

II.1 El Mango: Características e Importancia

Por su excelente sabor y aroma los frutos de mango tienen una gran demanda en todos los mercados. Su popularidad e importancia puede observarse por el hecho de que a menudo se refieren a este fruto como "el rey de las frutas" en el mundo tropical (Tharanathan et al., 2006). Estos frutos de gran tamaño se clasifican como drupas, son compactos, carnosos, y resinosos. Dependiendo de la variedad su sabor, tamaño, color y contenido de fibra varía. Tienen una forma ovoide y aplanada (Yahia 2006), el mesocarpio (pulpa) es firme y puede ser fibroso o libre de fibra, con un sabor que varía desde muy ácido hasta muy dulce. Su piel es resistente y cambia de color dependiendo de su nivel de maduración. Los principales países productores de mango son India, China, Tailandia, Indonesia, Pakistán y México (FAO, 2013), siendo México el principal país exportador (CIA World Factbook, 2011). Existen cientos de variedades de mango, en México, las más importantes son 'Tommy Atkins', 'Ataulfo' y 'Kent'.

El consumo del mango en el ámbito doméstico e industrial se enfoca en el uso de su pulpa debido a que es materia prima para la producción de bebidas y deshidratados de mango (Masibo and He 2009). La composición de la pulpa depende de muchos factores, como la variedad, la localidad, el clima y la etapa de madurez. Sus principales constituyentes son agua, carbohidratos, fibra, ácidos orgánicos, minerales, pigmentos y cantidades significativas de compuestos polifenólicos con gran potencial antioxidante, cuyo consumo ayuda a proteger el cuerpo contra los efectos nocivos de los radicales libres que causan enfermedades degenerativas como el cáncer, la aterosclerosis, la diabetes, y enfermedades cardiovasculares (Masibo and He 2009). Los frutos de mango son altamente perecederos. Su tasa de respiración durante la maduración tiene un comportamiento climatérico,

presentando un aumento en la producción de CO₂ y etileno (Mitra and Baldwin 1997). Bajo condiciones tropicales a temperaturas de 20 a 25°C, los frutos de mango fisiológicamente maduros “verdes”, maduran entre 6 y 7 días después de la cosecha y su vida poscosecha dura solo 15 días. Adicionalmente, los frutos del mango son sensibles a las lesiones físicas y susceptibles a enfermedades en poscosecha y daño por frío (Mitra and Baldwin 1997).

Las tecnologías poscosecha utilizadas para la fruta de mango se han concentrado en tratamientos para eliminar o substituir periodos cuarentenarios, controlar enfermedades o para facilitar el envasado, procesamiento y almacenamiento a largo plazo del mango. Existe un gran interés por alargar la vida de anaquel de los frutos de mango y evitar las pérdidas poscosecha. El proceso de comercialización de la fruta fresca presenta un gran potencial de desarrollo de nuevas tecnologías de manejo poscosecha, que integren conocimientos de diversas áreas como su fisiología, genética y bioquímica, entre otras (Jacobi et al., 2001).

Para frutos de mango, los métodos convencionales de selección y propagación se complican por su larga fase juvenil, autoincompatibilidad, cuajado bajo, caída de fruto alta, una sola semilla por fruto, alto grado de polinización cruzada, poliembrionía, poliploidía y naturaleza heterocigota, además de la escasa información acerca de los mecanismos de herencia de rasgos cuantitativos importantes. Estos factores dificultan alcanzar un fenotipo “ideal” mediante el uso de métodos tradicionales de propagación. El uso de la biotecnología para identificar y corregir rasgos genéticos indeseables en variedades de mango representa un gran potencial. Algunas áreas de interés incluyen el retraso de la maduración y una vida poscosecha más larga, así como el aumento en la tolerancia a la congelación, resistencia a plagas y enfermedades. Los marcadores genéticos tienen especial

importancia debido a que su uso es compatible con métodos convencionales de propagación (Krishna and Singh 2007).

II.2 Problemas en el Manejo Poscosecha de Frutos de Mango

Los frutos climatéricos continúan los procesos de respiración, maduración y senescencia incluso después de ser cortados del árbol. A partir del momento en que el fruto es separado de la planta el fruto se encuentra en constante exposición a la pérdida de agua. Se han observado cambios en la expresión génica durante la maduración de frutos de mango, en particular cambios en la síntesis de mRNA y proteínas (Lopez-Gomez and Gomez-Lim). Las nuevas atmósferas creadas artificialmente para el almacenamiento y transporte de los frutos, crean un ambiente idóneo para la proliferación de diversas plagas. Por ejemplo, la mosca de la fruta y la antracnosis, ambas causantes de grandes pérdidas económicas en la cosecha y poscosecha del mango. Razón por la que se necesita la aplicación de tratamientos cuarentenarios que aseguren la eliminación de las mismas y proporcionen al fruto una mayor vida de anaquel (Jacobi et al., 2001).

La mosca de la fruta es una plaga común responsable de ocasionar daños directos e indirectos al fruto. Una vez que la hembra deposita sus huevecillos, las larvas se alimentan de la pulpa ocasionando que los frutos infectados caigan del árbol. Su picadura crea una entrada para patógenos como hongos y bacterias que a su vez aceleran la descomposición del fruto. Esto ocasiona pérdidas en su valor comercial, disminución del rendimiento, daños ambientales y su restricción al comercio internacional (Gómez, 2005).

La antracnosis es una enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* presente en gran variedad de plantas en zonas calurosas y húmedas. Entre sus síntomas se encuentran, manchas hundidas de diversos

colores en las hojas y necrosis en los nervios de tallos, frutos o flores, mismos que a veces derivan en marchitamiento y muerte de los tejidos. Lo anterior ocasiona pérdidas de rendimiento en el campo y en las plantas de empaque, así como una reducción en la calidad y comercialización del fruto (Huerta-Palacios et al., 2009). La detección de esta enfermedad se complica además por permanecer en estado quiescente en frutos inmaduros e inducir importantes daños en poscosecha (Osuna-García et al., 2007).

II.3 Tratamiento Hidrotérmico

México es el principal exportador de mango en el mundo, para mantener esa posición, México, asegura la inocuidad de éste producto apegándose al uso de buenas prácticas agrícolas y de manejo (Osuna et al., 2007). Los tratamientos térmicos han sustituido la fumigación con compuestos químicos como método cuarentenario por su fácil implementación y nulo impacto sobre el medio ambiente. Los tratamientos térmicos comerciales de mango más comunes son: el tratamiento con vapor, el tratamiento con aire caliente forzado y el tratamiento de inmersión en agua caliente o tratamiento hidrotérmico (TH). Siendo éste último el utilizado en los empaques de México por ser el más eficaz. Estos tratamientos a base de temperaturas extremas han demostrado ser eficaces en el control de plagas y patógenos (Álvarez-Virrueta et al., 2012).

El TH consiste en sumergir el fruto en agua caliente, con el objetivo de elevar su temperatura interna hasta un punto específico por un período de tiempo definido, lo que resulta letal para las plagas en cuestión. La transferencia de calor se produce desde el agua a la piel de la fruta, y de la piel a través de la pulpa hasta llegar al centro (Paull y Jung-Chen, 2000). Los principales países importadores (como EUA, Chile, Nueva Zelanda y China) exigen su

aplicación como requisito indispensable para permitir la entrada del mango a su mercado.

El tratamiento debe seguir las condiciones específicas indicadas en el protocolo oficial utilizado por cada país (Infante et al., 2011). Por ejemplo, el tratamiento con agua caliente aplicado a los mangos de exportación con destino a Estados Unidos debe llevarse a cabo en estricto apego al protocolo USDA APHIS PPQ, 2012. El protocolo establece que la temperatura del agua debe ser de 46.1°C (115°F), y que la duración de la inmersión varía según la forma y el peso de la fruta, como se muestra en la Tabla 1 (Brecht, 2010). La separación por tamaño es necesaria para asegurar que el calor del agua penetre los frutos completamente de manera uniforme.

Los frutos deben ser cosechados y tratados cuando se encuentran en la etapa de madurez fisiológica (frutos con cambio de color externo de verde intenso a verde pálido y color interno de blanco-verdoso a amarillo claro) (Muy-Rangel et al., 2009). En esta etapa, el fruto puede ser separado de la planta madre sin detener su proceso de maduración (Briceño et al., 2005). Cosechar el fruto en el momento adecuado permite aprovechar plenamente sus cualidades alimenticias. La madurez del fruto ha sido identificada como un factor crítico para determinar el nivel de tolerancia al calor de la fruta. Los frutos verdes, previos a la madurez fisiológica del mango, son más susceptibles a las lesiones por calor que los maduros. Estas lesiones son comúnmente descomposición interna, que se reconoce por la presencia de tejido almidonoso blanco y esponjoso en la parte interior del mesocarpio, a veces acompañado de un olor fermentado. La descomposición interna no presenta síntomas de daños externos visibles en los frutos afectados (Jacobi et al., 2001).

Tabla 1. Protocolos de Tratamiento Hidrotérmico de USDA APHIS (J.K. 2010).

Forma del Mango	Peso del Fruto (gramos)	Tiempo Requerido (minutos)
Redondeado¹	≤500	75
	501-700	90
	701-900	110 ³
Plano²	≤375	65
	376-570	75

¹Variedades Redondas: Tommy Atkins, 'Kent', 'Haden', 'Keitt'

²Variedades Planas: 'Francés', 'Ataulfo', 'Manila'

³Solo aprobado para México y Centroamérica

La aplicación del tratamiento hidrotérmico ocasiona varios efectos benéficos en los frutos de mango. La comercialización del mismo es beneficiada por el aumento en la tolerancia al daño por el frío, la reducción de la pudrición y el aumento en la calidad del fruto ya que el tratamiento acelera y uniformiza la maduración del mango (Álvarez-Virrueta et al., 2012).

A pesar de las ventajas mencionadas, la aplicación de este tratamiento puede tener un efecto indeseado sobre el metabolismo de los frutos que afecten su calidad. Algunas de las desventajas de ésta práctica son la pérdida de peso del fruto y las lesiones superficiales, así como las alteraciones en la actividad enzimática y el aumento en la velocidad de respiración, las cuales ocasionan hundimientos, ablandamiento y pudriciones de la pulpa (Álvarez-Virrueta et al., 2012).

Existen diferencias en las tolerancias al calor entre las diferentes variedades de mango. Esta diferencia en la termotolerancia entre variedades puede explicarse por diferencias anatómicas, como el espesor de la cutícula, o diferencias metabólicas como la expresión y funcionalidad de proteínas protectoras (Jacobi et al., 2001).

Es posible reducir o incluso eliminar las lesiones inducidas por el estrés térmico mediante un acondicionamiento previo de los frutos. Éste método consiste en exponer el fruto a una temperatura de almacenamiento recomendada (McDonald y Miller, 1994) que varía de entre 32 a 42 °C por un período determinado. De este modo se busca proteger el producto contra trastornos fisiológicos inducidos por el almacenamiento, así como mejorar su resistencia a la infección por patógenos (Klein y Lurie, 1992).

Estudios realizados en frutos de mango 'Kensington' con TH presentan lesiones inducidas por calor (Jacobi y Wong, 1992). Sin embargo, el acondicionamiento del fruto con aire a una temperatura interna del fruto a 37°C durante un período mínimo de 12 horas reduce la incidencia de lesiones (Joyce y Shorter, 1994). Es posible eliminar completamente las lesiones térmicas en 30 minutos si se aumenta la temperatura de acondicionamiento de 37 a 40 °C antes del tratamiento (Jacobi et al., 1995). Además de los cambios externos ocurridos en el fruto por efecto del TH, también se han observado cambios en la expresión de muchos genes. La Tabla 2 muestra el análisis de los transcriptomas de cascara de mangos '*Shelly*' realizado por Luria et al., 2014, donde se observan diferencias en la expresión entre frutos que recibieron TH y los no tratados. Existen 141 genes cuya expresión fue estimulada, incluyendo varias sHSPs. La cantidad más alta de genes expresados diferencialmente ocurre a los 20 min y el número de genes expresados diferencialmente disminuye conforme pasa el tiempo.

Tabla 2 Resumen de genes expresados diferencialmente por efecto de la aplicación de Tratamiento Hidrotérmico (TH) en cascara de mango (Luria et al., 2014).

Tiempo después del TH	Transcritos con abundancia incrementada	Transcritos con abundancia disminuida	Total
20 min	99	728	827
4 h	141	195	336
17 h	137	38	175
48 h	17	70	87

No existe un tratamiento de desinfestación por calor que sea aceptado para todas las variedades de mango. La diferencia en la respuesta entre las variedades de mango no ha sido estudiada completamente. A pesar de los estudios de tolerancia al calor ya realizados, aún es necesario investigar a un nivel más básico la respuesta fisiológica y bioquímica del fruto de mango al estrés térmico (Jacobi et al., 2001).

El conocimiento de los patrones de expresión de los genes codificantes de proteínas de choque térmico de frutos de mango tratados proporcionaría una sólida base de datos que ayudaran a entender las respuestas del mango ante un tratamiento térmico.

II.4. Proteínas de Choque Térmico

Los seres vivos reaccionan ante el estrés térmico aumentando la producción de un conjunto de proteínas altamente conservadas. Las proteínas de choque térmico, heat shock proteins (HSPs, por su nombre en inglés) son un grupo de proteínas altamente conservadas filogenéticamente, que cumplen un papel similar en todos los seres vivos (Coronato et al., 1999).

La función de una proteína está determinada por su estructura tridimensional o estructura terciaria, la cual les permite realizar su función. Las situaciones de estrés causan que las proteínas se desnaturalicen, con lo que pierden su estructura tridimensional, provocando la pérdida de funciones (Lindquist, 1986). La atracción entre los aminoácidos hidrofóbicos de las proteínas desnaturalizadas causa la formación de agregados proteicos. Para hacer frente a este problema, altos niveles de proteínas de choque térmico deben ser inducidos rápidamente. El incremento en la expresión de HSPs está regulado a nivel transcripcional, post-transcripcional y de traducción (Vahala et al., 1990).

La mayoría de las proteínas de choque térmico son chaperonas moleculares (Waters et al., 2008). Estas proteínas tienen la función de inhibir las interacciones celulares no deseadas y promover aquellas que son favorables, ayudando a la célula ya sea a conservar o degradar las proteínas desnaturalizadas, formando uniones estables y funcionales entre las proteínas.

Las HSPs son llamadas proteínas de respuesta al estrés, ya que sus niveles de expresión no aumentan solamente cuando los organismos se ven sometidos a un aumento en la temperatura. Timperio y colaboradores (2008), especificaron que además del rol que tienen las HSPs como chaperonas bajo estrés térmico, éstas también protegen a las células vegetales cuando la planta se somete a otros tipos de estrés. Cualquier situación estresante, como la disminución en temperatura, aumento de presión, cambios en el pH, traumatismos, entre otros, ocasiona la desnaturalización proteica. Bajo este tipo de condiciones la célula recurre a la síntesis de HSPs, mientras que al mismo tiempo interrumpe la traducción de otras proteínas y bloquea todos los procesos metabólicos restantes, incluyendo la replicación de DNA, la

transcripción y la exportación de RNAm, hasta que la célula se recupera (Al-Whaibi et al., 2011).

De acuerdo a la revisión de Gupta y colaboradores (2010) las proteínas de choque térmico pueden ser clasificadas en cinco familias, basándose en su peso molecular, homologías en la secuencia de aminoácidos, y funciones: Las familias HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y la familia de HSP pequeñas (sHSPs). Las sHSPs forman complejos con pesos moleculares entre los 200 a 800 kDa (Al-Whaibi et al., 2011). Cada una de ellas actúa sobre un rango específico de proteínas sustrato apoyándolas en su plegado, replegado, ensamblaje oligomérico, translocación y/o degradación (Fu, 2014).

Las sHSPs están presentes en los tres dominios de la vida (bacteria, archaea y eucarya). Los dominios α -cristalinos son los miembros más estudiados de la familia de las sHSPs. Representan más del 30% de proteína presente en la lente ocular de los vertebrados. Estos mantienen la solubilidad de otras proteínas lenticulares, evitando la dispersión de luz inducida por la formación de agregados. La importancia de este grupo prácticamente ubicuo de chaperonas moleculares es indicada por el hecho de que estas se expresan durante etapas específicas del desarrollo y bajo condiciones de estrés en muchos organismos (Haslbeck y Vierling, 2015).

Bajo condiciones de estrés las HSPs se unen a las proteínas desnaturalizadas para evitar que se agreguen, marcándolas para su posterior destrucción, o manteniendo las cadenas de polipéptidos desplegadas en un estado competente, de forma independiente o mediante la ayuda de otras HSPs dependientes de ATP (Fu 2014). Una vez que el estrés haya cedido, las proteínas podrán volver a su plegamiento inicial, recuperarán su conformación tridimensional y por lo tanto su función (Timperio et al., 2008).

El estudio de las proteínas de choque térmico y los genes que las codifican es de gran interés para los biotecnólogos, ya que hace posible dar respuestas a preguntas de gran importancia alimentaria, económica y médica. La exposición de un organismo a un ligero choque térmico es conocida popularmente como un método para extender su longevidad. El incremento en los niveles de HSP después de un choque térmico tiene el objetivo de inhibir la muerte celular causada por estrés. Un estudio realizado en humanos, en el que se analizó la asociación de la mortalidad con las variaciones genéticas comunes en genes que codifican a los miembros de las familias de HSP70, sHSPs, y el factor de choque térmico (HSF), sugiere que existe una asociación significativa entre las variaciones de HSF con todas las causas de mortalidad (Broer et al., 2013).

