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

EXPRESIÓN DE micro-RNAs DE MANGO EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO CUARENTENARIO

Por:

Katya Rocío Félix Murray

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. Agosto 2020

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Katya Rocío Félix Murray, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Directora de Tesis

Dra. Mitzuko Dautt Castro
Integrante del comité de tesis

Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara
Integrante del comité de tesis

Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Expresión de micro-RNAs de Mango en Respuesta al Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario" 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 de la autora Katya Rocío Félix Murray, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado, por otorgarme el papel de becaria del consejo.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por la oportunidad que se me concedió de participar de la comunidad académica en esta institución, así como por el apoyo otorgado para la realización de una estancia de investigación.

Agradezco al CONACYT por el proyecto FC-2016-1538 "Identificación y validación de las moléculas efectoras de naturaleza proteica y nucleotídica de microorganismos benéficos y plantas para establecer una relación benéfica" (Otorgado al Dr. J. Sergio Casas Flores, siendo colaboradora la Dra. María A. Islas Osuna), que financió parte de los gastos derivados del presente proyecto de investigación.

Gracias al consorcio de la secuenciación del genoma de mango por permitirnos acceso a sus bases de datos.

Agradezco a Dr. Tomás Osuna Enciso, Dra. Adriana Sañudo Barajas, M.C. Manuel Alonso Baez Sañudo, M.C. Rosabel Velez de la Rocha, IB Rosalba Contreras Martínez, QFB Célida I. Martínez Rodríguez de CIAD Culiacán por su apoyo técnico en la cosecha, muestreo, y tratamiento hidrotérmico de los mangos.

Agradezco a los miembros del Comité de Tesis:

Dra. María A. Islas Osuna por su amistad, por su cariño y por todo el esfuerzo que pone por siempre ayudarme a ser mejor estudiante, profesionista y ser humano. Por sus consejos y la confianza que depositó en mi desde el momento en que inició este proyecto, en cada momento del proceso y hasta el final del mismo.

Dra. Mitzuko Dautt Castro, estoy segura de que, sin su conocimiento, su apoyo y sus recomendaciones prácticas este trabajo no habría sido posible de la manera en que lo desarrollamos. Por sus críticas siempre objetivas y constructivas. Por permitirme equivocarme y aprender.

Dra. Carmen A. Contreras Vergara, sus consejos y la forma en la que trata a todos los estudiantes que necesitamos ayuda hacen una gran diferencia en el proceso. Gracias por su apoyo que es invaluable en esta tesis pero, sobre todo, gracias por siempre estar disponible para escuchar.

Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate, siempre tendré presente la forma en la que trabaja como un

ejemplo para mí. Le agradezco su prontitud, sus recomendaciones y sugerencias, tan acertadas, enriquecieron este trabajo en aspectos que tal vez de otro modo, no habrían sido considerados.

Agradezco al laboratorio L-8 de Genómica Funcional y Comparativa del IPICYT, en especial al Dr. Sergio Casas Flores por abrirme las puertas y hacerme sentir en casa, al Dr. Nico por su paciencia y su ayuda; a Óscar, Carmen, Karina, Judith y Saúl, por su amistad y sus consejos para los experimentos que realicé; a la Dra. Lina por su amabilidad y disponibilidad.

Agradezco al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, y a mis compañeros Paulina, Andrés, Martín, Chema y Andrea, por su compañía en este camino.

Agradezco de igual manera al M.C. Ángel Javier Ojeda Contreras y los miembros del laboratorio del Dr. Martin Tiznado (Biología Molecular de Plantas) por amistad y apoyo durante el posgrado.

Agradezco a mis compañeros de generación por hacer de este trayecto algo más llevadero y provechoso, por los momentos de alegría que compartimos, es especial a todos los de la coordinación de vegetales, y destacando a Dafne, Francisco, Daniel V., Glenda, Azael, Brissa, y Marisol.

Agradezco a mi familia por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, y por ser la motivación y el apoyo que me alienta a continuar en mi formación académica y personal.

DEDICATORIA

A mi madre,

Teresa Elda, Renán, Paula, Bruno,

Alejandro.

Los amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE CUADROS 10
RESUMEN 11
ABSTRACT 12
1. INTRODUCCIÓN 13
2. ANTECEDENTES 16
2.1. El Estrés por Calor Afecta el Rendimiento de la Producción de Cultivos Vegetales 17
2.2. El Mantenimiento de la Calidad del Fruto en Postcosecha es Indispensable para su Exportación 17
2.2.1. Importancia del Mango en México y el Mundo 17
2.2.2. El Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario es Aplicado Como Medida Fitosanitaria 18
2.3. El Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario tiene Efectos sobre la Calidad del Fruto de Mango a Niveles Fisiológico, Bioquímico y Genético 19
2.3.1. Efectos sobre la Calidad del Mango a Nivel Fisiológico y Bioquímico 20
2.3.2. Efectos de los Tratamientos con Calor en Mango a Nivel Transcripcional 23
2.4. Los micro-RNAs: Reguladores de la Respuesta al Estrés por Calor en Plantas y Frutos 23
2.4.1 Papel de los miRNAs en el Silenciamiento de Genes 24
2.4.2. miRNAs en Plantas Modelo y Frutos De Importancia Comercial 26
2.4.3. Mejoras en los Cultivos Derivadas del Uso de los miRNAs 28
2.4.4. miRNAs Relacionados con la Respuesta al Estrés Térmico en las Plantas 30
3. HIPÓTESIS 33
4. OBJETIVOS 34
4.1. Objetivo General 34
4.2. Objetivos Específicos 34
5. MATERIALES Y MÉTODOS 35
5.1. Muestreo de Mango cv. Ataulfo en El Rosario, Sinaloa 35
5.2. Aplicación del Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario y Submuestreos 35
5.3. Extracción de RNA total 36
5.4. Construcción de Genotecas de miRNAs 36
5.4.1. Ligación de Adaptador en 3´-OH 37

CONTENIDO (continuación)

5.4.2. Ligación de Adaptador en 5´-OH 37
5.4.3. Síntesis de cDNA de los sRNAs 38
5.4.4. Amplificación por PCR del cDNA. 38
5.5. Cuantificación de los Niveles de Expresión de los miRNAs 39
5.6. Predicción de Genes Blanco de los miRNAs 40
5.7. Predicción de la Estructura Secundaria de los miRNAs Maduros 41
5.8. Cuantificación de los Niveles de Expresión de los Genes Blanco 41
5.9. Análisis de Elementos *cis* Regulatorios de los Genes Blanco Predichos 42
5.10. Diseño Experimental y Análisis de Datos 42