II.4.1 HSPs en las Plantas

Las plantas, por ser inmóviles, tienen una mayor necesidad de protección frente a factores de estrés ambiental, como lo son las altas y bajas temperaturas, anaerobiosis, pH alto o bajo, salinidad, sequía, condiciones oxidantes, metales pesados, entre otros, por lo que han desarrollado adaptaciones que les permiten tolerarlos. Dichas adaptaciones incluyen el mantenimiento de la estabilidad de la membrana celular, la captura de las especies reactivas de oxígeno, síntesis de antioxidantes, la regulación de osmótica, la inducción de cinasas que responden al estrés y el estímulo de la transcripción y transferencia de señales de proteínas chaperonas (Al-Whaibi et al., 2011).

Las plantas sintetizan tanto HSP de alto peso molecular (que van de 60 a 110 kDa) como de bajo peso (sHSPs), que van de 15 a 42 kDa. Barnett y colaboradores (2010) descubrieron la presencia de HSPs en plantas superiores, cuando analizaban la síntesis de proteínas en tejidos de tabaco

(*Nicotiana tabacum*) y soya (*Glycine max*) expuestos a choque térmico. Al hacer una comparación entre las células tratadas y las del grupo control se observó un nuevo patrón de síntesis de proteínas en las células tratadas que no ocurría en el grupo control. También se percataron de la similitud de tamaños que existe entre las HSP de tabaco y soya. Existe una temperatura óptima para la inducción de la mayoría de las HSPs (39–40 °C en tabaco y soya) y que si ésta es elevada aún más la síntesis de proteínas disminuye pudiendo llegar a ser casi indetectable (45 °C para tabaco y soya). Se concluyó que las plantas superiores exhiben una respuesta al choque térmico similar a la observada previamente en células animales.

Estudios posteriores como el análisis de las proteínas de choque térmico hecho en clones de sauce *Salix viminalis* L., han llegado a conclusiones similares. En este estudio se encontró que la temperatura óptima para la síntesis de proteínas de choque térmico en esta especie es de 37–40 °C. Se reportó también que se puede inducir la síntesis de HSPs a temperaturas más bajas (25–30°C). Y que a esas temperaturas la síntesis normal de proteínas presentes a una temperatura de crecimiento normal (20°C) no fue bloqueada completamente por el choque térmico. Seguido del choque térmico, el patrón de síntesis de proteínas normal se restableció después de 12 horas (Vahala et al., 1990).

Tanto las plantas procedentes de zonas tropicales o subtropicales como las de zonas templadas pueden ser dañadas por la exposición prolongada a temperaturas extremas. Las plantas de zonas tropicales, que incluyen frutos como el mango, aguacate (*Persea americana*), plátano (*Musa paradisiaca*), pepino (*Cucumis sativus*), pimiento (*Capsicum annuum*), calabacín (*Cucurbita pepo*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), son más sensibles a las bajas temperaturas que a las altas (Aghdam et al., 2013). Mientras que plantas de zonas templadas son más sensibles a las altas temperaturas que a las bajas. Se ha observado que cambios ligeros en las condiciones

ambientales inducen tolerancia a situaciones más extremas (Sabehat et al., 1998). Los cambios graduales de temperatura permiten que las plantas se aclimaten y logren tolerar temperaturas que resultarían letales si el cambio de temperatura ocurriera repentinamente (Sun et al., 2002).

Varios estudios muestran que la existencia de la tolerancia cruzada en plantas, es un fenómeno en el que la exposición a un factor de estrés en particular crea resistencia a otro factor de estrés diferente. La protección cruzada se ha demostrado en diferentes tipos de estrés como el estrés hídrico que estimula la resistencia al frío en papa (*Solanum tuberosum*) y plántulas de espinaca (*Spinacia oleracea*). El estrés por calor que protege de la toxicidad de metales pesados, aumenta la resistencia a la sal, induce la tolerancia al estrés hídrico y reduce el daño por el frío en frutos sensibles, como el tomate (Sabehat et al., 1998). Los mecanismos propuestos para explicar el fenómeno de la tolerancia cruzada a menudo sugieren que las proteínas específicas son inducidas por un tipo de estrés y están implicados en la protección contra otros tipos de estrés. Es muy probable que exista una superposición en las funciones de las diferentes HSPs lo que explica la tolerancia cruzada (Sabehat et al., 1998).

La expresión de HSPs ha sido evaluada en frutos que recibieron un tratamiento de acondicionamiento a temperaturas de 38-40°C. Cambios en la expresión génica para HSP17 y HSP70, en respuesta a la aplicación de los tratamientos de acondicionamiento han sido reportados en frutos de papaya (*Carica papaya* L.), tomate (*Solanum lycopersicon* Mill.) y aguacate (*Persea americana* Mill.) (Sabehat et al., 1996). En estos trabajos se encontró que la acumulación de las HSPs está relacionada con el aumento en la tolerancia al calor. Se puede suponer que la reducción de lesiones por calor observada cuando la fruta de mango es acondicionada (McDonald y Miller, 1994), se correlaciona con la producción de HSPs. Las condiciones óptimas necesarias para la producción de HSPs y la persistencia de las mismas en el tejido de

mango después de recibir un shock térmico aún son desconocidas (Jacobi et al., 2001).

II.4.2 HSPs Pequeñas en las Plantas

Las proteínas de choque térmico pequeñas (sHSPs) desempeñan un papel crucial en el control de calidad de las proteínas en las células. Son chaperonas moleculares presentes en todos los organismos, capaces de prevenir la agregación e inactivación de diversas proteínas desnaturalizantes sin utilizar ATP, o con la ayuda de HSPs más grandes que dependen de ATP. Estabilizan las membranas celulares dañadas (Nakamoto y Vigh, 2007; Fu, 2014) y participan en el plegado, la distribución intracelular, y degradación de proteínas (Zhu et al., 2013). Las sHSPs tienen pesos moleculares entre los 15 y 42 kDa, pero la mayoría de las sHSPs forman oligómeros grandes (de 12-40 subunidades) bajo condiciones *in vitro*, propiedad que se ha relacionado con su eficaz acción como chaperonas. Los oligómeros de sHSPs están contruidos a partir de una estructura dimérica subyacente (Haslbeck y Vierling, 2015).

Las plantas cuentan con diversidad y abundancia de sHSPs, reflejo de su necesidad de adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales (Sun et al., 2002). Al menos 12 familias de genes *sHSP* están presentes en las plantas superiores, con múltiples miembros en cada familia con lo que el número total de genes *sHSP* en plantas es de 20 o más; sin embargo existen plantas capaces de sintetizar más de 40 tipos de sHSPs (Waters et al., 1996). Aunque las sHSPs citoplasmáticas son las sHSPs más abundantes en plantas, las sHSPs tienen especial relevancia en la respuesta al estrés en plantas, ya que son las únicas células eucariotas en las que han sido localizadas sHSPs en organelos. En el resto de los eucariontes se localizan

únicamente en el citosol, con la excepción de la HSP mitocondrial de *Drosophila melanogaster* (Morrow et al., 2000) y *Toxoplasma gondii* (De Miguel et al., 2005). Las sHSPs son las proteínas más abundantes durante el estrés térmico en muchas plantas, y en ausencia de factores de estrés, la expresión de genes codificantes de sHSP ocurre solo en algunas etapas del desarrollo vegetal como la embriogénesis, germinación, desarrollo de granos de polen, y maduración del fruto (Al-Whaibi et al., 2011).

Bajo condiciones *in vitro*, las sHSPs son capaces de interactuar no selectivamente con la mayoría de las proteínas sustrato desplegadas. La unión del sustrato parece ser lograda principalmente por las secuencias variables no conservadas, fuera del dominio α -cristalino, lo que explica las variaciones en la especificidad de sustrato de diferentes sHSPs (Haslbeck y Vierling, 2015). Las sHSPs protegen preferentemente ciertas clases de proteínas funcionales, como las relacionadas con la traducción y las enzimas metabólicas (Fu, 2014). Las sHSPs en las plantas (soya y tomate) están asociados con ribosomas bajo condiciones de choque térmico, lo cual tiene sentido ya que el ribosoma es fácilmente afectado por el choque de calor, inactivando los componentes en la máquina de síntesis de proteínas (Mansfield y Key, 1988). La transcripción de estos genes está controlada por proteínas reguladoras llamadas factores de transcripción de estrés calórico (HSF), considerados activadores transcripcionales de la respuesta de choque térmico (Al-Whaibi et al., 2011).

Las sHSPs son más versátiles que HSPs de pesos moleculares grandes. El límite superior de peso molecular de las proteínas sustrato de sHSPs es mucho más alto que el de las proteínas sustrato de HSPs más grandes. Esto se debe a que mientras que en las HSPs grandes las proteínas sustrato tienen que ser encerradas en la cavidad a través de su extremo apical, éstas sólo necesitan ser incorporadas dentro de los oligómeros dinámicos y flexibles de sHSPs. Además, en condiciones neutras, las sHSPs son capaces

de incorporar proteínas con carga positiva o negativamente, a pesar de la carga negativa total de las sHSPs mismas (Fu, 2014).

La estructura primaria de las sHSPs se puede dividir en una secuencia no conservada N-terminal de longitud variable y estructuralmente desordenada, un dominio conservado α -cristalino y una secuencia C-terminal no conservada, flexible y corta (Haslbeck y Vierling, 2015). El dominio α -cristalino, característico de las sHSPs, tiene en promedio 94 aminoácidos de longitud, que forman un β -sándwich (Scharf et al., 2001). El β -sándwich se compone de dos hojas anti-paralelas de tres y cuatro filamentos- β , conectadas por un bucle inter dominio corto (Haslbeck and Vierling 2015). Bajo condiciones *in vitro* las sHSPs interactúan no selectivamente con casi todas las proteínas sustrato modelo desplegadas susceptibles a agregación, debido a la diversidad en la región amino terminal entre las sHSPs, lo que les permite unirse a un amplio rango de sustratos (Tripero, 2007). Las alteraciones en la región amino terminal de sHSPs afectan su actividad de chaperonas y formación de oligómeros (Studer et al., 2002). La extensión C-terminal también es bastante divergente entre las distintas clases de sHSPs, con la excepción del motivo conservado I-X-I, que es crucial en la formación de oligómeros funcionales de sHSPs. (Studer et al., 2002).

Existen 6 grupos de sHSPs. Esta agrupación está basada en la similitud de secuencias aminoacídicas y la localización de estas proteínas dentro de la célula (Sun et al., 2002). Las clases CI, CII y CIII, están localizadas en el citosol o en el núcleo. La organización de las sHSPs depende de la duración de las condiciones de estrés, pasando de estar distribuidas de manera uniforme a formar gránulos de choque térmico de prolongarse el estrés (HSGs). La clase P está localizada en los cloroplastos, la clase ER se localiza en el retículo endoplásmico y la clase M está localizada en las mitocondrias (Tripero, 2007). Existe otro tipo de sHSPs localizadas en

cromosomas que podrían constituir una nueva clase de sHSPs (Tripero, 2007).

Plantas transgénicas que expresan constitutivamente sHSPs presentan una termotolerancia basal mejorada. En el estudio de Chen y colaboradores (2014) en el que se evaluó en arroz la expresión e interacción de sHSPs en respuesta al estrés térmico, se menciona que sHSP26.7, sHSP17.9, sHSP17.4 and sHSP16.9 se sobreexpresaron en plántulas sometidas a estrés térmico. Al evaluar los niveles de expresión de estas 4 sHSPs en una variedad termotolerante de arroz y una termosusceptible, se encontró que las cuatro proteínas están expresadas en niveles significativamente más altos en la variedad termoresistente. Encontraron que el aumento en el nivel de expresión de estas cuatro sHSPs y la habilidad de las plantas para evitar el estrés térmico se relaciona positivamente. Utilizaron estas proteínas como biomarcadores de termotolerancia, con los que se identificaron variedades de arroz con habilidades diferentes para tolerar el estrés térmico.

II.4.3 sHSPs en Mango

El análisis de los transcriptomas de Mangos variedad 'Ataulfo' y 'Kent' (Dautt-Castro et al., 2015), en busca de sHSPs, reveló la existencia de un número muy similar de proteínas identificadas como sHSPs; 16 secuencias encontradas en variedad 'Kent' y 17 en la variedad 'Ataulfo'. La búsqueda de similitud entre las secuencias aminoacídicas de sHSPs de ambas variedades mostró que 11 de ellas tenían altos porcentajes de identidad. Al realizar análisis de las secuencias de sHSPs de mango 'Ataulfo' y las proteínas de arroz reportadas como marcadores biológicos para la termotolerancia, se encontraron 4 sHSPs con altos porcentajes de identidad.

Aunque se cuenta con información acerca de los niveles de termotolerancia en diferentes variedades de mango (Jacobi et al., 2001), no existe un análisis comparativo de la expresión de genes sHSP entre frutos de mango a los que se les ha administrado un choque térmico y frutos de mango en condiciones normales. En el presente estudio se analizaron los niveles de expresión génica de 4 sHSPs en el almacenamiento poscosecha de frutos de mango comparándose con la expresión génica en frutos que no fueron sometidos a TH, permitiéndonos realizar las primeras inferencias acerca de las posibles sHSPs que pudieran ser responsables de la termotolerancia en frutos de mango, así como cuáles sHSPs pudieran formar oligómeros para realizar su función de protección contra la degradación de proteínas ante el estrés térmico.

III. HIPÓTESIS

La expresión de los genes *MiHSP15.9*, *MiHSP17*, *MiHSP17.9* y *MiHSP25.8* se estimula en frutos de mango por efecto del tratamiento hidrotérmico aplicado como medida cuarentenaria.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Evaluar la expresión de genes que codifican para Hsp25.8, Hsp17.9, Hsp17 y Hsp15.9, en frutos de mango 'Ataulfo' sometidos a tratamiento hidrotérmico, en los días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento poscosecha.

IV.2 Objetivos Específicos

1. Obtener RNA de mesocarpio de mangos que han sido sometidos a tratamiento hidrotérmico y grupo testigo, para la posterior síntesis de cDNAs.
2. Evaluar los niveles de expresión de sHSPs por qPCR.
3. Modelar la estructura tridimensional de las sHSPs.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Obtención de Mangos 'Ataulfo' y Aplicación de Tratamiento Hidrotérmico

Los mangos utilizados en este experimental fueron cosechados en etapa de madurez fisiológica a los 120 días después de la floración (DDF) de una huerta comercial en Escuinapa, Sinaloa. Los mangos se dividieron en dos grupos, a uno de los cuales se les aplicó el tratamiento hidrotérmico (TH) y la otra mitad no fueron tratados (testigos). El tratamiento hidrotérmico se llevó a cabo en el empaque de la huerta de acuerdo al método de la USDA APHIS, para las variedades planas. El método consiste en colocar los frutos en agua a 46.1°C (115°F) durante 65 minutos. Posteriormente, los mangos fueron transportados al laboratorio en ambiente refrigerado donde se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm, se enjuagaron con agua y se almacenaron en una cámara de temperatura controlada a 20°C y una humedad relativa del 60%. Estos se clasificaron de acuerdo a su tamaño y apariencia, y se escogieron frutos con características uniformes para realizar este experimento.

V.2 Toma de Muestras

De la cámara de temperatura controlada fueron tomados 3 mangos tratados y 3 del grupo testigo a los días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento poscosecha. Se tomaron aproximadamente 60 gramos de mesocarpio que fueron cortados en cuadros con un cuchillo de acero inoxidable tratado con RNAzap (Sigma-Aldrich). El mesocarpio de mango se trituró, utilizando un mortero pre-enfriado y nitrógeno líquido, hasta la obtención de un polvo fino. Las muestras se almacenaron a – 80°C para su uso posterior.

V.3 Extracción de RNA Total

El mesocarpio de los mangos muestreados a los días 1, 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento poscosecha se utilizó para la extracción de RNA total conforme a la metodología descrita por López-Gómez y Gómez-Lim (1992), la cual se basa en la precipitación selectiva de carbohidratos utilizando iones potasio y etanol. Se tomaron 0.5 g de tejido pulverizado de mesocarpio de mango, al cual se le adicionó 1 mL de una solución de extracción (Tris-Base 150 mM, pH7.5, ácido bórico 1 M, SDS al 2%, EDTA 50 mM y β -mercaptoetanol al 1%), el β -mercaptoetanol fue añadido justo antes de llevar a cabo la extracción. Se agitó utilizando un vórtex y se le añadió 0.25 volúmenes de etanol absoluto y 0.11 volúmenes de acetato de potasio 5 M. Se agitó vigorosamente por 1 min y se adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 49:1. Se agitó con la mano y posteriormente se centrifugó a 20,000 $\times g$ a 4 °C durante 10 min. La fase acuosa se recuperó y se le adicionaron 2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó fuertemente con la mano hasta formar una emulsión. Después de centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones se recuperó la fase acuosa.

Para precipitar el RNA total se utilizó cloruro de litio en una concentración final en la muestra de 3 M durante toda la noche, a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 20,000 $\times g$ por 10 minutos a 4°C. El pellet de RNA precipitado se lavó dos veces con etanol al 75% y por último se resuspendió en agua libre de RNasas.

V.3.1 Evaluación de la Integridad, Concentración y Pureza del RNA Total

Se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Thermo Scientific) para medir la concentración de RNA total, así como las relaciones de absorbancia para determinar su grado de limpieza. Se llevó a cabo un análisis electroforético empleando un gel desnaturalizante de agarosa al 1%, con el propósito de observar la integridad del RNA total extraído del mesocarpio de mango de los diferentes días poscosecha. En la electroforesis se utilizó buffer MOPS (MOPS 0.2 M, pH 7.0, acetato de sodio 20 mM y EDTA 10 mM, pH 8.0), y una corriente de 40 volts durante una hora. Se cargó 1 µg de RNA total utilizando solución de carga para RNA. El análisis del gel se realizó por medio de tinción con GelRed (BIOTIUM), utilizando un equipo de fotodocumentación digital Gel Doc EZ (BioRad).

V.3.2 Eliminación de DNA Genómico

El DNA contaminante de las muestras de RNA total se eliminó utilizando la enzima DNasa I (Roche), incubando el RNA con 2.5 unidades de enzima por cada µg de RNA total, por un tiempo de 23 min a 35 °C. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió con la eliminación de la enzima, para lo cual se llevó la reacción a un volumen de 100 µL empleando agua libre de RNasas. Se adicionó 1 µL de EDTA 0.5 M a pH 8.0, 2 µL de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y 100 µL de solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Esta solución se mezcló mediante vórtex y fue centrifugada a 12,000 x g durante 6 min a 4°C. La fase superior se recuperó y se le adicionaron 300 µL de etanol absoluto frío y 10 µL de acetato de amonio 5 M, para llevar a cabo la precipitación del RNA incubando por 2 h a -20°C. Se centrifugó a 13,000 x g durante 20 min a 4°C y el precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNasas.

V.4 Síntesis de cDNA por Transcripción Reversa

Para evaluar la expresión de los genes que codifican sHSPs en mesocarpio de mango, se procedió como primer paso a la síntesis de DNA complementario (cDNAs). Se utilizó el sistema comercial *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, para la síntesis de cDNA, partiendo de 2.5 µg de RNA total previamente extraído. Este protocolo inicia con una fase de desnaturalización a 65 °C por 5 minutos de una mezcla que contiene el RNA templado, el iniciador y los dNTP's. Para la síntesis de la cadena sencilla de DNA, se empleó el iniciador oligo (dT) más 10 µL de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA. La reacción se incubó a 50 °C por 50 minutos. Una vez pasado este tiempo, la reacción fue sometida a una fase de terminación a 85 °C durante 5 minutos. Posteriormente para remover el RNA, se añadió 1 µL RNasa H incubando a 37 °C por 20 minutos.

V.5 Cuantificación de la Expresión Génica de sHSPs por PCR en Tiempo Real

El análisis de la expresión relativa para los genes que codifican proteínas de choque térmico pequeñas se realizó utilizando la mezcla comercial *iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD)*, oligonucleótidos sentido (Fw) y antisentido (Rv) (Tabla 3) a una concentración de 5µM, y cDNA como templado. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 11µL adicionando agua Milli-Q libre de DNAsas. Las reacciones se realizaron por triplicado en un termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies)*, bajo las siguientes condiciones de amplificación: Una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 35s y 72°C por 55s. Se

utilizaron tres reacciones como control negativo en las cuales el templado (cDNA) fue sustituido por agua.

Se realizaron ensayos de disociación con la finalidad de corroborar que solo un producto de amplificación fuera generado en la reacción y observar la amplificación de productos inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos. El ensayo consiste en incrementar gradualmente la temperatura hasta 95°C, registrando la intensidad de fluorescencia durante el proceso. La gráfica que se genera se conoce como curva de disociación. Al incrementar la temperatura, las cadenas de DNA se desnaturalizan gradualmente, disminuyendo la intensidad de fluorescencia registrada, al llegar a la T_m (Melting temperature) del amplicón, la velocidad de disociación se incrementa drásticamente, y la curva de disociación presentará un punto de inflexión a esta temperatura. La derivada negativa resulta en un pico que corresponde a la temperatura de disociación del producto de amplificación presente en la reacción.

Para llevar a cabo el análisis de expresión génica se empleó el valor de Ct (cycle threshold por sus iniciales en inglés). El Ct es un valor numérico que se calcula para indicar el ciclo en el cual la fluorescencia generada cruza un punto umbral que indica el producto amplificado generado durante la primera fase exponencial de la reacción. El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de transcrito presente en la muestra.

Se realizaron curvas de rangos dinámicos para cada gen de interés y el control endógeno o normalizador (*GAPDH* de mango) con el objeto de verificar que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y blanco) es cercana al 100%. Se calculó el ΔCt (Ct blanco - Ct control endógeno) para cada uno de los puntos. Esta validación indica que los genes de interés y el gen normalizador son amplificados con la misma eficiencia, y por lo tanto son comparables. Para los rangos dinámicos, se prepararon diluciones seriadas 1:5 a partir de los

100ng de cDNA, y se llevaron a cabo tres reacciones de amplificación para cada una.

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la evaluación génica de sHSP

Nombre	Iniciador Sentido 5'-3'	Iniciador Antisentido 5'-3'
<i>MiHSP15.9</i>	GGTTGTGTGTGGTTGATTG	TACCTTGCATGGATATGGC
<i>MiHSP17</i>	GTGTGACTGAGTGTGGATGT	TCTCGTACATTAGGTCCAAAGC
<i>MiHSP17.9</i>	CCAACGTGTTTGATCCCTT	GCAAATGCCGATGTTTCAC
<i>MIHSP25.8</i>	CCAGTTTGAGTTCGTGTTGC	TTGGTTGAGAGGAAAGGTGAG
<i>GAPDH</i>	GTGGCTGTTAACGATCCCTT	GTGACTGGCTTCTCATCGAA

V.5.1 Análisis de Expresión Relativa por PCR Cuantitativa

Los niveles de expresión génica de sHSPs en los mangos durante su almacenamiento poscosecha, se analizaron con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ según el procedimiento de Livak y Schmittgen (2001), Utilizando el gen constitutivo *GAPDH* como normalizador (Dautt-Castro et al., 2015). Se calculó la expresión génica realizando una comparación con los niveles de expresión en los frutos del día de madurez más avanzado (día 9), tiempo que se utilizó como calibrador. Éste análisis se hizo mediante la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen constitutivo})_{\text{Tiempo } x} - (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen constitutivo})_{\text{Tiempo } 9}$$

En donde el tiempo 9 es el tiempo de referencia (día 9) y el tiempo X son cada uno de los días de almacenamiento poscosecha muestreados en este estudio (1, 3, 5, 7 y 9).

V.6 Análisis Estadístico

Para determinar las diferencias estadísticas de los resultados de expresión génica se llevó a cabo un análisis de varianza simple con diseño completamente al azar (DCA), con el programa estadístico XLSTAT 2014. Los análisis de varianza fueron calculados tomando en cuenta los tratamientos y el tiempo de almacenamiento. En caso de haber diferencia de medias, se realizó una comparación mediante la prueba t de Student con un nivel de significancia de 0.05 y 0.01.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de PCR cuantitativa (qPCR) se compararon con los resultados de expresión génica obtenidos por RNA-seq del transcriptoma de mesocarpio de mango 'Ataulfo' (datos no publicados) mediante un análisis de regresión lineal. El coeficiente de correlación (R) se obtuvo por un análisis no paramétrico (Spearman) con el paquete estadístico XLSTAT 2014.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Análisis *In Silico*

Se identificaron transcritos que codifican proteínas de choque térmico pequeñas (sHSPs) en el transcriptoma de mango 'Ataulfo' (Dautt-Castro et al., 2015). Se encontraron doce sHSPs. Al analizar las secuencias aminoacídicas de cuatro de las sHSPs de la variedad 'Ataulfo' se identificó el dominio súper conservado α -cristalino que es característico de las proteínas de choque térmico pequeñas tal como se muestra en la Figura 1. Se identificó el codón de inicio y terminación de cada una de las proteínas, así como a las regiones no traducidas de los genes, 5'-UTR y 3'-UTR, con las cuales se realizó el diseño de los oligonucleótidos específicos.

A)

```
-32      -----taatatattcatccatcatcaacaaaattcatc
  1      M S L I P K L L L G D E P F D P F L S V
  1      atgtcgcttatcccaaaactgctgctcggtgatgaaccctttgacccttctctcagtg
 21      V N K C P V L N T P T D W K E T P D A H
 61      gttaacaagtgtccagtcctcaatactccgacggactggaaggagacccccgacgcccac
 41      V F T A D L P G L K K E E V K V E V E E
121      gtgttcacggccgatctcccagggctgaagaaggaggaggtgaaagttgaagtcgaggaa
 61      G R V L Q I S G E R T V E K D D K N D T
181      ggtagagtgctgcaaataagcggggagaggaccgtggaaaaagatgataaaaacgatacg
 81      W H R V E R C R G K F L R R F R L P E N
241      tggcatagagttgaacgttgccgtggcaagtttcttagaaggttcaggctgccgaaaat
101      A K M D E V K A S M E N G V L V V T I P
301      gccaatgatgatgaagtgaaggcgtcaatggagaatggagtgcttgtggtgacgattcct
121      K H E V K K P E K K V I E I E E I K G *
361      aaacatgaagtgaagaaccagagaagaagtgattgagattgaagaaatcaagggttga
421      gaaattattgaagggttggtgtgtggttgattgaaattataaatgtttgtgtgtgtgtg
481      tttgctctaagtgtggttttctgttttctctgtaatgttattctgccatatccatgcaag
541      gtacg
```

B)

```
-89 -----cactcgtataaatataaacgaaccaccta
ttttcttcaaacagttcgcagatctctctagacgttggttcaatttcatcagaagctcaaa
 1 M S M V P R G S L F D P F S L D V W D P
 1 atgtctatggttccaagaggaagcttggttcgacccattctcccttgatggttgggatcct
21 F K E F P F P S S Y F P R E T S A F V N
61 ttttaaggaattccccttcccttcttcttattttcctcgagaaacctctgctttcgtcaac
41 T R V D W K E T S E A H V F Q A D L P G
121 actcgtgtggactggaaggaaacttctgaagcccacgtggtccaggctgatcttccaggg
61 L K K E E V K V E I A D D R M L Q I S G
181 ctgaagaaagaggaagtgaaggtggagatcgcagacgcacaggatgctgcaaatcagtgg
81 Q R N I E K E D K N D T W H R V E R S S
241 cagaggaatatagaaaaggaagataagaatgacacgtggcaccgtgtggagcgtagcagt
101 G K F S R R F R L P E N A K M D Q I K A
301 ggcaaattctccaggaggtttaggttgccggagaatgcaaaaatggatcagatcaaggct
121 S M E N G V L T V T V P K A E I K E P N
361 tctatggagaatggagttctgacggtgactggtcctaaagcggagatcaaggaaccaat
141 V K A I D I S G *
421 gtaaaggccattgatatttctggctgaaactgaaaatggtatcttgatctgtgtgactga
481 gtgtggatgtgtacagtttgcagttgtaagcggatatttgtgtatgatatgaataatgtg
541 tataggcttggacctaagtacgagagtaatgttaatagtactacgaagtttgattttg
601 ttctgtgaaagcttaatctctgtgtgaaactttcttctcctcaaaaaaaaa
```

C)

```
-39 -----cgatcaaaagcttcaatctttcttcaatatttagcaaac
 1 M S L I P S I F G G R R T N V F D P F S
 1 atgtcactcattcctagcatttttgggtgggcaagaaccaacgtggttgatcccttttct
21 L D I W D P F D G F F T S A V A N V P S
61 ctggacatatgggatccatttgatgggttcttcacctcagcgggtggccaatgtgcccctct
41 S A R E T S A F A N A R I D W K E T P E
121 tcagctcgtgaaacatcggcatttgctaatacaagaatcgactggaaggagaccccagaa
61 A H I F K A D L P G L K K E E V K V E V
181 gctcacattttcaaagctgatcttccagggctgaaaaaggaagaggtgaaagttgaagtt
81 E E G R I L Q I S G E R S K E Q E E K N
241 gaagaggtagaattctgcagataagtggagagagaagcaagagcaagaagagaagaat
101 D K W H R V E R S S G K F L R R F R L P
301 gacaagtggcaccgcgtagagaggagcagcgggaagttcctgaggaggttcaggttgccg
121 E D A K M E Q V K A S M E D G V L T V T
361 gaggatgcaagatggagcaagtgaagctagcatggaggatggagtgtcactgtcact
141 V P K E E E K K P Q A K A I E I S G *
421 gttcctaaggaggaggagaagaagcctcaagctaaggccattgaaatctctggctaaagt
481 aaataaaaatgcctgttcagatgcaaacatgagtttgtttgcttgcttggttgggtt
541 tgtttgttttgagtgatattctctgtgtgagtactgagtgattgtaagaagcttaaaagc
601 aagtttttcaataatgaatttgtgtg
```

D)

```
-205 -----gtagaaagcaaagcaaacggtggcc
cagcgactccacagtcaaatacacaaccttcaagatttctctgcaaacttccccaaactttc
ttttaacctatctataaatacacttgtattcttctcaattcaagaccatctgaatttaat
actccagtttgagttcgtggttgcacatctttgtataacaaaattctttacaaattgatca
1   M A S A L S I S A S P F L S T K P K A S
1   atggcttcagcgctgtcaatcttcagcctcacctttcctctcaaccaagcccaaagcttca
21  P R K N V T P C R V V L S S R R S S R L
61  ccaagaaagaacgtaacgccctgtcagagttgtcctatcgtcagaggaggagctctcggctg
41  P V V R A E A A G D G K E N A V D V H V
121 cctgttgtagggctgaggccgctggggatggcaaggaaaacgccgtggacgtgcatggt
61  N Q G Q Q G N S S S V E R R P R R L A V
181 aatcaaggacaacaaggaactcttcttctgtggagcggcgaccgaggagactggctgta
81  D I S P F G L M D P F S P M R T M R Q M
241 gagatttcaccttttggttgatggatcctttttctccaatgaggacaatgctgcaaatg
101 L D T M D R L F E D T M T F P G S R N R
301 ttggacacaatggaccgtctcttcgaggacacccatgacattccccggcagccggaatcga
121 T M G E V R A P W D I K H E E N E I K M
361 acgatgggggaagtgcgagctccatgggacattaacacgaggaaaacgagatcaaaatg
141 R F D M P G L T K E D V K I S V E D D V
421 cgtttcgatatgccaggattgaccaaggaagacgtgaaaatctcggtgaggatgatgtc
161 L V I K G E H K K E E G G D G N D S W W
481 cttgtgataaaaggagagcacaaaaagaggaaggcggcgatggtaacgattcttggtgg
181 S R S V S N Y D T R L Q L P E N C D K G
541 agcagaagcgtcagtaattacgatactcgtcttcaacttctgaaaattgtgacaagggg
201 N I K A E L K N G V L Y I N I P K T K V
601 aatatcaaagctgagctcaagaatggtgttctttatatcaacattcctaagacaaaagtt
221 E R K V V D V Q I Q *
661 gaacgcaaggctcgttgatgttcaaattcagtaaatgatgtgtgaaatcttgaggctttat
721 gtaatcagtttgatattatgtatgaagtaatttgtaaagagaaagttttattcctaaatc
781 ac
```

Figura 1. Secuencias nucleotídicas y deducidas de aminoácidos de sHSPs de mango 'Ataulfo'. A) Hsp15.9 Clase I, B) Hsp17 Clase I, C) Hsp17.9 Clase I, C) Hsp25.8 Cloroplástica. El dominio α -cristalino se marca con un rectángulo, el codón de terminación está indicado por un asterisco.

Las sHSPs se clasifican de acuerdo a su localización celular. En este trabajo, haciendo uso de 3 servicios ofrecidos en portales de internet para la predicción de sitios de localización de las proteínas dentro de las células, se identificaron 3 sHSPs citosólicas y 1 sHSP cloroplástica Tabla 4. En trabajos realizados en arroz se identificaron 4 secuencias citosólicas que fueron propuestas como marcadores biológicos de termotolerancia en arroz (Chen et al., 2014). Al realizar el análisis de secuencias entre sHSPs de mango y arroz se encontró gran similitud entre las secuencias aminoacídicas de sHSPs de las dos especies. Las comparaciones entre las secuencias aminoacídicas de mango y arroz se muestran en la Figura 2.

Tabla 4. Predicción de Localización celular de sHSPs de mango Ataulfo.

Proteína	Psort	Predotar	TargetP	Localización
sHsp15.9	Ci (0.65)	Ci (0.76)	Ci (0.8)	Ci (Clase 1)
sHsp17	Ci (0.45) Px (0.39)	Ci (0.98)	Ci (0.67)	Ci (Clase 1)
sHsp17.9	Ci (0.45) Px (0.314)	Ci (0.93)	Ci (0.76)	Ci (Clase 1)
sHsp25.8	CP estroma (0.658) CP tilacoide (0.43)	CP (0.97)	CP (0.91)	CP

Cada proteína se analizó con PSORT, Predotar y Target P. La localización (Ci- Citoplasma, CP- cloroplasto, Px- peroxisoma) es seguida por su calificación de probabilidad en cada algoritmo de predicción.