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 43
6.1. Predicción de transcritos blancos de los miRNAs de mango que responden al calor 43
6.2. La Estructura Secundaria de los miRNAs de Mango Evaluados Podría Explicar su Efectividad Como Reguladores Negativos de los Genes Blanco Predichos 46
6.3. La Expresión del miR160 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC, y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *ARF17* 48
6.4. La Expresión del miR169 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *NFY-3* 50
6.5. La Expresión del miR319 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC, y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *MYB33* 53
6.6. La Expresión del miR393 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *AFB2* 55
6.7. La Expresión del miR399 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *INV3* 57
6.8. Análisis de Elementos *cis*- regulatorios Reveló Presencia de Sitios para la Unión de Factores de Transcripción Relacionados con el Estrés por Calor en las Plantas 61
6.9. La Respuesta al THC de los Frutos de Mango cv. Ataulfo Regula la Expresión de Algunos miRNAs Cuyos mRNAs Blanco Contribuyen a la Mejora de la Tolerancia al Calor. 65

7. CONCLUSIONES 67

8. RECOMENDACIONES 68

9. REFERENCIAS 69

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Biogénesis y acción de los miRNAs en los organismos vegetales	25
2	Alineamiento entre los miRNAs seleccionados y los mRNA de mango predichos por psRNATarget2017	45
3	Estructura secundaria predicha para los miRNAs de mango evaluados utilizando mFOLD (http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold)	48
4	Expresión relativa de miR160(A) y de *ARF17* (B) en frutos de mango sometidos al THC	49
5	Expresión relativa del miR169 (B) y de *NFY-3* (B) en frutos de mango sometidos al THC	52
6	Expresión relativa del miR319 (A) y de *MYB33* (B) en frutos de mango sometidos al THC	54
7	Expresión relativa del miR393 (A) y de *AFB2* (B) en frutos de mango sometidos al THC	56
8	Expresión relativa del miR399 (A) y de *INV3* (B) en frutos de mango sometidos al THC	58
9	Modelo propuesto de los efectos de la estimulación de los miRNAs evaluados para los genes blanco predichos	61
10	Localización de los elementos *cis*-regulatorios identificados en los genes blanco de los miRNAs estudiados	63
11	Rutas de Señalización involucradas en el estrés abiótico en las plantas	66

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunos de los miRNAs más comunes relacionados con el estrés térmico de los organismos vegetales	31
2	Iniciadores utilizados para la construcción de genotecas de los sRNAs	37
3	Iniciadores utilizados para la Stem-Loop RT-qPCR	40
4	Iniciadores utilizados para RT-qPCR (genes blanco predichos)	41
5	Predicción *In silico* de Transcritos Blanco para los miRNAs seleccionados utilizando psRNAtarget comparado con el transcriptoma de *Mangifera indica* L. cv. Ataulfo (Dautt-Castro et al., 2018) y *Citrus sinensis* (depositado en psRNAtarget)	44
6	Representación de Vienna de la estructura secundaria de los miRNA de mango evaluados	46
7	Elementos de respuesta presentes en los genes blanco predichos para los miRNAs	62

RESUMEN

Debido a los requerimientos fitosanitarios, los frutos de mango reciben un tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) previo a su exportación, el cual induce un cambio en la expresión de genes relacionados con el estrés biótico y abiótico en las plantas. La regulación génica de esta respuesta al estrés por calor está orquestada por diferentes grupos de moléculas, entre las que se encuentran los miRNAs. El objetivo del presente trabajo es evaluar el perfil de expresión de los miRNAs, así como los transcritos de sus genes blanco, en el mesocarpio de mango cv. Ataulfo después de la aplicación del THC. La evaluación de la expresión relativa de los miR160, miR169, miR319, miR393 y miR399 se llevó a cabo a través de stem-loop RT-qPCR. Los cinco miRNA evaluados fueron inducidos después de la aplicación del THC, especialmente 1 hora después de recibir el tratamiento hidrotérmico, tiempo de mayor expresión de dichos miRNAs. Lo anterior sugiere que el estrés térmico causado por el THC induce una expresión temprana de estos miRNA, para el silenciamiento de sus genes blanco. Se realizó una predicción bioinformática de los genes blanco putativos para los miRNA utilizando psRNAtarget (2017), y se identificó a *ARF17, NFY-3, MYB33, AFB2* y *INV3*, respectivamente. Posteriormente, la expresión de estos genes blanco putativos se cuantificó a través de RT-qPCR, y se observó una expresión diferencial para ellos a lo largo del tiempo evaluado (0.5, 1, 3, 6 y 24 horas posteriores a la aplicación del THC). Para miR169/*NFY-3* y miR393/*AFB2* se encontró la inducción-represión simultánea esperada; sin embargo, en los demás casos de pares miRNA-mRNA no fue el caso. Además, a través del programa mFold se predijeron las estructuras secundarias de los miRNAs maduros, encontrando energías libres negativas para todos ellos en su conformación de horquilla, lo cual indica que su incorporación al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) pudiera verse comprometida. Además, en las regiones promotoras de los genes blancos putativos se encontraron elementos *cis*-regulatorios relacionados con respuesta a estrés, en plantas como AP2/ERF, NAC, MYB, DREB, LEP y WRKY. Tales hallazgos son útiles para explicar, a nivel molecular, los cambios fisiológicos que sufren los frutos de mango tras recibir el THC y especular sobre las funciones celulares que se podrían estar regulando por tales miRNAs.

Palabras clave: *Mangifera indica*, estrés térmico, RNAs pequeños, stem-loop RT-qPCR, RNAseq.

ABSTRACT

Due to phytosanitary requirements, mango fruits receive a quarantine hydrothermal treatment (THC) prior to export, which induces a change in the expression of genes related to biotic and abiotic stress in plants. The gene regulation of this response to heat stress is orchestrated by different groups of molecules, among which are miRNAs. The objective of this work is to evaluate the expression profile of miRNAs, as well as the transcripts of their target genes, in the mesocarp of mango cv. Ataulfo after the application of THC. The evaluation of the relative expression of miR160, miR169, miR319, miR393 and miR399 was carried out through stem-loop RT-qPCR. The five miRNAs evaluated were induced after the application of THC, especially 1 hour after receiving the hydrothermal treatment, the time of greatest expression of said miRNAs. This suggests that the heat stress caused by THC induces an early expression of these miRNAs, to the silencing of their target genes. A bioinformatic prediction of putative target genes for miRNAs was performed using psRNAtarget (2017), and *ARF17, NFY-3, MYB33, AFB2,* and *INV3* were identified, respectively. Subsequently, the expression of these putative target genes was quantified through RT-qPCR, and a differential expression was observed for them throughout the evaluated time (0.5, 1, 3, 6 and 24 hours after the application of THC). For miR169 / *NFY-3* and miR393 / *AFB2* the expected simultaneous induction-repression was found; however, in the other cases of miRNA-mRNA pairs this was not the case. Furthermore, through the mFold program, the secondary structures of mature miRNAs were predicted, finding negative free energies for all of them in their hairpin conformation, which indicates that their incorporation into the RNA-induced silencing complex (RISC) could be compromised. Furthermore, cis-regulatory elements related to stress response were found in the promoter regions of the putative target genes, in plants such as AP2 / ERF, NAC, MYB, DREB, LEP and WRKY. Such findings are useful to explain, at the molecular level, the physiological changes that mango fruits undergo after receiving THC and to speculate on the cellular functions that could be regulated by such miRNAs.