Tabla 5. Comparativo entre sHSPs de Arroz reportadas como marcadores biológicos de termotolerancia y sHSPs de Mango 'Ataulfo'.

sHSPs Os	% Identidad	sHSPs 'Ataulfo'
Os 17.4 kDa clase I	74%	'Ataulfo' 15.9 kDa clase I
Os 17.9 kDa clase I	66%	'Ataulfo' 17kDa clase I
Os 16.9kDa clase I	73%	'Ataulfo' 17.9kDa clase I
Os 26.7 kDa cloroplástica	56%	'Ataulfo' 25.8 kDa cloroplástica

A)

Os 17.4 kDa clase I MSMLIRRSNVFDPPFSLDLWDPFDGFFPFGSGSGLFPRANSDAAAFAGARIDWKETPEAHVF
 Ataulfo 15.9 kDa clase I MSLIPKLLLGD-----EPFDPFL-----SVVNKCPVLNTPDWKETPD AHVF

Os 17.4 kDa clase I KADVPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERIKEQEEKTDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENTK
 Ataulfo 15.9 kDa clase I TADLPGLKKEEVKVEVEEGRVLQISGERTVEKDDKNDTWHRVERCRGKFLRRFRLPENAK

Os 17.4 kDa clase I PEQIKASMENGVLTVTVPKEEPPKKPDVKSISQ--ITG
 Ataulfo 15.9 kDa clase I MDEVKASMENGVLVVTIPKHEVKKPEKKVIEIEEIKG

B)

Os 17.9 kDa clase I MSMLIRRSNVFDPPFSLDLWDPFDGFFPFGSGSSSGSIFPSPFRGASSETAAAFAGARIDWKE
 Ataulfo 17kDa clase I MSMLVPRGSLFDPPFSLDVWDPFKEFPFSS-----YFPR----ETSAFVNTRVDWKE

Os 17.9 kDa clase I TPEAHVFKADVPGLKKEEVKVEVDGNILQISGERNKEQEEKTDQWHRVERSSGKFLRRF
 Ataulfo 17kDa clase I TSEAHVFQADLPGLKKEEVKVEIADDRMLQISGORNIEKEDKNDTWHRVERSSGKFLRRF

Os 17.9 kDa clase I RLPDPAKPEQIKASMENGVLTVTVPKEEAKKPDVKSISQISG
 Ataulfo 17kDa clase I RLPENAKMDQIKASMENGVLTVTVPKAEIKEPNVKAIDISG

C)

Os 16.9kDa clase I -----
 Ataulfo 17.9kDa clase I MSMLIPSI FGGRR TNVFDPPFSLDIWDPFDGFFTSAVANVPSSARETSAFANARIDWKETPE

Os 16.9kDa clase I -----EVEEGNVLVI SGQRSKEKEDKNDKWHRVERSSGQFMRFRFLP
 Ataulfo 17.9kDa clase I AHIFKADLPGLKKEEVKVEVEEGRILQISGERSKEQEEKNDKWHRVERSSGKFLRRFRLP

Os 16.9kDa clase I ENAKVDQVKAGLENGVLTVTVPKAEVKKPEVKAIEISG
 Ataulfo 17.9kDa clase I EDAKMEQVKASMEDGVLTVTVPKEEKKPKAKAIEIIS

D)

Os 26.7 kDa cloroplástica MAAPPFALVSRVSPAAARLP I RAARWR-RARPTVGLPSSGRARQLAVA--SAAQENRDN TAVD
 Ataulfo 25.8 kDa cloroplástica MASALS I--SASPFLSTKPKASPRKNVTPCRVVLSSRRSSRLPVVRAEAGDGKE-NAVD

Os 26.7 kDa cloroplástica VHVNDGGNQGN--AVQRRPRRS S ALDGI SPFGLVDPMS PMRTMRQMLDTMDRI FDDVA
 Ataulfo 25.8 kDa cloroplástica VHVNQG--QQGNSSVERRRRLA-VD-ISPFGLMDFSPMRTMRQMLDTMDRI FDDT-

Os 26.7 kDa cloroplástica LGFPATPRRSLATGEVRMPDVMEDDKEVRMRFDMPGLSREEVKVMVEDDALVIRGEHKK
 Ataulfo 25.8 kDa cloroplástica MTFPGSRNRIT--MGEVRAPWDIKHEENEIKMRFDMPGLTKEDVKISVEDDVLVIKGEHKK

Os 26.7 kDa cloroplástica EEGEGAE GSGDGWVKERSVSYDMRLALPDECDKS KVR AELKNGVLLVTVPKTEVERKVI
 Ataulfo 25.8 kDa cloroplástica EEG--DG-NDSWW-SR SVSNYDTRLQLPENCDKGNIK AELKNGVLYINIPKTKVERKVV

Os 26.7 kDa cloroplástica DVQVQ
 Ataulfo 25.8 kDa cloroplástica DVQIQ

Figura 2. Alineamientos de secuencias de aminoácidos de sHSPs de *Mangifera indica* variedad 'Ataulfo' y sHSPs de *Oryza sativa* utilizadas como marcadores biológicos de termotolerancia. A) 'Ataulfo' Hsp15.9kDa clase I y *Oryza sativa* Hsp17.4 kDa clase I. B) 'Ataulfo' Hsp17 kDa clase I y *Oryza sativa* Hsp17.9 kDa clase I. C) 'Ataulfo' Hsp17.9 kDa clase I y *Oryza sativa* Hsp16.9 kDa. D) 'Ataulfo' Hsp25.8 kDa cloroplástica y *Oryza sativa* Hsp26.7 kDa cloroplástica. Los alineamientos fueron creados con CLUSTAL W. Los aminoácidos que son idénticos en las proteínas analizadas se muestran sombreados en negro. En gris se muestran aminoácidos que son del mismo grupo químico.

Para 4 de las sHSPs de mango se encontraron altos porcentajes de identidad con sHSPs de arroz, como se muestra en la Tabla 5. Debido a la similitud entre estas proteínas, se realizó el análisis de la expresión génica en frutos de mango sometidos a TH. Es posible que estas proteínas estén involucradas en la protección del fruto de mango ante el estrés térmico causado por el tratamiento hidrotérmico, y la inducción de estas proteínas puede afectar su manejo poscosecha. Este trabajo sienta las bases para definir si alguna de las sHSPs en mango de la variedad 'Ataulfo' pudiera ser adecuada para estudios posteriores de termotolerancia de frutos de mango. En la Figura 3 se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de 3 sHSPs de mango Ataulfo analizadas en esta investigación, se puede observar el dominio α -cristalino muy conservado entre las sHSPs citosólicas CI.



Figura 3. Alineamiento de 3 sHSPs citosólicas de mango 'Ataulfo' analizadas en este trabajo, señalando con un rectángulo el dominio conservado α -cristalino. Los alineamientos fueron creados con CLUSTAL W. Los aminoácidos que son idénticos en las proteínas analizadas se muestran en letras blancas y celdas en negro. Las negras sombreadas en gris indican aminoácidos que son del mismo grupo químico.

VI.2 Evaluación de la Expresión Génica de las proteínas de choque térmico pequeñas

VI.2.1 Extracción de RNA

Se obtuvieron altos rendimientos en la obtención de RNA total, partiendo de 1 g de mesocarpio de mango. Las concentraciones variaron en un rango desde 50 a 1330 ng/ μ L, con un promedio de 648 ng/ μ L de RNA total.

La pureza del RNA total extraído del mesocarpio se determinó por medio de la relación DO 260/230, que se utiliza como medida secundaria de pureza de ácidos nucleicos. Para considerarse limpio éste debe presentar un valor entre 1.8 y 2.2 (Wilfinger et al., 1997). Los cocientes DO 260/280 obtenidos de todas las unidades experimentales están dentro de este rango, con un promedio de 2.1, lo que indica que el RNA obtenido está libre de contaminantes, como EDTA, carbohidratos o fenoles, que absorben a 230 nm.

Para evaluar cualitativamente la integridad del RNA se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con GelRed (BIOTIUM). En el análisis electroforético se puede observar la presencia de dos bandas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S. En general una proporción de 2:1 de las bandas ribosomales es representativa del RNA de buena calidad (Shepherd et al., 2015). En la Figura 4 se muestra el gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes en el cual se observa la integridad del RNA total extraído de mesocarpio de mango.

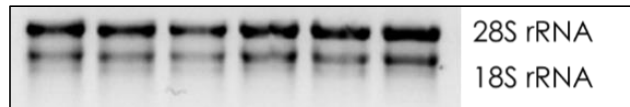


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA total extraído de pulpa de mango.

En un trabajo realizado con durazno (*Prunus persica*), al extraer RNA total obtuvieron un rendimiento de 24 $\mu\text{g/g}$ peso fresco, con una relación de DO 260/280 nm de 1.6 (Mesiel et al., 2005), inferior a la obtenida en mango en este trabajo. A diferencia de los resultados observados en mango, en extracciones realizadas en manzana y uva el grado de madurez influyó en la concentración del RNA total extraído. En manzana se observó una tendencia a menor obtención de RNA total mientras el fruto maduraba (Gasic et al., 2004). En uva en estado inmaduro se reportó una concentración de 150 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, mientras que en uva madura de 20 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco (Reinth et al., 2014).

VI.2.2 Síntesis de cDNA

Los cDNAs sintetizados se probaron mediante amplificación por PCR de un fragmento del gen constitutivo *GAPDH* y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 5). La presencia de un solo producto de amplificación en el gel indica que los cDNAs fueron sintetizados de manera exitosa y que pueden utilizarse en los ensayos de expresión génica.

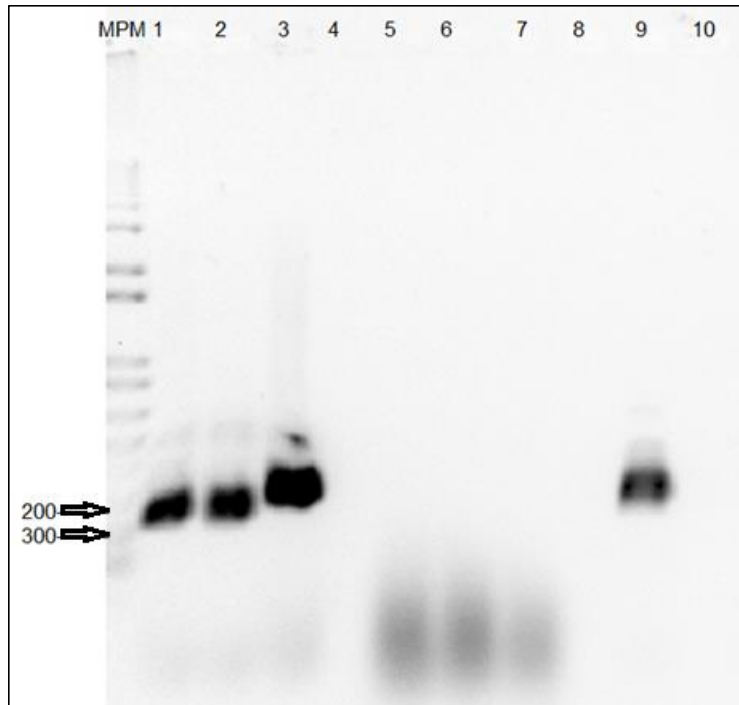


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa con productos de PCR utilizando iniciadores para *GAPDH* y como templado cDNA (carriles 1, 2 y 3) y RNA (5, 6 y 7). Se incluyen control + (carril 9) y control - (carril 10). La amplificación de *GAPDH* donde se utilizó cDNA como templado sirve para verificar la efectividad del proceso de síntesis de cDNA y la ausencia de amplificación en los carriles donde se utilizó como templado RNA sirve para verificar que el RNA total está libre de contaminación por DNA genómico.

VI.2.3 Construcción de modelos estructurales teóricos de sHSPs

En los modelos de las sHSPs 15.9, 17, 17.9 y 25.8 kDa de mango se observa el dominio conservado α -cristalino de alrededor de 85 a 100 aminoácidos como se muestra en la Figura 6. Los modelos fueron construidos en el programa Phyre 2 (Kelley et al., 2015). Se utilizó como modelo la estructura de rayos x de Hsp16.9 oligomérica de trigo *Triticum aestivum* que se encuentra disponible en el PDB ID: 1GME (van Montfort et al., 2001). La cantidad de información depositada en el PDB respecto a las sHSPs es muy poca, 1GME es la única estructura cristalográfica disponible de una sHSP vegetal.

El dominio α -cristalino consiste en un β -sándwich con dos láminas β -anti paralelas, que le confiere a la proteína actividad de chaperona, identificado en

color rojo. El dominio cuenta con residuos de unión a las proteínas que protegen (llamadas sustratos), y se activan jerárquicamente en una manera dependiente de la temperatura. Este mecanismo permite a las sHSPs reconocer proteínas sustrato que tienen estructuras diversas, mantener los complejos y facilitar la liberación del sustrato y replegado bajo la asistencia de otras chaperonas. Funciona utilizando interacciones débiles, incluyendo las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno (Fu et al., 2013). Además la diversidad en las regiones terminal amino (azul) y terminal carboxilo (verde) entre las sHSPs, les permite que puedan unirse a un amplio rango de sustratos (Waters et al., 1996). El amino terminal contiene algunas hélices alfa, mientras que el carboxilo terminal se encuentra completamente desordenado en las cuatro sHSP estudiadas.

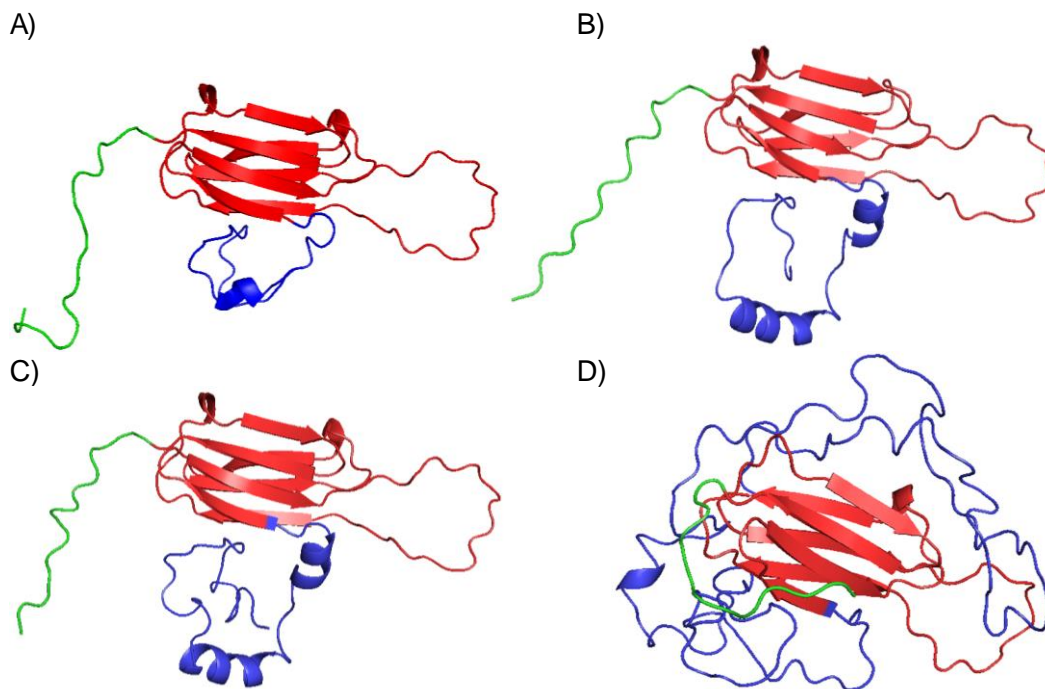


Figura 6. Modelos estructurales de proteínas de choque térmico pequeñas de mango 'Ataulfo'. El dominio α -cristalino marcado en rojo, la región amino terminal señalada en color azul y la secuencia carboxilo terminal señalada en verde. A) Hsp15.9 citosólica clase I, B) Hsp17 citosólica clase I, C) Hsp17.9 citosólica clase I y D) Hsp25.8 cloroplástica.

VI.2.4. Expresión Relativa de *HSP15.9* en Mangos Testigo Durante su Almacenamiento Poscosecha

En la Figura 7 se muestra la expresión relativa del gen que codifica para Hsp 15.9 citosólica durante su almacenamiento poscosecha a 20°C. Para el análisis de expresión génica se seleccionó como nivel de referencia (calibrador) los niveles de los mangos del día 9 de almacenamiento, los cuales se encontraban en el estado fisiológico maduro. En los frutos de mango testigo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de *HSP15.9* siendo diferente su expresión en los mangos del día 1 a sus niveles en los mangos de los días posteriores de almacenamiento poscosecha. Se observó el nivel de expresión de *HSP15.9* de hasta 480 veces en mangos del día 1 con respecto a los mangos de los días 3, 5, 7 y 9 de almacenamiento a 20°C en los cuales fue constante ($p > 0.05$). Esto podría sugerir una respuesta al estrés en el fruto al ser arrancado de la planta, lo cual puede explicarse por la función chaperona de las sHSPs protegiendo a la célula de diversos tipos de estrés. En el trabajo de Pandit y colaboradores (2010) reportaron que los niveles de una sHSP mitocondrial aumentaron progresivamente durante el almacenamiento poscosecha de mangos. Sin embargo en dicho estudio la primera medición se realizó en el segundo día después de la cosecha, por lo que el impacto transitorio que tuvo la separación de la planta en la expresión de sHSPs del fruto pudo haber pasado desapercibido en el primer día poscosecha.

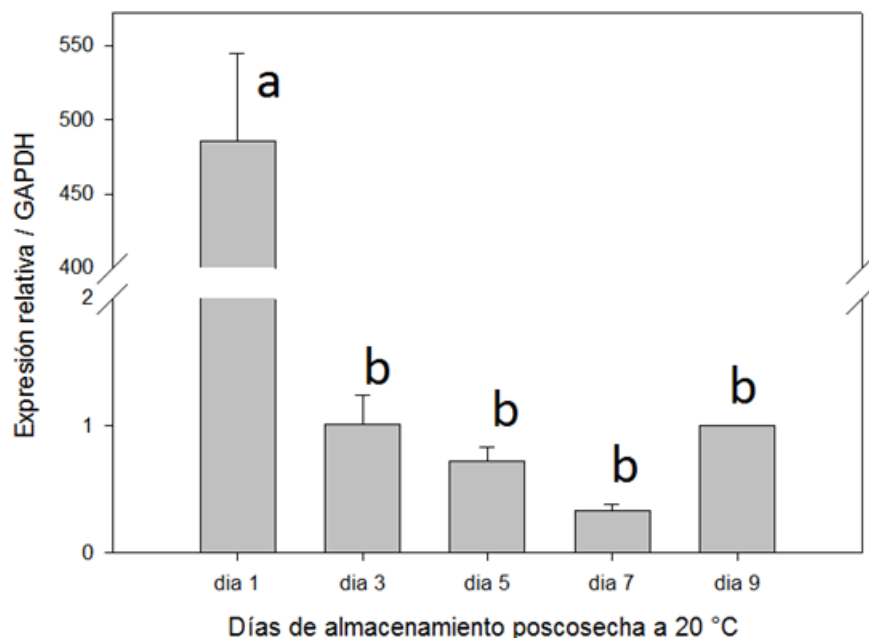


Figura 7. Expresión relativa del gen que codifica la Hsp15.9 en mangos 'Ataulfo' durante el almacenamiento poscosecha (mangos testigo). Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones (n=3). Las literales diferentes indican diferencias significativas mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 de almacenamiento poscosecha.

VI.2.5. Expresión relativa de *HSP15.9* durante el almacenamiento poscosecha de mangos tratados

La expresión de *HSP15.9* en mesocarpio de mangos que recibieron el tratamiento hidrotérmico se muestra en la Figura 8. El análisis estadístico de los valores de expresión demuestra que existen diferencias ($p < 0.05$) en la expresión de *HSP15.9* a lo largo de la maduración de los mangos. El nivel máximo de expresión se detectó en los mangos del día 1 de almacenamiento, siendo hasta 118 veces más elevado que en los mangos del día 9 de almacenamiento poscosecha. En los mangos del día 3 la expresión de *HSP15.9* disminuyó 4 veces con respecto a sus niveles en los frutos del día 1, mientras que en frutos del día 5 poscosecha se encontraron niveles de expresión más

altos que en aquellos del día 3, pero aún mucho más bajos que los encontrados en los frutos del día 1 como se muestra en la Figura 8. En los mangos muestreados en los dos últimos días (7 y 9) la expresión de *HSP15.9* disminuyó sin encontrarse una diferencia ($p>0.05$) en sus niveles de expresión en los mangos de estos dos últimos días.

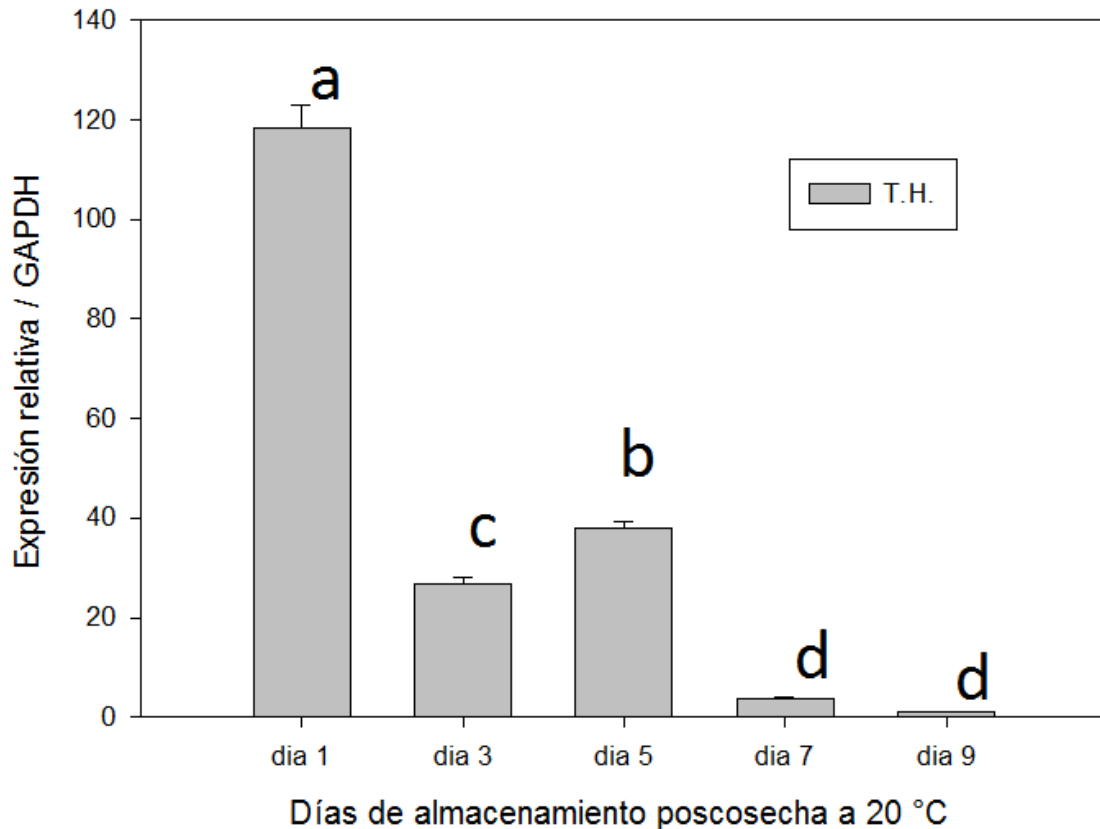


Figura 8. Expresión relativa del gen *HSP15.9* por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Ataulfo'. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones ($n=3$). Las literales diferentes indican diferencias mediante la prueba de Duncan ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha.

Los efectos del tratamiento hidrotérmico se observan en la Figura 9, donde se muestran los niveles de expresión relativa de *HSP15.9* en el mesocarpio de los frutos de mango testigo y los tratados. Los asteriscos muestran diferencias ($*P<0.05$; $**P<0.01$) en su expresión al comparar los resultados de los mangos del grupo testigo y del tratado en algunos de los días de almacenamiento poscosecha. Los niveles de expresión de *HSP15.9* en mangos tratados del día

3, 5 y 7, se estimularon con respecto a los niveles del transcrito acumulado en los mangos testigo. Sin embargo, en mangos tratados del día 1 los niveles de *HSP15.9* fueron 4 veces menos que los de los mangos testigo. Lo anterior sugiere que la Hsp15.9 es una proteína que protege contra otros tipos de estrés además del estrés por calor. La proteína Hsp15.9 de mango es 55% idéntica a una sHSP citosólica clase I de *A. thaliana* de 17.4 kDa (Waters et al., 2008). En un estudio de expresión de *AtHSP17.4* bajo diferentes tipos de estrés, se reportó un incremento de 100 veces en sus niveles por efecto del TH respecto a plantas testigo (Waters et al., 2008). Los niveles de expresión de *AtHSP17.4* incrementaron de 11 a 99 veces por otros tipos de estrés como la anoxia, la salinidad, el H₂O₂, el ozono y por estrés biótico inducido por *Botrytis cinerea*. Los frutos de mango en este trabajo fueron sometidos a estrés por calor, sin embargo, la transportación de los frutos, la ubicación dentro en los contenedores de transporte así como el estrés infligido por el corte del fruto del árbol aumentan el número de variables que tienen un efecto en la expresión de genes que codifican proteínas de defensa a diferentes tipos de estrés, entre ellas las sHSPs (Song et al., 2014).

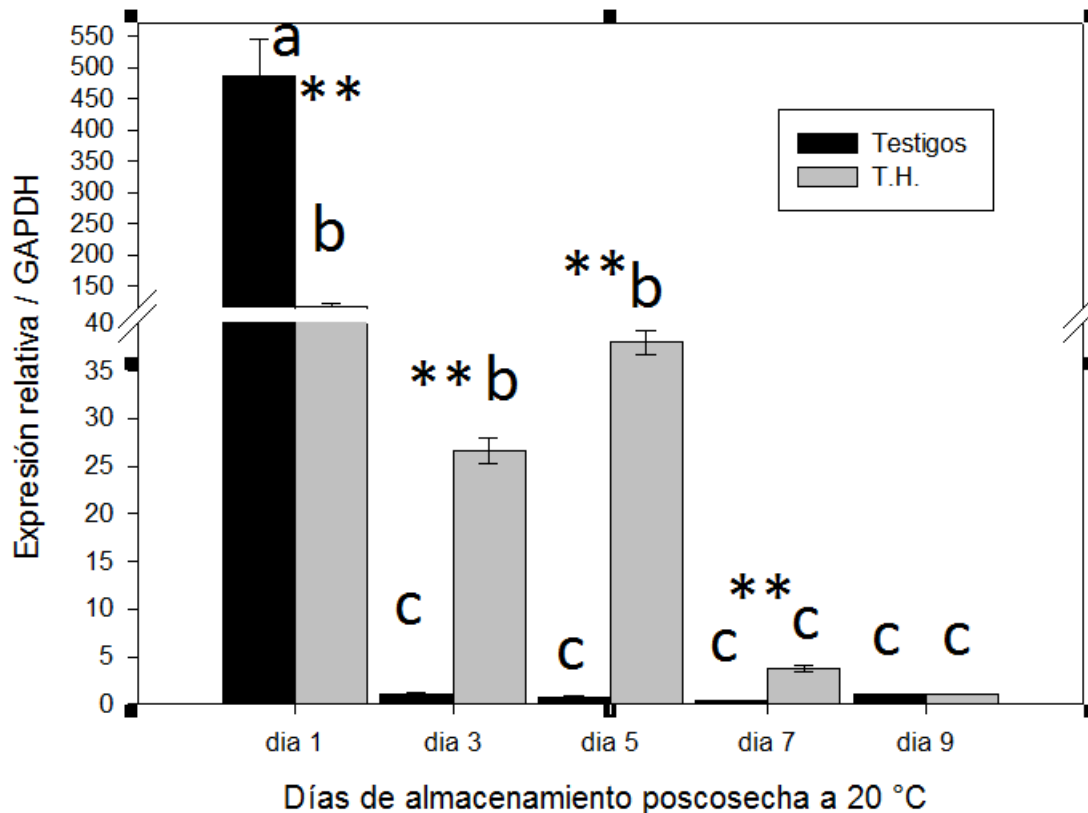


Figura 9. Comparación de la expresión relativa del gen que codifica para Hsp15.9 entre mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones ($n=3$). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Tukey ($p<0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre mangos tratados y testigo por día mediante la Prueba t para dos muestras independientes * $P<0.05$; ** $P<0.01$. Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha.

VI.2.6. Expresión Relativa de *HSP17* en Mangos Testigo en Poscosecha

En la Figura 10 se muestra la expresión relativa de *HSP17* en los mangos sin TH durante su maduración poscosecha. Se encontraron diferencias ($p<0.05$) en los niveles de expresión de *HSP17* en mesocarpio de los frutos de los días 1, 3, 5 y 7. En frutos del día 1 se detectó mayor cantidad de transcrito (16 veces más) que en frutos del día 9 que se utilizó como calibrador. En mangos del día 3 los niveles de expresión de *HSP17* se acumularon siendo de 14 veces más respecto a la cantidad de transcrito acumulado en frutos del día 9. En mangos

del día 5, la cantidad de transcrito acumulado es 4 veces mayor que en los frutos del día 9. En mangos del día 7, los niveles de expresión de *HSP17* disminuyen a los niveles del calibrador (día 9).

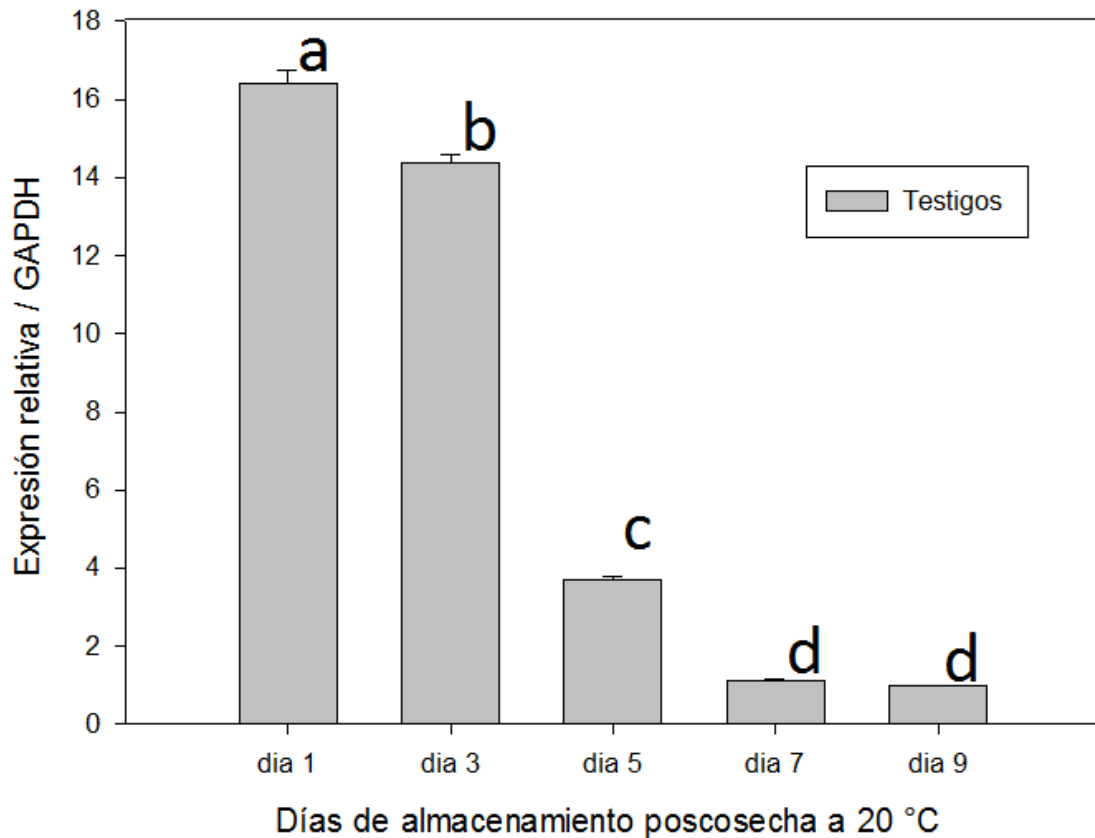


Figura 10. Expresión relativa de *HSP17* en la maduración poscosecha del mango 'Ataulfo' (mangos testigo). Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones ($n=3$). Las literales diferentes indican diferencias mediante la prueba de Tukey ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 de almacenamiento poscosecha.

VI.2.7. Expresión Relativa de *HSP17* en Mangos tratados Durante su Almacenamiento Poscosecha

Se evaluó la expresión relativa de *HSP17* en los mangos tratados. En la Figura 11 se observa que los niveles más altos de expresión se dieron en los frutos del día 1 de almacenamiento poscosecha con 40 veces más la cantidad de

transcrito que en frutos del día 9 (calibrador). En mangos de los días 3 y 5, los niveles de *HSP17* son aún altos con 15 y 29 veces más que en los mangos del día 9, respectivamente. Los niveles de expresión en mangos del día 7 fueron estadísticamente similares a los del día 9.