Keywords: *Mangifera indica*, thermal stress, small RNAs, RT-qPCR stem-loop, RNAseq.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés por calor es un problema actual que afecta a los cultivos y destaca ante la amenaza del aumento de las temperaturas anuales en nuestro planeta por efecto del cambio climático. Es una realidad que la temperatura global ha aumentado gradualmente cada año, y se proyecta que las temperaturas medias globales aumenten entre 1 y 5 ° C en los próximos 50 a 100 años (IPCC, 2014). Lo anterior ha traído como consecuencia una tendencia en la reducción del rendimiento de los cultivos de trigo, arroz y maíz, y se predicen reducciones en la producción agrícola de continuar los aumentos de temperatura (Ortiz *et al.,* 2008). Esto debido a que, el calor tiene efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas a diferentes niveles: fisiológico, bioquímico y molecular (Bita y Gerats, 2013). Principalmente, se induce la acumulación de proteínas de choque térmico (HSPs) que previenen la degradación de las proteínas y también causa un estado de desequilibrio metabólico y la acumulación de subproductos tóxicos, como las especies reactivas del oxígeno (EROs) (Bray *et al*., 2000; Nover *et al*., 2001). Es decir, el aumento de la temperatura afecta el desarrollo de las plantas, con consecuencias negativas en la calidad de sus frutos o granos y también afecta el rendimiento de los cultivos, por lo que se hace evidente la necesidad de estudiar estos procesos.

En este sentido, el mango es uno de los frutos con más importante derrama económica para nuestro país; sin embargo, el manejo postcosecha que recibe este fruto para su exportación afecta su calidad. El mango representa el 0.87% del PIB agrícola nacional, debido principalmente a su exportación, por lo que 1 de cada 25 mangos que se consumen en el mundo fueron producidos en México (SAGARPA, 2017). Para su exportación, este fruto requiere cumplir con protocolos de fitosanidad y control de plagas, para así garantizar la seguridad e inocuidad de los frutos, entre los cuales destaca el tratamiento hidrotérmico cuarentenario (THC) (USDA-APHIS, 2016; Ndlela *et al.*, 2017). Aunque el manejo postcosecha es reglamentario y necesario, los protocolos antes mencionados representan una fuente de estrés abiótico, que generalmente tienen consecuencias a niveles fisiológico, bioquímico y genético para los frutos.

Se ha reportado que el THC podría tener impacto sobre la expresión de genes de los frutos. En un estudio realizado por Luria *et al.* (2014), en frutos de mango cultivar Shelly, concluyeron que después de la aplicación de un tratamiento de cepillado con agua caliente (HWB, por sus siglas en

inglés), la expresión génica fue regulada de manera diferencial. Entre los transcritos de genes relacionados al estrés biótico como *Syn121* (miembro de la familia de proteínas SNARE, modulado por respuestas de estrés biótico y abiótico), éste se encontraba inducido durante las primeras horas (0-4 h) posteriores a la aplicación del HWB, y horas más tarde (17 h) se encontró reprimido. Por su parte, Dautt-Castro *et al.* (2018), reportaron factores de transcripción del tipo WRKY reprimidos en frutos de mango cultivar Ataulfo que habían recibido el THC con respecto a frutos testigo. Los factores de transcripción WRKY están relacionados con el estrés biótico y abiótico en vegetales. Por lo anterior, se concluye que los tratamientos de tipo hidrotérmico aplicados en mango son una fuente de estrés abiótico que influye en la regulación de la expresión genética de este fruto, que está siendo regulada finamente en respuesta a dicho estímulo.

Por otro lado, se ha demostrado que los miRNAs están involucrados en el control de la respuesta al estrés por calor en los vegetales. Los microRNAs son moléculas de RNA de 20-22 nucleótidos que participan activamente en la regulación de la expresión genética a través del silenciamiento (Yu *et al.*, 2017). Se han descrito familias de miRNAs que desempeñan funciones críticas en procesos de desarrollo, estrés abiótico y respuestas frente a patógenos (Xin *et al*., 2010). Por ejemplo, el miR398 en *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rappa* y *Populus tomentosa* (Guan *et al*., 2013; Kotak *et al*., 2007; Yu *et al*., 2013) se estimula frente al estrés por calor, y éste a su vez reprime la expresión de sus genes blanco. Los productos de dichos genes blancos codifican para CSD1 (Cu Zn Superóxido Dismutasa 1) CSD2 (Cu Zn Superóxido Dismutasa 2) y para CCS1 (Chaperona de Cobre para la Superóxido Dismutasa1), respectivamente, los cuales tienen función de depuradoras de EROs, disminuyendo el estado de estrés oxidativo celular. Sin embargo, hace falta aún más información al respecto, específicamente la caracterización funcional de miRNAs de plantas de importancia agrícola, así como sus genes blancos, a través de secuenciación masiva de alto rendimiento.

En mango, se cuenta con un primer estudio de caracterización de miRNAs, donde se realizó un análisis *in silico*, mostrando que el miRNA160 y el miRNA393 probablemente participen en el proceso de desarrollo y maduración del fruto (Israr *et al*., 2018). Es posible que la expresión de miRNAs asociados a las respuestas de las plantas al calor, presenten cambios en su expresión cuando los frutos de mango se someten al THC. En relación a lo anteriormente expuesto, sería relevante continuar con la identificación global de los miRNAs en mango y determinar su expresión a nivel experimental, así como la evaluación del efecto que tienen sobre sus genes blanco. La

información derivada de estos estudios podría utilizarse como herramienta para explicar la respuesta de termotolerancia de los frutos de mango. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es identificar y evaluar el perfil de expresión de miRNAs y sus probables genes blanco asociados al estrés por calor, posterior a la aplicación del THC en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo.

2. ANTECEDENTES

2.1 El Estrés por Calor Afecta el Rendimiento de la Producción de Cultivos Vegetales

El calor es un importante tipo de estrés abiótico que disminuye la productividad de los cultivos y que debilita la seguridad alimentaria mundial, especialmente dados los impactos del cambio climático. El informe del Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) incluyó pruebas inequívocas de que las temperaturas del aire y del océano han aumentado, al igual que las concentraciones de gases de efecto invernadero (IPCC, 2014). Ambos factores influyen directamente en el crecimiento de las plantas y en los rendimientos de los cultivos (Bita y Gerats, 2013). En cuanto a los cereales para la alimentación humana de mayor importancia a nivel mundial, se ha observado una reducción en el rendimiento de hasta un 40% para el maíz, y del 21% para el trigo (Daryanto *et al*., 2016). Por ello, conocer las respuestas que las plantas tienen frente al estrés abiótico a diferentes niveles ayudará a la generación de cultivares termotolerantes.

A nivel fisiológico, estudios en plantas sometidas a estrés por calor han demostrado que, en general, un aumento moderado de la temperatura del aire conduce a un desarrollo más rápido de la planta y, en consecuencia, a una reducción en la percepción de la luz acumulada y de su asimilación durante el ciclo de vida de la planta (Bita y Gerats 2013). El calor puede conducir también a la alteración de otros procesos fundamentales como la asimilación de carbono, la respiración y la transpiración y la reproducción sexual, que pueden reducir la eficiencia metabólica general y dar lugar a defectos en el desarrollo vegetativo, al rendimiento de la fruta y la semilla (Maestri *et al*., 2002; Zinn *et al*., 2010). Este conjunto de cambios fisiológicos, tiene su origen en una cascada de reacciones bioquímicas, dirigidas a su vez por la expresión regulada de múltiples genes en respuesta al aumento de la temperatura del ambiente.

A nivel molecular, el mecanismo más estudiado en respuesta al estrés por calor es la inducción de proteínas de choque térmico (HSPs) tras la exposición a altas temperaturas. La expresión de las HSPs y otros genes sensibles al calor se controla principalmente a través de factores de transcripción de choque térmico (HSF) (Kotak *et al*., 2007). Los experimentos realizados en *Arabidopsis thaliana*, arroz, tabaco y tomate, han demostrado que se puede aumentar la

termotolerancia en los organismos mediante la sobreexpresión de HSPs o HSF (Grover *et al*., 2013). Aunque los estudios se realizaron en varias especies vegetales, que fueron expuestas a diferentes condiciones de estrés térmico, los genes que se estimularon en respuesta al estrés térmico fueron los mismos, por lo que es posible que las respuestas moleculares de las plantas frente al calor, están conservadas a través de la evolución.

Los avances en investigación, derivados de áreas como la biotecnología y la genómica, pueden ayudar al diseño de herramientas para contrarrestar los efectos perjudiciales del calor. En este sentido, se han reportado estrategias que sugieren el desarrollo de cultivares modificados para una mayor productividad o mediante el uso de prácticas de manejo agronómico para aumentar el rendimiento de los cultivos (Lamaoui *et al*., 2018). Sin embargo, para satisfacer la demanda de alimentos de la población estimada de 9 mil millones de personas para 2050, se considera necesario un aumento del 70% en la producción de alimentos según la Declaración de la Cumbre Mundial sobre la Seguridad Alimentaria (FAO 2009). Esto significa que los aumentos anuales en la producción para los próximos 40 años deben ser un 38% más altos que los alcanzados históricamente (Tester y Langridge 2010). Por lo tanto, los cambios de temperatura asociados con el calentamiento global se han convertido en un desafío importante con respecto a la producción agrícola.

2.2 El Mantenimiento de la Calidad del Fruto en Postcosecha es Indispensable para su Exportación

2.2.1. Importancia del Mango en México y el Mundo

El fruto de mango, es uno de los productos de origen vegetal más comercializados en todo el mundo, tanto por su delicioso sabor como por sus excelentes propiedades nutricionales. El mango (*Mangifera indica* L.) pertenece a la familia de plantas anacardiáceas, que incluye numerosos árboles frutales tropicales; es una especie originaria del sur de Asia, y se ha distribuido a otras regiones tropicales y subtropicales (Jahurul *et al*., 2015). El rango óptimo de temperatura de

crecimiento del mango es de 24–27 °C, por su parte, las temperaturas por encima de 42 °C inhiben su crecimiento en la etapa reproductiva y pueden dañar las plantas muy jóvenes (Tiyayon y Paull, 2017). Actualmente, el mango se cultiva en un área de aproximadamente 5.6 millones de hectáreas en todo el mundo (FAOSTAT, 2017). Desde el punto de vista alimentario, el mango es una fuente importante de micronutrientes, vitaminas y otros fitoquímicos; proporciona energía, fibra dietética, carbohidratos, proteínas, grasas y compuestos fenólicos que son necesarios para la salud de los seres humanos (Vithana *et al*., 2018). Por todas estas razones, es de gran interés garantizar la presencia del mango en la canasta alimenticia de la población mundial, por sus beneficios económicos y sus propiedades nutricionales.

El mango se cultiva en regiones tropicales y subtropicales, pero es consumido en países de todo el mundo. De 2014 a 2018, India fue el mayor país productor de mango, representando el 40.4 % de los mangos producidos, seguido de China, Tailandia, Indonesia y México (3.9%) (FAOSTAT, 2018). Otros principales países productores de mango son Pakistán, Brasil, Filipinas, Nigeria y Egipto (FAOSTAT, 2018). A pesar de que México no es el principal productor mundial, si ha sido el mayor exportador de mango en el mundo de 2014 a 2018, con un 17.7 % seguido de India con un 12.8 %. Cabe destacar que solo EEUU importó aproximadamente el 22.8 % de los mangos del mundo durante ese período, siendo el principal importador de mangos (FAOSTAT, 2018). De esta manera, países con climas tropicales, como México, cultivan el mango en gran cantidad para su exportación, siempre y cuando cumpla con requisitos de fitosanidad impuestos por los países importadores.

2.2.2. El Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario es Aplicado Como Medida Fitosanitaria

En un mercado mundial tan competido, para lograr la exportación del mango es necesario que los frutos producidos gocen de ciertos atributos de calidad. Un fruto de mango que se considera de alta calidad, debe ser inocuo y estar libre de daños externos (Luria *et al*., 2014). El mantenimiento de la calidad en los frutos de mango se refiere a la prevención de daños derivados de su manejo durante su almacenamiento, que se limita a 3 o 4 semanas a 10 - 15 ° C (Brecht *et al*., 2010). Los daños en el fruto son ocasionados principalmente por: daño mecánico durante la cosecha, manejo

inadecuado en el campo, quemaduras por savia, decoloración de lenticelas, ablandamiento de la fruta, lesión por enfriamiento y / o desarrollo de enfermedades y daños por plagas, como la mosca de la fruta (Prusky *et al*., 2002; Yahia, 2006). Sin embargo, las prácticas de producción y postcosecha, así como las nuevas tecnologías y la gestión de empacadoras, contribuyen en gran medida a la conservación de la calidad externa de la fruta en toda la cadena de suministro mundial. Se han desarrollado protocolos de tratamiento para garantizar la seguridad e inocuidad de los frutos. Lo anterior, con el objetivo de eliminar infestaciones por especies de la familia *Tephritidae*, del orden Diptera, entre las que se encuentran larvas de *Anastrepha ludens* (Loew), *A. suspensa* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) y *A. serpentina* (Wiedemann) que infestan frutos tropicales y subtropicales en México y otros países, a las cuales se les conoce colectivamente como moscas de la fruta (Yahia et al., 2011). En México, el THC autorizado contra *A. ludens* y *A. obliqua* consiste en sumergir los frutos de mango en agua caliente a 46.1 °C durante 60–120 minutos, el tiempo efectivo de inmersión varía según la forma y el peso de la fruta (USDA-APHIS, 2016). Estas condiciones son recomendadas para garantizar la calidad del producto para la exportación, especialmente hacia los Estados Unidos.