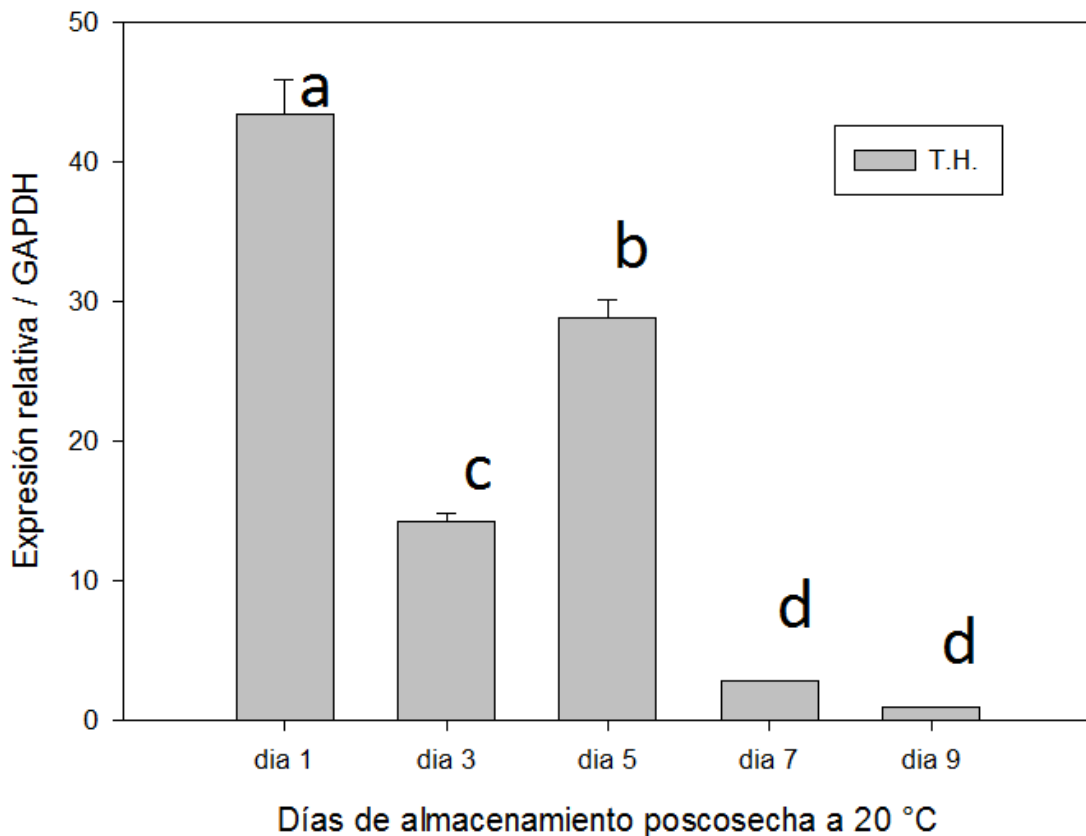


Figura 11. Expresión relativa de *HSP17* en mangos 'Ataulfo' que recibieron el tratamiento hidrotérmico. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones (n=3). Las literales diferentes indican diferencias mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha.

En la Figura 12 se muestran los niveles de expresión relativa de *HSP17* en los mangos que recibieron el TH y los testigos. La expresión de *HSP17* fue estimulada en ambos frutos a las 24 horas de aplicación del tratamiento (día 1); sin embargo, los niveles más altos se acumularon en los mangos que recibieron el TH, 2.5 veces más que en los testigos. Lo anterior sugiere que el tratamiento hidrotérmico estimuló la expresión de *HSP17* en los mangos. El transcrito acumulado en ambos mangos del día 3 disminuyó con respecto a los niveles en

los mangos tratados del día 1; sin embargo, los niveles son 15 veces más que el transcrito acumulado en mangos del día 9 (calibrador). En mangos del día 5, los niveles de expresión de *HSP17* en los mangos tratados, aumentó significativamente siendo 6 veces más que los niveles en los mangos testigos. La expresión de *HSP17* en los mangos tratados del día 7 fue mayor que en los mangos testigo, lo cual sugiere que el tratamiento hidrotérmico estimula su expresión.

La Hsp17 es 70% idéntica en su secuencia de aminoácidos a la proteína clase I de *A. thaliana* de 17.6 kDa citosólica. En un estudio de expresión de *AtHSP17.6* bajo diferentes tipos de estrés, se reportó un incremento de 100 veces en sus niveles por efecto del TH respecto a plantas testigo (Waters et al., 2008). Los niveles de expresión de *AtHSP17.6* incrementaron de 11 a 99 veces por otros tipos de estrés como el estrés osmótico, el H₂O₂ y el ozono.

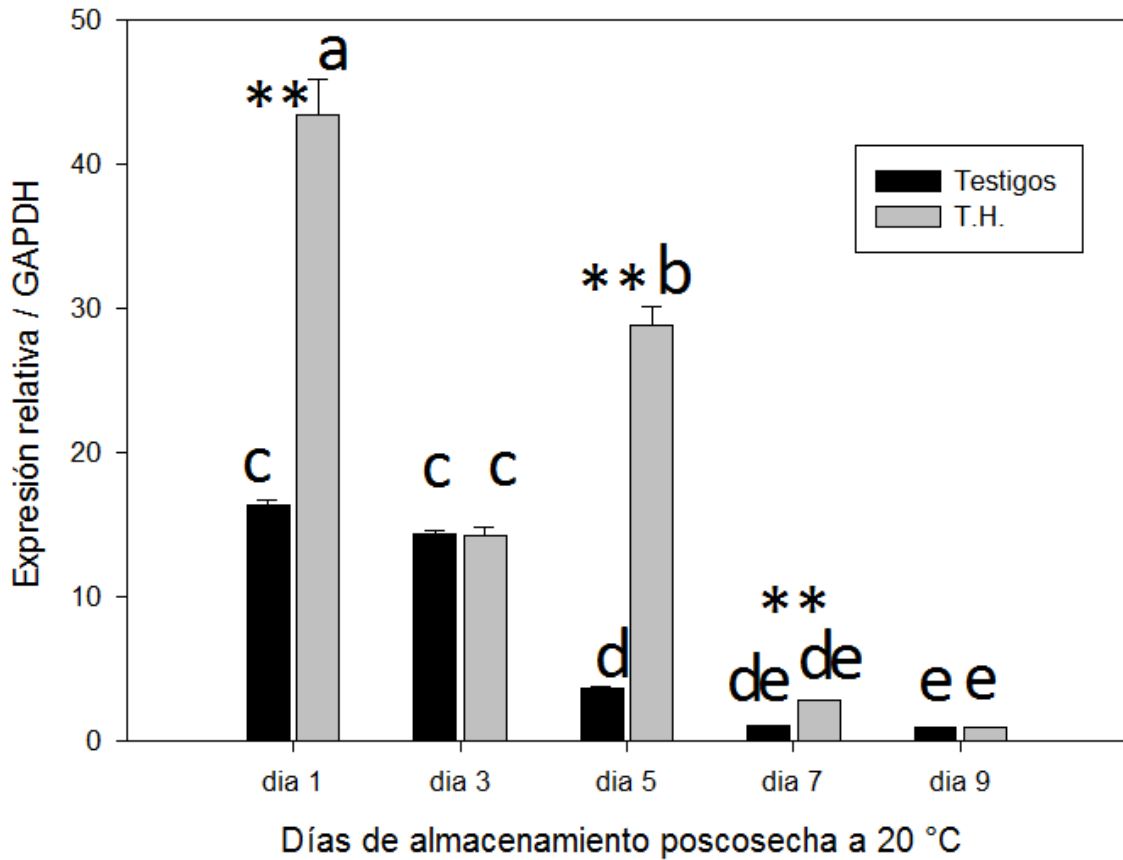


Figura 12. Comparación de la expresión relativa del gen que codifica para sHsp 17 entre mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones (n=3). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Fisher ($p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre mangos tratados y testigo por día mediante Prueba t para dos muestras independientes * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como referencia calibrador el día 9 poscosecha.

VI.2.8. Expresión Relativa de *HSP17.9* en Mangos Testigo

La Figura 13 muestra la expresión relativa del gen *HSP17.9* en los mangos testigo a lo largo de su almacenamiento poscosecha. El día 9 fue seleccionado como calibrador para comparación de los niveles de expresión. Se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *HSP17.9* en los mangos de los días 1, 3, 5, 7 y 9. En los mangos del día 1 se observaron los niveles más altos de expresión, con más de 40 veces la cantidad de transcrito encontrada

en el día 9. En mangos del día 3 los niveles disminuyeron, pero son 19 veces más con respecto al día 9 (calibrador). Los niveles de expresión de *HSP17.9* permanecieron constantes en los días 5, 7 y 9 ($p>0.05$).

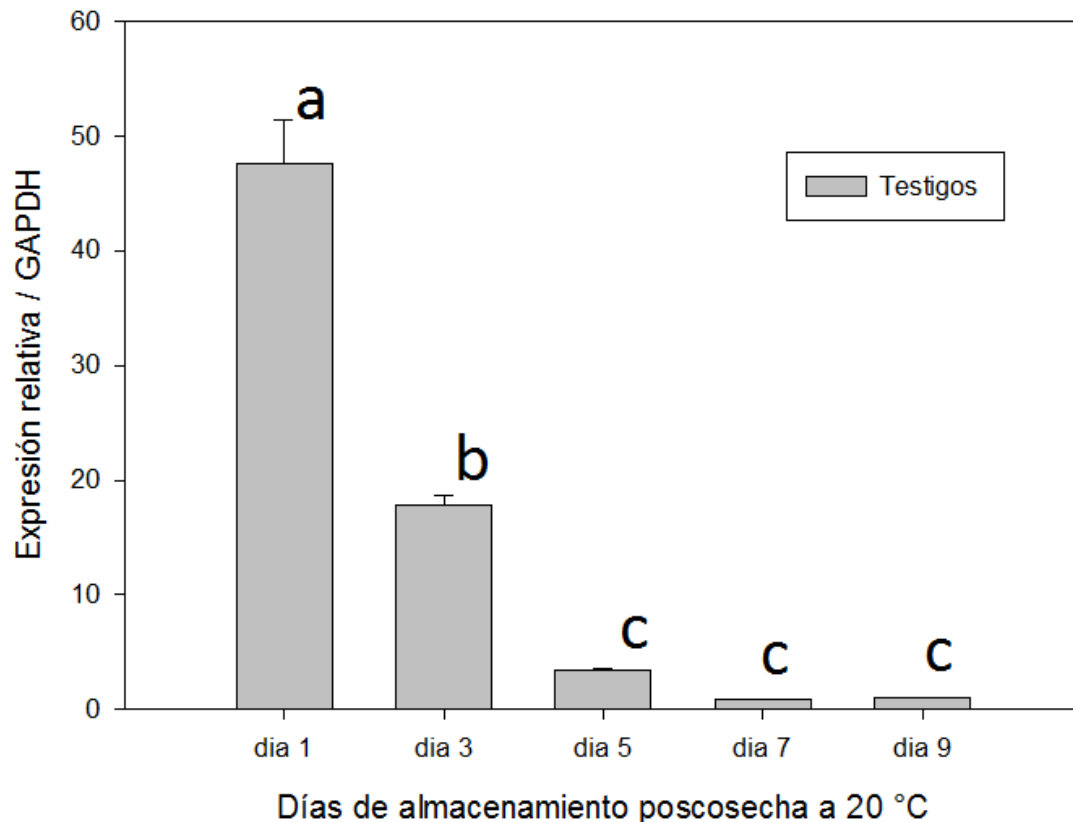


Figura 13. Expresión relativa del gen *HSP17.9* en la maduración del mango 'Ataulfo' (mangos testigo). Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones ($n=3$). Las literales diferentes indica diferencias mediante la prueba de Tukey ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha.

VI.2.9. Expresión Relativa de *HSP17.9* en Mangos tratados Durante su Almacenamiento Poscosecha

La Figura 14 muestra los niveles de expresión de *HSP17.9* en los mangos que recibieron el tratamiento hidrotérmico. El análisis estadístico de los datos muestra que existen diferencias ($p<0.05$) en la cantidad de transcrito de *HSP17.9* en los mangos de los diferentes días de almacenamiento poscosecha.

Los niveles más altos de expresión se obtuvieron en los frutos del día 1 con 26 veces la cantidad de transcrito encontrada en mangos del día 9 de almacenamiento poscosecha. En mangos de los días 3 y 5, se encontraron menos de la mitad de transcritos encontrados el día 1. El descenso de su expresión continúa el día 7, llegando a su nivel más bajo el día 9, aunque no existe una diferencia estadística significativa entre estos dos días.

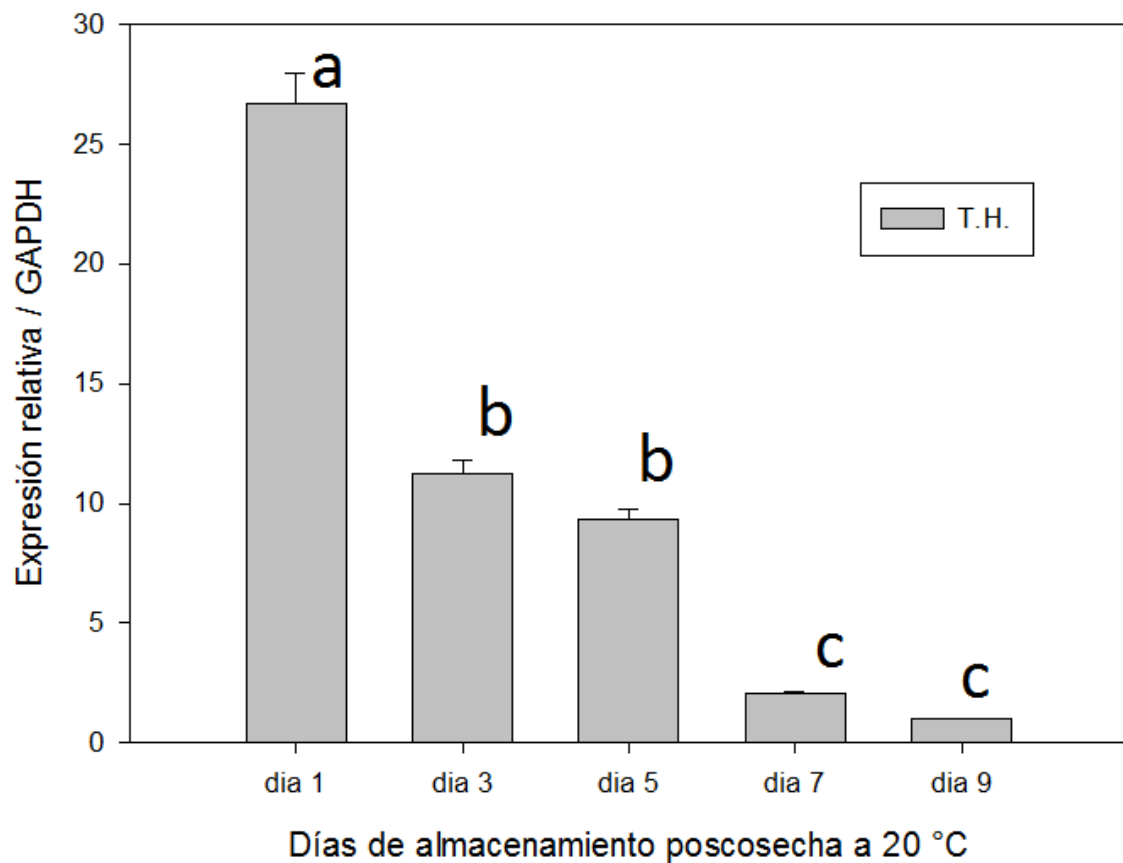


Figura 14. Expresión relativa de *HSP17.9* por efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos 'Ataulfo'. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones (n=3). Las literales diferentes indican diferencias mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 de almacenamiento poscosecha.

En la Figura 15 se muestran los efectos del tratamiento hidrotérmico en los niveles de expresión relativa de *HSP17.9* en el mesocarpio de los mangos. Se observa una diferencia significativa en su expresión al comparar los resultados del grupo testigo y del tratado para cada uno de los días (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Ambos grupos siguieron la misma tendencia donde se observaron los niveles más altos en el día 1 y la cantidad de transcritos disminuyó progresivamente a lo largo del almacenamiento poscosecha. La variación de los niveles de expresión fue mayor en los mangos testigo que en mangos que recibieron el TH. Notablemente se detectó que sus niveles de expresión, en mangos muestreados los días 1 y 3, fueron más altos en el grupo testigo que en los tratados. Siendo 2 veces mayor que los tratados en el día 1 y 50% más alta en el día 3. Este comportamiento se revierte a partir del día 5 donde se encontró 3 veces más cantidad de transcritos en mangos tratados que en los testigos.

Esta proteína es 79% idéntica a la proteína de 17.6 kDa citosólica clase I de *A. thaliana* la cual observa un incremento en su expresión de más de 100 veces por efecto del TH y H₂O₂ respecto al grupo testigo. (Waters et al., 2008). Debido a que la expresión de la sHSP 17 kDa de mango 'Ataulfo' también es afectada ($p < 0.05$) por efecto del calor, y que su similitud con la sHSP de *Arabidopsis* es alta, es probable que esta proteína cumpla las mismas funciones y tenga la capacidad de proteger a los frutos de mango de una diversa cantidad de tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos.