2.3. El Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario tiene Efectos sobre la Calidad del Fruto de Mango a Niveles Fisiológico, Bioquímico y Genético

Aunque existen diversos tratamientos fitosanitarios, el THC es en gran medida el más utilizado, a pesar del estrés térmico que genera en los frutos y de su impacto en la calidad del mango. Algunos miembros de la industria del mango han expresado inquietudes acerca de que el tratamiento hidrotérmico es uno de los factores por el cual la calidad del mango a menudo es deficiente (Yahia y Campos, 2000). En un esfuerzo por abordar estas inquietudes, la National Mango Board (NMB) en Estados Unidos financió un proyecto de investigación para determinar alternativas viables al tratamiento hidrotérmico para el mango (NMB, 2008). Los tratamientos por aire caliente forzado, aire caliente forzado con ambiente controlado, e irradiación son los que presentan el mayor potencial para el mejoramiento de la calidad del mango (Mitcham y Yahia, 2009). Aunque estos métodos podrían implantarse en un período relativamente corto, de igual manera resulta costoso

adquirir los equipos y adaptar las instalaciones para la realización de tales nuevos procedimientos.

2.3.1. Efectos sobre la Calidad del Mango a Nivel Fisiológico y Bioquímico

El THC induce respuestas fisiológicas y bioquímicas en el fruto, las cuales se traducen en cambios en los parámetros de calidad del mango. El daño por calor provocado por el THC se observa en el fruto como escaldado de la piel, oscurecimiento de lenticela, moteado y maduración no uniforme. Esos efectos generalmente se han asociado a cambios en la temperatura y el tiempo recomendados para la aplicación del THC. Durante la maduración de un fruto, a nivel bioquímico se presenta un aumento en la tasa de respiración (CO_2) acompañado de un incremento en la producción de la hormona de la maduración etileno, lo cual permite clasificar a los frutos como climatéricos. En frutos de mango, los cuales pertenecen al grupo de frutos climatéricos, se ha observado que el THC incrementa la producción de CO_2, el cual se correlacionó con otros cambios bioquímicos y fisiológicos como un incremento en la actividad de enzimas asociadas a la degradación de la pared celular, pérdida de la firmeza y un aumento de sólidos solubles totales (Dautt-Castro *et al*., 2018). Estos cambios inducidos por el THC tienen un impacto sobre la calidad de los frutos. En este sentido, también se ha reportado que puede aumentar la pérdida de peso (Petit *et al*., 2009). En conjunto, los eventos bioquímicos que involucran el aumento de la tasa respiratoria provocan alteraciones en los parámetros de calidad de los frutos.

El THC no siempre genera deterioro en la calidad de los frutos de mango, y algunos autores recomiendan modificaciones en las condiciones de aplicación del tratamiento para disminuir sus efectos negativos. Existen estudios que muestran que los parámetros de calidad no se ven afectados por el THC en algunas variedades de mango (cvs. Tommy Atkins y Kent), en cambio, este tratamiento ayuda a reducir la presencia de antracnosis y pudrición del tallo (Baez *et al*., 2001; Luna *et al*., 2006). Por su parte, en un estudio financiado por la NMB, Osuna *et al.* (2015) demostraron que, si se aplica THC de acuerdo con el protocolo de la USDA, no se debe observar ninguna lesión en frutos cv. Tommy Atkins. Por lo que, un estudio más profundo y sin conflicto de interés, como es el caso de las investigaciones realizadas por la NMB, sobre la respuesta al estrés que induce el THC en los frutos de mango, sería de gran utilidad para aclarar cuáles son sus

efectos sobre los parámetros de calidad.

Los cambios en los parámetros de calidad frutos de mango cv. Ataulfo que reciben el THC podrían monitorizarse de forma temprana a través del análisis de marcadores físicos, bioquímicos y moleculares. El THC en frutos de mango cv. Ataulfo condujo a un color de la cáscara y de la pulpa más homogéneo. Se encontró una correlación entre este fenotipo y la inducción de transcritos de la enzima fitoeno sintasa (PSY), clave en la regulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides en las plantas) acumulados en la pulpa de mango al inicio de la maduración de los frutos (Daut-Castro *et al*., 2018). Por otra parte, en ese mismo estudio se observó que los frutos sometidos al THC produjeron mayor cantidad de CO_2 en comparación con el control, especialmente durante los primeros dos días después del THC. Asimismo, durante los primeros 4 días posteriores a la aplicación del THC, los frutos sufrieron pérdida en la firmeza prematura, en comparación con el control que presentó dicho ablandamiento a partir del día 4 (Dautt-Castro *et al*., 2018). Una evidencia más que respalda dicho estudio, fue la rápida acumulación de sólidos solubles totales (SST) en los frutos que recibieron el THC, desde el primer día posterior al tratamiento y que podría estar relacionada con la aceleración del metabolismo. Por ejemplo, un transcrito del metabolismo de la sacarosa, la sacarosa sintasa (SS) se estimuló un día después del THC (Dautt-Castro *et al*., 2018). Es por ello que comprender con profundidad los cambios moleculares que dictan mejoras o disminuciones de la calidad de los frutos, es importante para el desarrollo de tecnologías que permitan asegurar que los tratamientos postcosecha aplicados no afecten las propiedades organolépticas y nutricionales del mango.

2.3.2. Efectos de los Tratamientos con Calor en Mango a Nivel Transcripcional

Los tratamientos postcosecha aplicados a los frutos pueden ser una fuente de estrés abiótico, por ejemplo, el THC produce estrés por calor en el mango lo cual modifica su transcriptoma. Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* indican que aproximadamente el 5% del transcriptoma se estimula en respuesta al estrés por calor aplicado (Larkindale y Vierling, 2008; Saidi *et al*., 2011). Algunos autores destacan que, contrario a lo que puede pensarse, las chaperonas y HSPs son sólo una parte menor de la respuesta general frente a dicho estrés (Saidi *et al*., 2011). En un estudio

realizado por Luria *et al.* (2014), concluyeron que la aplicación de un tratamiento postcosecha de HWB afectó la expresión génica en frutos de mango cultivar Shelly. De manera similar, Dautt-Castro *et al.* (2018), reportaron cambios en la expresión de 903 genes por la aplicación del THC en mango cv. Ataulfo. Estos estudios demostraron que los tratamientos postcosecha que implican el calentamiento de los frutos son una fuente de estrés abiótico que provoca alteraciones en la expresión genética del mango.

En el estudio realizado para el cv. Shelly (Luria *et al*., 2014), se encontraron genes diferencialmente expresados en frutos que recibieron el HWB. En dicho estudio, se observó la regulación positiva de la expresión de genes relacionados con respuesta a estrés biótico, específicamente en la defensa contra patógenos. También se observaron disminuciones en la expresión de genes del catabolismo de la clorofila y la fotosíntesis, así como algunos relacionados al metabolismo de la glucosa y los flavonoides, los cuales podrían estar relacionados con los cambios de color observados a menudo en los frutos que reciben el THC. Además, los cambios regulados por el HWB no solo están involucrados con la respuesta al estrés, también se produce una regulación de las rutas bioquímicas constitutivas, cambios que podrían estar involucrados en las alteraciones de los parámetros de calidad.

En cuanto a lo reportado para el cv. Ataulfo (Dautt-Castro *et al*., 2018), se destaca que entre los transcritos regulados en frutos sometidos al THC se encuentran los factores de transcripción, involucrados en las respuestas al estrés de las plantas, como los WRKY. Al menos 5 transcritos *WRKY* fueron reprimidos en respuesta al THC en los frutos de mango. En *Arabidopsis thaliana*, los factores de transcripción WRKY desempeñan un papel en la termotolerancia (Li *et al*., 2011). Por lo tanto, es posible que estos factores de transcripción estén estrechamente relacionados con la tolerancia al estrés térmico en los frutos de mango. Para el caso de HSFs de respuesta tardía, se reportó una represión de 4.1 órdenes de magnitud, comparado con frutos que no recibieron el THC , lo cual puede explicarse ya que se ha demostrado que estos factores pueden actuar en etapas posteriores de la respuesta al estrés térmico (Dautt-Castro *et al*., 2018; Schramm *et al*., 2008). El cambio global del transcriptoma de mango, derivado de la aplicación de un tratamiento postcosecha con calor, probablemente sea resultado de varios mecanismos de respuesta al estrés que actúan coordinadamente para prevenir el desarrollo de patógenos como los hongos y el daño celular.

Por otra parte, se ha observado que la expresión de genes asociados a la regulación transcripcional y postranscripcional también se puede ver afectada por efecto del THC. En este sentido, López-

Virgen (2019) reportó que algunos genes de la maquinaria de biogénesis de los miRNAs (*MiDCL1, MiHEN1, MiHST1, MiAGO1b y MiHSP90*) se inducen, particularmente entre las horas 3 y 6 después de la aplicación del THC. En otras plantas, como *Arabidopsis thaliana*, y tomate, después de la exposición al estrés térmico, los miRNAs pueden tener un cambio de expresión temprano, como parte de una respuesta molecular que pueda inducir cambios que promuevan la tolerancia o la resistencia a dicho incremento de temperatura, para proteger los diferentes tejidos del vegetal (que incluyen al fruto) (López-Virgen, 2019; Lin *et al*., 2018; Shi *et al*., 2019). Estas evidencias señalan que, efectivamente, después de que los frutos de mango se exponen al THC existe una regulación a nivel transcripcional (a nivel de RNA mensajero) que dirige una respuesta molecular, probablemente para la protección y tolerancia de los frutos de mango al calor aplicado.

2.4. Los micro-RNAs: Reguladores de la Respuesta al Estrés por Calor en Plantas y Frutos

2.4.1 Papel de los miRNAs en el Silenciamiento de Genes

La función de los microRNAs (miRNAs) es mediar el silenciamiento de genes específicos, contribuyendo a la regulación fina de la expresión de genes. Los miRNAs comprenden una clase de RNA no codificante de cadena sencilla de 20 a 22 nucleótidos de longitud, siendo las moléculas más pequeñas conocidas de información reguladora codificada por genes, tanto en plantas como en animales (Zhao *et al*., 2016). En el citoplasma, los miRNAs maduros se cargan en un complejo proteico de silenciamiento en el cual ejercen su función reguladora. Además, los miRNAs son moléculas sensibles a los cambios y su expresión puede variar, por ejemplo, de acuerdo a los eventos fisiológicos del organismo y/o a factores externos. Se ha visto que diferentes miRNAs se expresan diferencialmente durante las diferentes etapas del desarrollo o en respuesta a cambios ambientales (Zhao *et al*., 2016). Así estas pequeñas moléculas funcionan en complejas redes que coordinan el transcriptoma de una célula con la condición específica en la que se encuentra, temporal y espacialmente.

En plantas, los esfuerzos de investigación han establecido el marco molecular principal de la

biogénesis y los modelos de acción de los miRNAs. Los miRNAs de las plantas regulan a sus genes blanco a nivel postranscripcional a través de dos mecanismos principales: la degradación del transcrito y la represión de la traducción (Borges y Martienssen, 2015). La complementariedad entre los miRNAs y sus mRNA objetivo debe ser casi perfecta, debido a esto, se piensa que la degradación del transcrito es el modo de acción predominante de los miRNAs de plantas (Yu *et al*., 2017). Actualmente se continúan investigando, tanto la biogénesis como el mecanismo de acción de los miRNAs, sin embargo, la información disponible se resume en los siguientes dos párrafos.

Cada miRNA se codifica en un *MIRGEN* (región del ADN que se transcribe por la RNA Polimerasa II ó III), y sus transcritos primarios (pri-miRNA) se procesan mediante la adición del capuchón de 7-metil guanosina en el extremo 5', mientras que el extremo 3´ es poliadenilado con estructura de horquilla o tallo asa Los miRNAs de plantas son generados en el núcleo por la endoribonucleasa tipo Dicer (DCL), respaldada por la SE (SERRATE) , que procesa a los pri-miRNAs con una estructura de horquilla para dar lugar al pre-miRNA (miRNA precursor de doble cadena) y posteriormente hacer un segundo corte que genera el miRNA maduro (Yu *et al*., 2017). SE es una proteína de unión a dsRNA que interactúa con DCL y otros factores moleculares, que generan los miRNAs precursores (pre-miRNAs) en los cuerpos de Cajal. Además, en las plantas existe una proteína de unión a dsRNA, HYL1 (del inglés Hyponastic Leaves1), que es específica de la vía de miRNA en plantas cuya función es metilar el extremo 3' del miRNA en doble cadena (Yu *et al*., 2017) Los miRNAs son transportados al citoplasma por HASTY (HST). Un miRNA maduro de cadena sencilla se integra en el complejo silenciador inducido por RNA (RISC), donde se incluyen HEN SUPPRESSOR 1 (HESO1), UTP: RNA uridyltransferase 1 (URT1), Heat Shock Protein 90 (HSP90), Argonaute protein (AGO) y otros factores moleculares; mientras que la cadena complementaria al miRNA maduro se degrada e integra en el RISC (1) (Figura 1). Posteriormente el miRNA se une a su blanco en función de la homología de secuencia (2) y se lleva a cabo el silenciamiento génico (3). Una vez maduros, los miRNAs se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISCs, por sus siglas en inglés) a través de las proteínas Argonauta (AGO) para inducir el silenciamiento génico de los mRNAs blanco por complementariedad. Lo anterior puede conllevar a varios mecanismos de silenciamiento como: 1) la escisión del mensajero; 2) la inhibición de la traducción; 3) la metilación del ADN y la modificación de las histonas para el rearreglo de la cromatina (Sheu-Gruttadauria y MacRae, 2017).