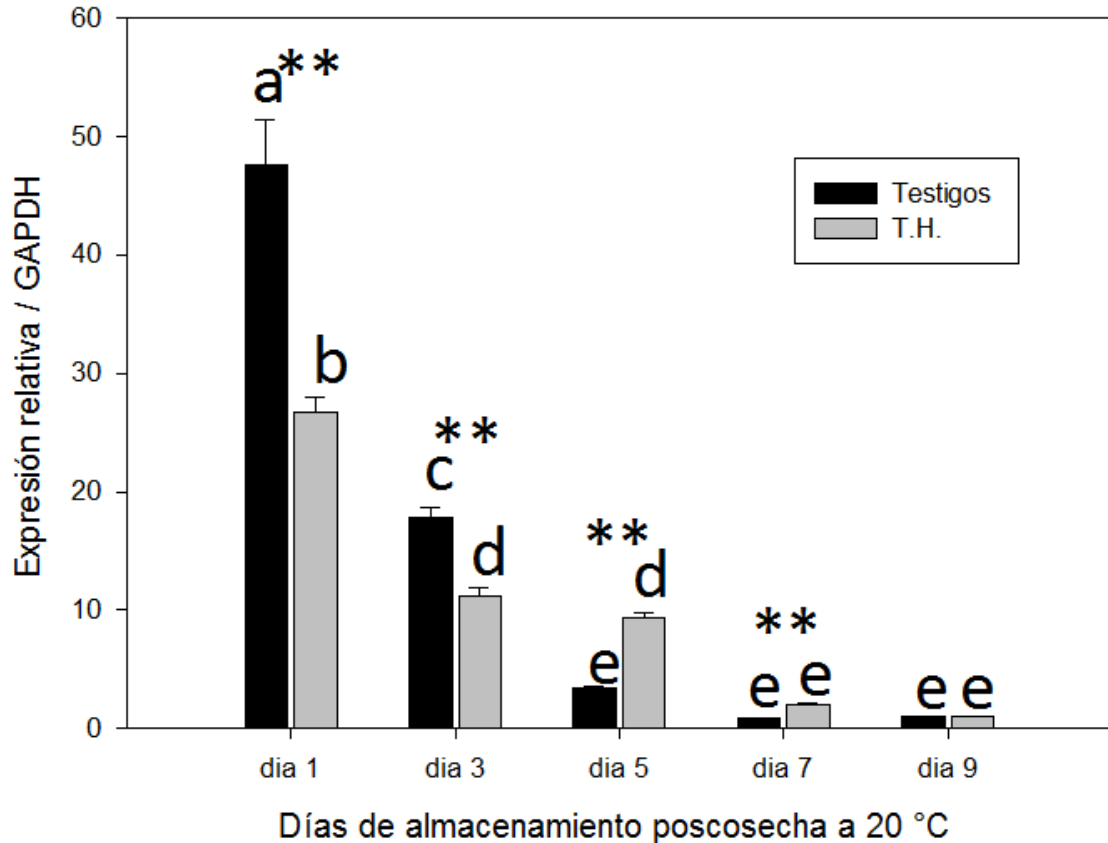


Figura 15. Comparación de la expresión relativa del gen *HSP17.9* en mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones (n=3). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Fisher ($p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre mangos tratados y testigo por día mediante Prueba *t* para dos muestras independientes * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha.

VI.2.10. Expresión Relativa de *HSP25.8*

En la Figura 16 se puede observar la expresión relativa del gen *HSP25.8* en los mangos testigo a lo largo de su almacenamiento poscosecha. Al igual que en el caso de las otras 3 sHSP, se seleccionó el día 9 como calibrador. Los niveles de expresión son significativamente más altos los días 1 y 3, que el resto de los días.

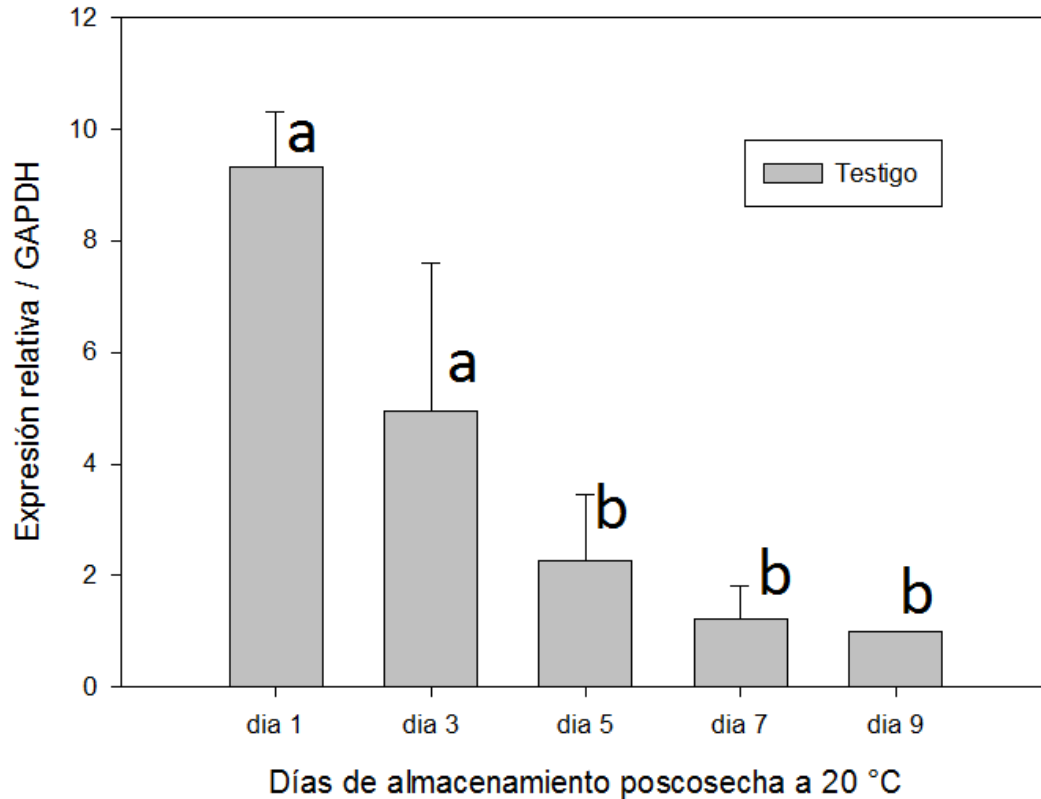


Figura 16. Expresión relativa del gen *HSP25.8* en la maduración del mango 'Ataulfo' (mangos testigo). Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones (n=3). Las literales diferentes indican diferencias mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha.

VI.2.11. Expresión Relativa de sHSP 25.8kDa en mangos con TH

La Figura 17 muestra los niveles de expresión de *HSP 25.8* en los mangos tratados hidrotérmicamente. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en los niveles de expresión de esta sHSP provocados por el paso del tiempo de almacenamiento poscosecha. El día 1 tiene 68 veces la cantidad de transcrito encontrada en el día 9 de almacenamiento poscosecha. El día 3 su expresión se redujo alrededor de un 50% a comparación del muestreo anterior. Lo mismo sucedió en el día 5. El día 7 la expresión de esta sHSP se redujo 90% respecto al muestreo anterior.

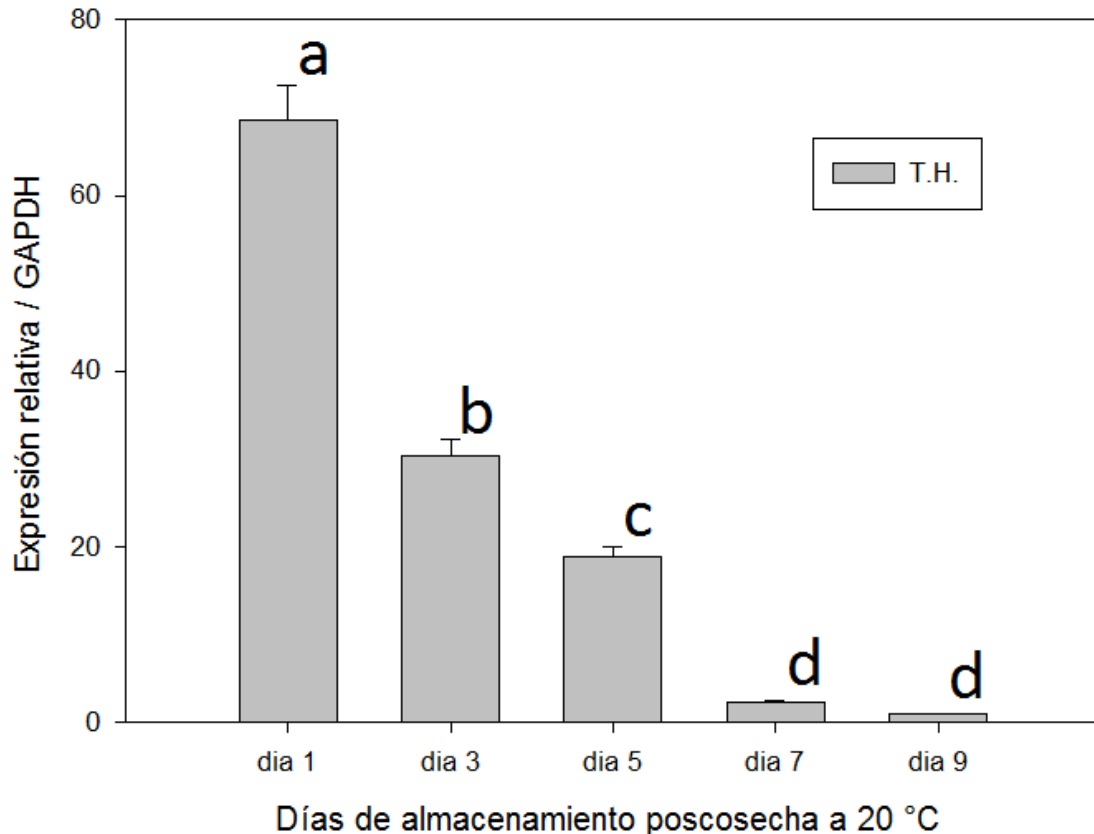


Figura 17. Expresión relativa *HSP25.8* en mangos 'Ataulfo' que recibieron el TH. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones ($n=3$). Las literales diferentes indican diferencias mediante la prueba de Tukey ($p<0.05$). Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha

En la Figura 18 se muestran los niveles de expresión relativa de *HSP25.8* en los mangos que recibieron el TH y los testigos. La tendencia de disminuir su expresión conforme transcurre su periodo de almacenamiento poscosecha se observó en los dos grupos. La expresión relativa de esta sHSP fue significativamente mayor por efecto de la aplicación del TH en 3 de los días evaluados. El máximo nivel de expresión se registró en mangos tratados del día 1 de almacenamiento poscosecha con 68 veces la cantidad de transcrito encontrada en el día 9. En el día 1 la aplicación del TH se observó un aumento en los niveles de expresión de esta proteína 7 veces más alto que lo encontrado en los mangos testigo del mismo día. En el día 3 después de la aplicación del TH, elevó los niveles de expresión de esta proteína 6 veces respecto a lo

encontrado en los mangos testigo del mismo día. En el día 5 la aplicación del TH aumento los niveles de expresión de esta proteína 8.5 veces respecto a lo encontrado en los mangos testigo del mismo día. El grupo testigo alcanzó sus niveles mínimos de expresión el día 5, y los mangos tratados alcanzaron sus niveles mínimos el día 7 manteniéndose estables el resto de su almacenamiento poscosecha.

Esta proteína es idéntica en un 65% a la proteína de 21 kDa cloroplástica de *A. thaliana*, que en el trabajo de (Waters et al., 2008) tiene reportado un incremento en su expresión de más de 400 veces por efecto del TH respecto al grupo testigo. Ellos también reportaron un cambio en el patrón de expresión de esta proteína por efecto de H₂O₂ elevando su expresión de 11 a 99 veces la del grupo testigo. Un análisis de expresión génica de *HSP26.13p* cloroplástica de *Chenopodium álbum* (cenizo o quinuilla) la cual tiene 63% de identidad con la sHSP 25.8 kDa cloroplástica de mango Ataulfo, revela que los transcritos de esta proteína se acumulan en plantas bajo estrés por metales pesados y térmico (Haq et al., 2013). La regulación diferencial de la misma sHSP cloroplástica permite desempeñar un doble papel en la protección de la planta de ambos tipos de estrés. Ya que la expresión de sHSP 25.8 kDa de mango 'Ataulfo' también es afectada significativamente por efecto del calor, y la gran similitud con las sHSPs de *Arabidopsis* y Cenizo mencionadas es probable que esta proteína desempeñe las mismas funciones en los frutos de mango y tenga la capacidad de protegerlos ante diversas causas de estrés.

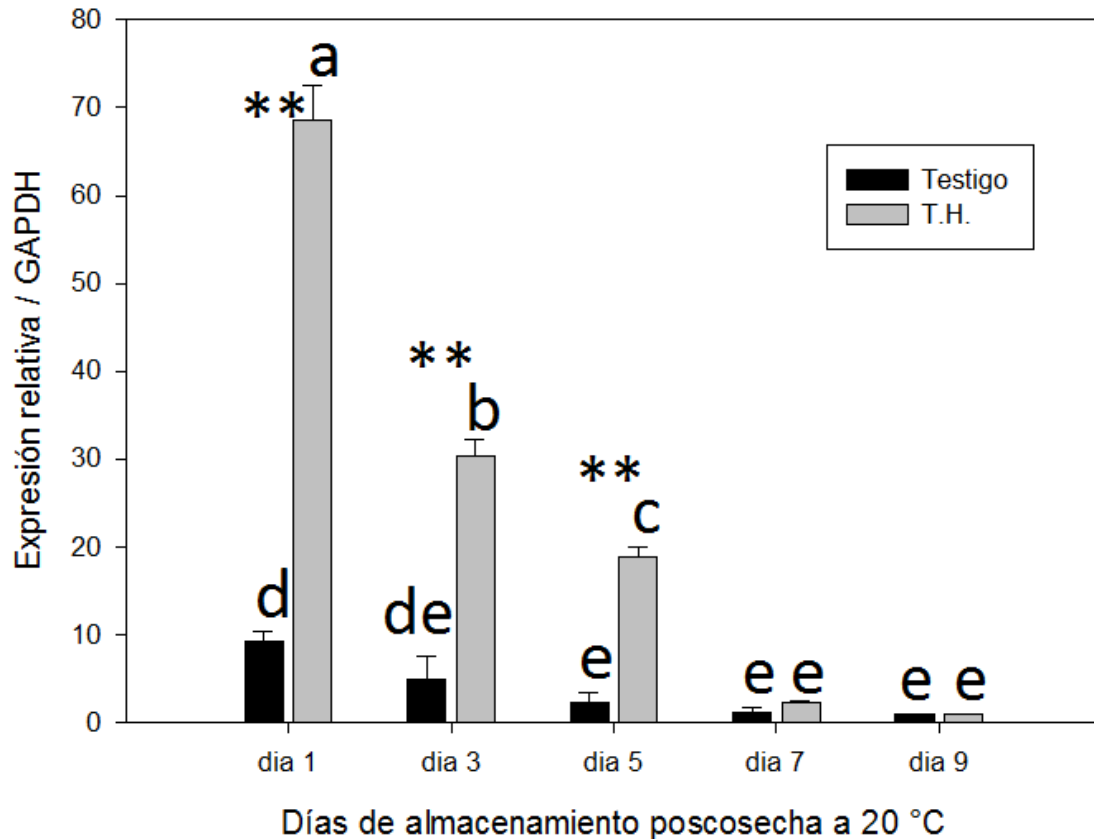


Figura 18. Comparación de la expresión relativa del gen *HSP25.8* en mangos 'Ataulfo' que recibieron tratamiento hidrotérmico y mangos testigo. Las barras muestran la media \pm ES de tres mediciones ($n=3$). Diferente literal indica diferencias mediante la prueba de Tukey ($p<0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre mangos tratados y testigo por día mediante Prueba t para dos muestras independientes $*P<0.05$; $**P<0.01$. Los datos fueron evaluados según la fórmula descrita por Livak y Schmittgen (2001) tomando como calibrador el día 9 poscosecha.

VI.2.12 Validación de la Expresión Génica Obtenida por RNA-seq

Se validaron los datos de expresión diferencial de *sHSPs* 15.9, 17, 17.9 y 25.8 obtenidos mediante qPCR al compararlos con los obtenidos mediante RNA-seq (Dautt-Castro et al., 2015). Los resultados de las relaciones de expresión de genes *sHSP* en mangos testigo en el día 1 de almacenamiento poscosecha, se muestran en la Figura 19. Un análisis de regresión lineal mostró que existe un coeficiente de correlación de $R= 0.93$, que indica una alta correlación positiva entre la abundancia de transcrito encontrada por qPCR y el perfil de

transcripción encontrado en los datos de RNA-seq. Los resultados de las relaciones de expresión de genes *sHSP* en mangos tratados en el día 1 de almacenamiento poscosecha se muestran en la Figura 20. El análisis de regresión lineal arroja un coeficiente de correlación de $R= 0.77$, lo que indica una correlación positiva entre la cantidad de transcrito encontrada por qPCR y el perfil de transcripción encontrado en los datos de RNA-seq.

Estos datos nos muestran que aunque los cambios en la expresión de los genes seleccionados variaron entre los análisis realizados mediante qPCR y RNA-seq, las tendencias de expresión genética observada mediante estas 2 diferentes estrategias fueron consistentes.

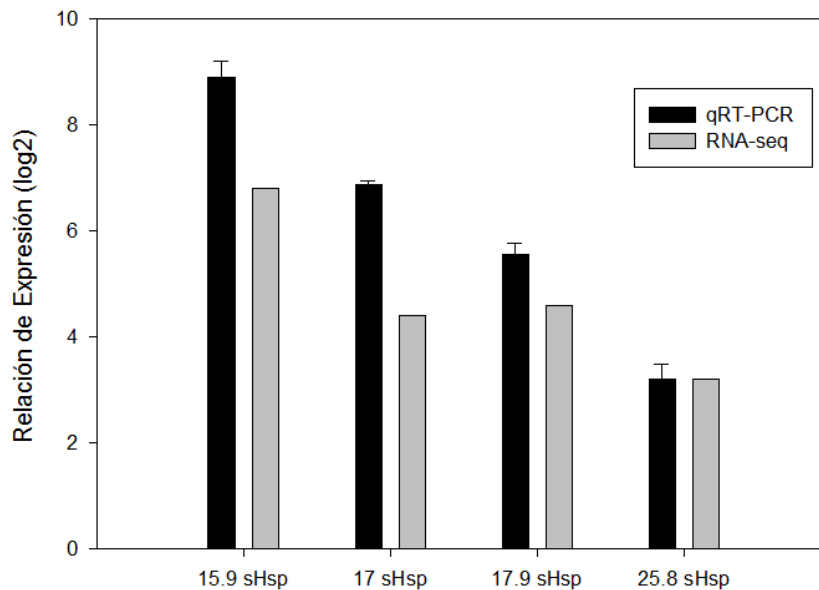


Figura 19. Perfil de expresión (Log2) calculado con datos obtenidos por qPCR y RNA-seq de 4 genes sHSP seleccionados de mangos testigo muestreados el día 1 de almacenamiento poscosecha.

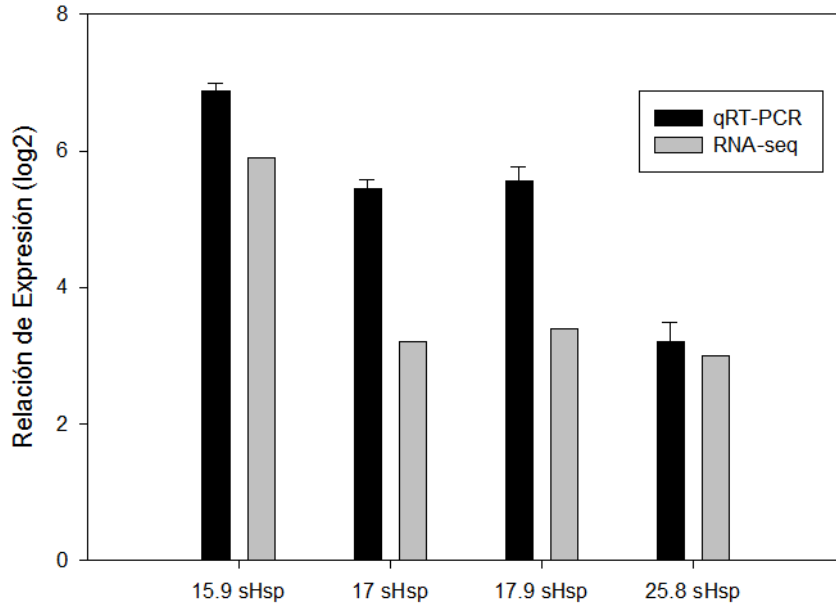


Figura 20. Perfil de expresión (Log2) calculado con datos obtenidos por qPCR y RNA-seq de 4 genes sHSP seleccionados de mangos tratados muestreados el día 1 de almacenamiento poscosecha.

VI.3 Resumen de Resultados

- Los transcritos de las proteínas de choque térmico evaluadas se acumulan en mangos tratados y testigo desde el día 1 al 9 de almacenamiento poscosecha.
- La expresión génica de las cuatro sHSPs fue diferente en los frutos que recibieron el tratamiento hidrotérmico (TH) comparado con los frutos testigo.
- La expresión de MiHSP17 y MiHSP25.8 se incrementó por efecto del TH en los mangos de los días 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento poscosecha.
- La expresión de MiHSP15.9 y MiHSP17.9 se estimuló por efecto del TH; sin embargo, al día 1 de aplicado el TH su expresión fue menor que en los frutos testigo.

VII. CONCLUSIONES

La aplicación del TH a frutos de mango Ataulfo estimula la expresión de los genes que codifican para las proteínas de choque térmico MiHSP17 y MiHSP25.8. De forma importante, dos de las proteínas de choque térmico tuvieron una respuesta rápida y dos una respuesta retardada. Esto sugiere que tienen una regulación transcripcional distinta. Futuros trabajos deberán abordar el estudio de las regiones promotoras para conocer las diferencias en los mecanismos de regulación de la respuesta al choque térmico.

REFERENCIAS

Aghdam, M. S., L. Sevillano, F. B. Flores and S. Bodbodak (2013). "Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables." *Scientia Horticulturae* 160(0): 54-64.

Al-Whaibi, M. H. (2011). "Plant heat-shock proteins: a mini review." *Journal of King Saud University-Science* 23(2): 139-150.

Álvarez-Virrueta, D. R., E. G. García-López, E. Montalvo-González, J. A. Ramírez, M. Mata-Montes-de-Oca and B. Tovar-Gómez (2012). "Effect of high hydrostatic pressure on postharvest physiology of the "Ataulfo" mango." *CyTA - Journal of Food* 10(3): 173-181.

AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th Edition, EUA.

Arce, D., F. Krsticevic, M. Bertolaccini, J. Ezpeleta, S. Ponce and E. Tapia (2015). Analysis of Small Heat Shock Protein Gene Family Expression (RNA-Seq) during the Tomato Fruit Maturation. VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014, Paraná, Argentina 29, 30 & 31 October 2014, Springer.

Barnett, T., M. Altschuler, C. N. McDaniel and J. P. Mascarenhas (1979). "Heat shock induced proteins in plant cells." *Developmental Genetics* 1(4): 331-340.

Bibi, F. and M. K. Baloch (2014). "Postharvest Quality and Shelf Life of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit as Affected by Various Coatings." *Journal of Food Processing and Preservation* 38(1): 499-507.

Broer, L., E. Demerath, M. Garcia, G. Homuth, R. Kaplan, K. Lunetta, T. Tanaka, G. Tranah, S. Walter and A. Arnold (2013). "Association of heat shock proteins with all-cause mortality." *Age* 35(4): 1367-1376.

Briceño, S., J. Zambrano, W. Materano, I. Quintero and A. Valera (2005). "Calidad de los frutos de mango "Bocado" madurados en la planta y fuera de la planta cosechados en madurez fisiológica." *Agron. Trop* 55(4): 461-473.

Central Intelligence Agency. "FIELD LISTING : AGRICULTURE – PRODUCTS."
https://www.cia.gov/library/publications/resources/the-world-factbook/fields/print_2052.html : cia.gov.17 Mar. 2011

Chen, X., S. Lin, Q. Liu, J. Huang, W. Zhang, J. Lin, Y. Wang, Y. Ke and H. He (2014). "Expression and interaction of small heat shock proteins (sHsps) in rice in response to heat stress." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1844**(4): 818-828.

Coronato, S., W. Di Girolamo, M. Salas, O. Spinelli and G. Laguens (1999). "Biología de las proteínas del shock térmico." Medicina (Buenos Aires) **59**: 477-486.

Dautt-Castro, M., A. Ochoa-Leyva, C. A. Contreras-Vergara, M. A. Pacheco-Sanchez, S. Casas-Flores, A. Sanchez-Flores, D. N. Kuhn and M. A. Islas-Osuna (2015). "Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp de novo transcriptome assembly identifies gene families important for ripening." Frontiers in Plant Science **6**: 62.

De Miguel, N., P. Echeverria and S. Angel (2005). "Differential subcellular localization of members of the *Toxoplasma gondii* small heat shock protein family." Eukaryotic cell **4**(12): 1990-1997.

Fu, X. (2014). "Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins." Acta Biochimica et Biophysica Sinica **46**(5): 347-356.

Fu, X. (2014). "Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins." Acta biochimica et biophysica Sinica: gmt152.

Gasic, K., A. Hernandez and S. S. Korban (2004). "RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction." Plant Molecular Biology Reporter **22**(4): 437-438.

Gomez H.M., (2005). Las moscas de la fruta. Colombia, Lineas Digitales

GUIDI, S., M. NANNI and G. POLENTA (2012). "Evaluación de proteínas de estrés térmico en frutos sometidos a tratamientos térmicos poscosecha."

Gupta, S. C., A. Sharma, M. Mishra, R. K. Mishra and D. K. Chowdhuri (2010). "Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?" Life sciences **86**(11): 377-384.

Haq, N. U., S. Raza, D. S. Luthe, S. A. Heckathorn and S. N. Shakeel (2013). "A dual role for the chloroplast small heat shock protein of *Chenopodium album* including protection from both heat and metal stress." Plant Molecular Biology Reporter **31**(2): 398-408.

Haslbeck, M. and E. Vierling (2015). "A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis." Journal of molecular biology **427**(7): 1537-1548.

He, J., F. Ma, Y. Chen and H. Shu (2012). "Differentially expressed genes implicated in embryo abortion of mango identified by suppression subtractive hybridization." Genetics and Molecular Research **11**(4): 3966-3974.

Huerta-Palacios, G., F. Holguín-Meléndez, F. A. Benítez-Camilo and J. Toledo-Arreola (2009). "Epidemiología de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México." Revista mexicana de fitopatología **27**: 93-105.

Infante F., Q. J., Rocha F., Esquinca H., Castillo A., Ibarra-Núñez G y and P. V. (2011). "Mango Ataulfo: Orgullo Chiapaneco. ." Biodiversitas(96): 1-5.

J.K., B. (2010). Mango postharvest best management practices manual. U. o. F. IFAS.

Jacobi, K. K., E. A. MacRae and S. E. Hetherington (2001). "Postharvest heat disinfestation treatments of mango fruit." Scientia Horticulturae **89**(3): 171-193.

Jacobi, K. K. and L. S. Wong (1992). "Quality of 'Kensington' mango (*Mangifera indica* Linn.) following hot water and vapour-heat treatments." Postharvest Biology and Technology **1**(4): 349-359.

Jacobi, K. K., L. S. Wong and J. E. Giles (1995). "Effect of fruit maturity on quality and physiology of high-humidity hot air-treated 'Kensington' mango (*Mangifera indica* Linn.)." Postharvest Biology and Technology **5**(1-2): 149-159.

Joyce, D. C. and A. J. Shorter (1994). "High-temperature conditioning reduces hot water treatment injury of Kensington Pride mango fruit." HortScience **29**(9): 1047-1051.

Kelley, L. A., S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass and M. J. Sternberg (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." Nature protocols **10**(6): 845-858.

Klein, J. D. and S. Lurie (1992). "Heat treatments for improved postharvest quality of horticultural crops." HortTechnology **2**(3): 316-320.

Krishna, H. and S. K. Singh (2007). "Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement — A review." Biotechnology Advances **25**(3): 223-243.

Lindquist, S. (1986). "The Heat-Shock Response." Annual Review of Biochemistry **55**(1): 1151-1191.

Livak, K. and T. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method." Methods **25**: 402-408. Lopez-Gomez, R. and M. Gomez-Lim (1992). "A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp." HortScience **27**(5): 440-442.

Lopez-Gomez, R. and M. Gomez-Lim (1993). "Changes in mRNA and protein synthesis during ripening in mango fruit." Journal of plant physiology **141**(1): 82-87.

Luria, N., N. Sela, M. Yaari, O. Feygenberg, I. Kobilier, A. Lers and D. Prusky (2014). "De-novo assembly of mango fruit peel transcriptome reveals mechanisms of mango response to hot water treatment." BMC Genomics **15**(1): 957.

Mansfield, M. A. and J. L. Key (1988). "Cytoplasmic distribution of heat shock proteins in soybean." Plant physiology **86**(4): 1240-1246. Masibo, M. and Q. He (2009). "Mango bioactive compounds and related nutraceutical properties—a review." Food Reviews International **25**(4): 346-370.

McDonald, R. and W. Miller (1994). "Quality and condition maintenance." Quarantine treatments for pests of food plants.

Meisel, L., B. Fonseca, S. González, R. Baeza-Yates, V. Cambiazo, R. Campos, M. Gonzalez, A. Orellana, J. Retamales and H. Silva (2005). "A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses." Biological research **38**(1): 83-88.

Mitra, S. and E. Baldwin (1997). "Mango." Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits: 85-122.

Morrow, G., Y. Inaguma, K. Kato and R. M. Tanguay (2000). "The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization." Journal of Biological Chemistry **275**(40): 31204-31210.

Muy Rangel, D., B. Espinoza Valenzuela, J. Siller Cepeda, J. A. Sanudo Barajas, B. Valdez Torres and T. Osuna Enciso (2009). "Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) and an edible coating on enzyme activity and postharvest quality of mango 'Ataulfo'." Revista Fitotecnia Mexicana **32**(1): 53-60.

Nakamoto, H. and L. Vigh (2007). "The small heat shock proteins and their clients." Cellular and Molecular Life Sciences **64**(3): 294-306.

Osuna-García J., M.-L. A., Álvarez-Ojeda (2007). Manual de buenas prácticas de manejo y procedimientos de operación estándar de sanitización en empaques de mango para exportación adecuado a las condiciones de nayarit. Publicación Técnica No. 1. C. C. E. S. I. INIFAP. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México.: 126.

Pandit, S. S., R. S. Kulkarni, A. P. Giri, T. G. Köllner, J. Degenhardt, J. Gershenzon and V. S. Gupta (2010). "Expression profiling of various genes during the fruit development and ripening of mango." Plant Physiology and Biochemistry **48**(6): 426-433.

Paull, R. E. and N. Jung Chen (2000). "Heat treatment and fruit ripening." Postharvest Biology and Technology **21**(1): 21-37.

Sabehat, A., S. Lurie and D. Weiss (1998). "Expression of Small Heat-Shock Proteins at Low Temperatures: A Possible Role in Protecting against Chilling Injuries." Plant Physiology **117**(2): 651-658.

Sabehat, A., D. Weiss and S. Lurie (1996). "The Correlation between Heat-Shock Protein Accumulation and Persistence and Chilling Tolerance in Tomato Fruit." Plant Physiology **110**(2): 531-537.

Sabehat, A., D. Weiss and S. Lurie (1998). "Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants." Physiologia Plantarum **103**(3): 437-441.

Scharf, K.-D., M. Siddique and E. Vierling (2001). "The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acd proteins)." Cell stress & chaperones **6**(3): 225.

Shepherd, M. L., W. S. Swecker and M. A. Ponder (2015). "Effect of Two Different Commercial DNA Extraction Kits on the Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profile of Arabian Gelding Feces." Journal of Equine Veterinary Science **35**(2): 165-169.

Song, X., G. Liu, W. Duan, T. Liu, Z. Huang, J. Ren, Y. Li and X. Hou (2014). "Genome-wide identification, classification and expression analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese cabbage." Molecular genetics and genomics **289**(4): 541-551.

Studer, S., M. Obrist, N. Lentze and F. Narberhaus (2002). "A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial α -heat shock proteins." European Journal of Biochemistry **269**(14): 3578-3586.

Sun, W., M. Van Montagu and N. Verbruggen (2002). "Small heat shock proteins and stress tolerance in plants." Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression **1577**(1): 1-9.

Tharanathan, R., H. Yashoda and T. Prabha (2006). "Mango (Mangifera indica L.), "The king of fruits"—An overview." Food Reviews International **22**(2): 95-123.

Timperio, A. M., M. G. Egidi and L. Zolla (2008). "Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP)." Journal of Proteomics **71**(4): 391-411.

Tripero, L. S. (2007). Expresión de proteínas de estrés de bajo peso molecular (sHSPs) en mesocarpio de chirimoya ("Annona cherimola" mill.), Editorial de la Universidad de Granada.

Vahala, T., T. Eriksson and P. Engström (1990). "Heat shock proteins in willow (Salix viminalis)." Physiologia Plantarum **80**(2): 301-306.

van Montfort, R. L., E. Basha, K. L. Friedrich, C. Slingsby and E. Vierling (2001). "Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein." Nat Struct Biol **8**(12): 1025-1030.

Vicente, A. R., G. A. Martínez, A. R. Chaves and P. M. Civello (2006). "Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage." *Postharvest Biology and Technology* 40(2): 116-122.

Wang, K., X. Zhang, M. Goatley and E. Ervin (2014). "Heat Shock Proteins in Relation to Heat Stress Tolerance of Creeping Bentgrass at Different N Levels." *PLoS ONE* 9(7): e102914.

Waters, E. R., B. D. Aebermann and Z. Sanders-Reed (2008). "Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns." *Cell Stress and Chaperones* 13(2): 127-142.

Waters, E. R., G. J. Lee and E. Vierling (1996). "Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants." *Journal of Experimental Botany* 47(3): 325-338.

Wilfinger, W., K. Mackey and P. Chomczynski (1997). "Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity." *BioTechniques* 22(3): 474-476, 478-481.

Yahia Kazuz, E., Ornelas Paz, J. de J., & Ariza Flores, R. 2006. *El mango. México: Trillas. Stewart Postharvest Rev*

Zhu, W., M. Lu, Z. Gong and R. Chen (2013). "Cloning and expression of a small heat shock protein gene CaHSP24 from pepper under abiotic stress." *African Journal of Biotechnology* 10(25): 4968-4976.