Los mecanismos anteriores dependen de la acción integrada del RISC pero son las AGO las proteínas efectoras, que llevan a cabo el silenciamiento por escición, que es el más frecuente en las plantas (Figura 1).

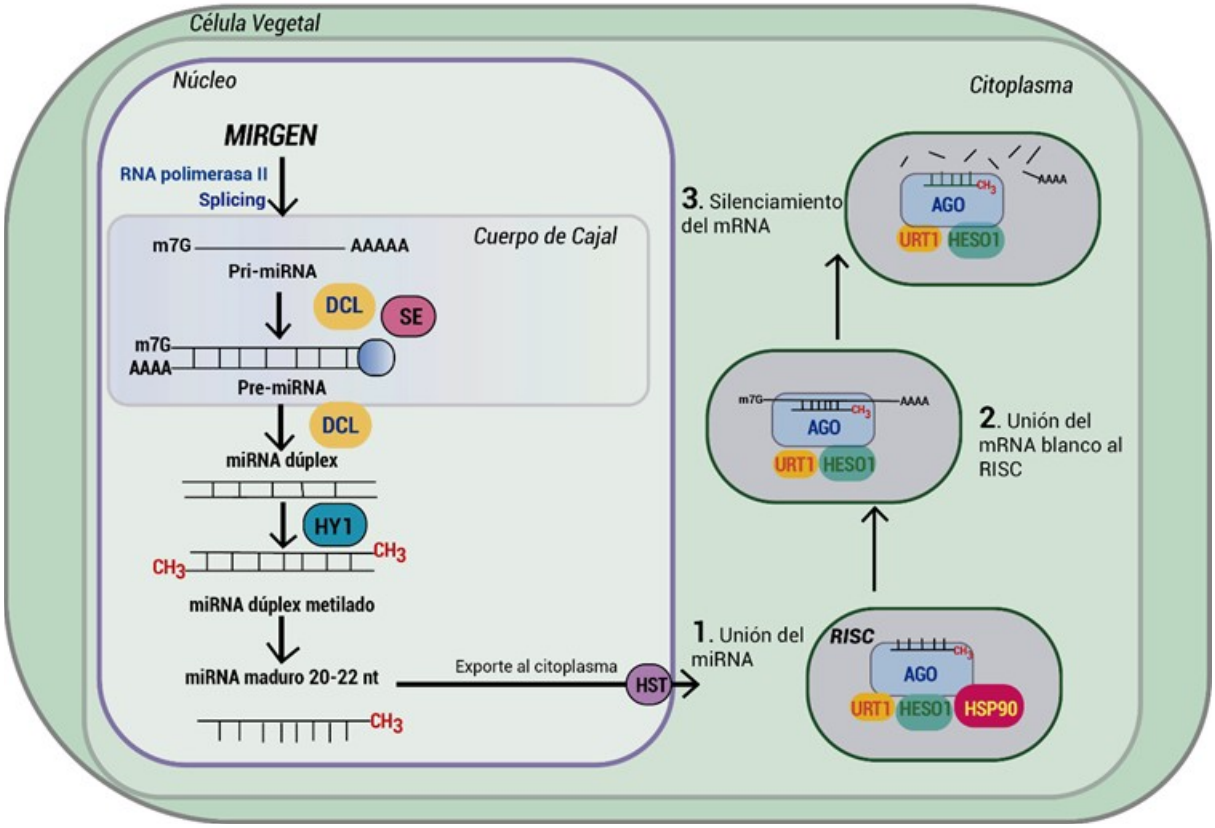

Figura 1. Biogénesis y acción de los miRNAs en los organismos vegetales (Félix-Murray et. al, 2020 *en revisión*).

Las proteínas AGO presentan tres dominios característicos, PAZ, Mid y PIWI (Sheu-Gruttadauria y MacRae, 2017). El dominio PAZ es un dominio de unión a sRNA, mientras que en el PIWI hay residuos catalíticos que le confieren actividad endonucleolítica, y el dominio Mid les permite reconocer el extremo 5´ de los miRNAs. El RNA guía entra en contacto con todos los dominios de la proteína, donde la mayoría de las interacciones se dan a través del esqueleto de azúcares y fosfatos del ácido nucleico. La secuencia semilla del miRNA (que comprende los nucléotidos del 2 al 8 queda dispuesta de tal forma que el extremo 3´ se orienta hacia el dominio PAZ y el 5´ hacia el dominio Mid. Un apareamiento perfecto de los nucleótidos del 9 al 11 es necesario para el

silenciamiento post escisión del mensajero provocado por el dominio PIWI de una AGO (Sheu-Gruttadauria y MacRae, 2017).

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha mejorado mucho la investigación sobre los microRNAs, convirtiendo a la regulación génica dirigida por microRNAs en un área activa de estudio. Los miRNAs han atraído la atención de los biotecnólogos de plantas, como un nuevo instrumento que podría ser potencialmente útil para manipular rutas biosintéticas completas (Bulgakov y Avramenko, 2015). Además, se ha visto que es posible utilizar este conocimiento para optimizar la productividad de las plantas. Trumbo *et al.* (2015), por ejemplo, describe el uso de microRNAs para mejorar la biomasa y la producción de biocombustibles. Inicialmente, la investigación de estas moléculas se realizó en plantas modelo, pero en la actualidad, en un número cada vez mayor de publicaciones han abordado especies de importancia económica.

2.4.2. miRNAs en Plantas Modelo y Frutos de Importancia Comercial

El número de artículos publicados en torno a la caracterización e identificación de miRNAs en frutos y vegetales de interés comercial va en aumento cada año y se condensan en los últimos cinco años. De especial interés son aquellos trabajos que se han centrado en el estudio de miRNAs involucrados en la respuesta al estrés o en la búsqueda de soluciones a problemas particulares en el cultivo, cosecha y postcosecha de cada especie vegetal. Ejemplos de lo anterior son estudios realizados en apio, mandarina, pera y manzana, (Jiang *et al*., 2014; Liang *et al.*, 2018; An *et al*., 2018; Mohanpuria *et al.*, 2018). Hoy día, el motor de estudio de los miRNAs es el interés comercial, y aunque aún es en general descriptivo, se encuentra en la transición de ser aplicado en la resolución problemas en estos cultivos.

En un estudio realizado en plantas de tomate cv. Micro-Tom reportaron la represión de la expresión de algunos miRNAs involucrados en la respuesta al estrés térmico. En dicho estudio, se secuenciaron los miRNAs obtenidos a partir de muestras de estambres y pistilos de plantas de tomate, después de 2 días posteriores a la exposición al estrés por calor (35 ± 1°C/30 ± 1°C (16 h luz/ 8 h obscuridad). Los resultados mostraron un total de 110 miRNAs conocidos, en general, se

observó la represión de los miRNAs en respuesta al estrés por calor, incluyendo los miR398a-5p, miR398b-3p, pmiR160a-3 y miR156e-3p (Pan *et al.*, 2017). En concreto, ningún miRNA fue estimulado bajo el estrés por calor en las genotecas de estambres o pistilos (Pan *et al*., 2017). Los patrones de expresión de cuatro genes blanco (*SPL15* para miR156, *ARF10* y *ARF16* para miR160, y *CSD1* para miR398) se estimularon por el estrés térmico, mostrando una correlación negativa con los patrones de expresión de sus correspondientes miRNAs, excepto por *CSD1* en los pistilos (Pan *et al*., 2017). Lo anterior sugiere que los patrones de expresión de los miRNAs y sus genes blanco pueden variar considerablemente entre tejidos y tiempo de exposición al estrés por calor.

Por otro lado, en plátano, mediante el perfil de miRNAs y de sus genes blanco expresados diferencialmente bajo estrés por frío y calor, se encontró que algunos de ellos tienen patrones de expresión opuestos entre ambos tipos de estrés (Zhu *et al*., 2019). Por ejemplo, para miR396, los genes blanco *SPL* que codifican para factores de transcripción que regulan el cambio de la fase vegetativa a reproductiva en las plantas, fueron estimulados por el frío, pero reprimidos por el calor. Dicho estudio proporcionó una base para comprender la respuesta dependiente de miRNAs al estrés por temperatura en fruto.

Con respecto al estudio de los miRNAs de mango, existe un informe sobre la transición de fase vegetativa a fase adulta en árboles de mango cv. Kensington Pride en el que se perfilaron los patrones de expresión de los miRNAs involucrados. En las plantas, la transición de la fase juvenil a la fase adulta está regulada por la actividad secuencial de dos miRNAs: miR156 y miR172 (Ahsan *et al*., 2019). Una disminución en la concentración citoplasmática de miR156 con un incremento en la abundancia del miR172 está asociado con la transición de fase. Existe poca información acerca de la transición de fase en los cultivos de árboles tropicales económicamente importantes, especialmente en aquellos que tienen largas fases vegetativas, como el mango. Ahsan *et al.* (2019) observaron que, en los árboles de mango, aguacate y macadamia, la expresión del miR156 disminuye a medida que los árboles, envejecen. Por otra parte, encontraron que la abundancia del miR172 y su blanco (genes *AP2*-Like), solo estaban relacionados con la edad de los árboles en el aguacate, no así en mango ni en macadamia. Proponen por ello, que la cuantificación de los miR156 y miR172 podría ser utilizada como marcador de edad en estas especies.

Las aproximaciones basadas en Secuenciación de Nueva Generación (NGS) han tenido un impacto clave en la identificación de miRNAs de especies vegetales no modelo (Sabzehzari y Naghavi, 2019). Actualmente el uso de la NGS, específicamente RNA-seq, ha permitido secuenciar y

cuantificar transcriptomas en un máximo de resolución e intervalo dinámico nunca antes alcanzado por otras tecnologías, independientemente del tamaño y del conocimiento previo del genoma del que se deriva el transcriptoma analizado (Sabzehzari y Naghavi, 2019). Ante tales beneficios, el RNA-seq puede ser y está siendo utilizado, para identificar miRNAs y sus genes blancos en cualquier especie de interés. Por ejemplo, en plátano mediante RNA-seq de sRNAs, se identificaron 42 miRNAs y sus genes blanco expresados diferencialmente bajo estrés por frío y calor (Zhu *et al.,* 2019). El RNA-seq está convirtiéndose en la herramienta clave para enriquecer nuestro entendimiento sobre los miRNAs y sus blancos, a la orden de la biotecnología vegetal.

A la fecha, solo existe un estudio en relación a los miRNAs en frutos de mango y representa solo un abordaje exploratorio *in silico*, sin validación experimental por RT-qPCR, en el que los resultados no son fácilmente comparables con lo reportado en plantas modelo (Israr *et al.,* 2018). En dicho estudio se sugiere que el miR160 probablemente participe solo en el proceso de desarrollo y maduración del mango. Sin embargo, se ha visto que en la planta modelo *Arabidopsis,* el miR160 también participa en la regulación de otros procesos, como la termotolerancia (Lin *et al*., 2018). Hasta ahora no se han depositado secuencias de miRNA de ningún tejido de mango en la base de datos miRBase. Además, el papel de los miRNAs en la respuesta al estrés por temperatura en la pulpa de mango sigue siendo en gran parte desconocido. Por lo que, resulta evidente que la identificación global de los miRNAs en mango, el estudio de su expresión a nivel experimental y del efecto que los miRNA tienen sobre sus genes blanco enriquecería el entendimiento de estos procesos en el mango.

2.4.3. Mejoras en los Cultivos Derivadas del Uso de los miRNAs

Los miRNAs modulan la abundancia y la acumulación espacio-temporal de sus transcritos blancos, e indirectamente múltiples procesos fisiológicos, por lo que constituyen una gran posibilidad para la modificación de parámetros de interés nutricional y comercial en los cultivos vegetales, desde el punto de vista biotecnológico. Las plantas se enfrentan constantemente a numerosas condiciones adversas que pueden afectar su fisiología y desencadenar diversas condiciones de estrés. Las respuestas de las plantas al estrés implican la regulación de genes que interfieren con varios rasgos

agronómicos, como el crecimiento, resistencia a estrés y la productividad de las plantas (Zhang, 2015). Comprender estos mecanismos es importante para el desarrollo de herramientas biotecnológicas dirigidas a mejorar los rasgos agronómicos deseables (Zhang, 2015). Controlar la forma en la que las plantas responden a las condiciones ambientales a través de la regulación de la transcripción de los miRNAs es una atractiva posibilidad para mejorar la tolerancia de los cultivos a las condiciones extremas de temperatura, salinidad, o estrés hídrico.

De acuerdo con lo anterior, la regulación fina de los *MIRGEN* o de la expresión de los miRNAs es una poderosa estrategia biotecnológica para mejorar la tolerancia al estrés abiótico en cultivos económicamente importantes. En este contexto, se ha demostrado que la sobreexpresión, tejido-específica, o inducida por estrés o senescencia, de *MIRGEN* específicos mejora los rasgos agronómicos deseados en diferentes especies de plantas (Zhang, 2015). Las aproximaciones actuales al uso de miRNAs en el mejoramiento de la tolerancia de las plantas al estrés está basada en la estimulación y represión de la transcripción de los genes MIR para manipular la concentración citoplasmática de los miRNAs de interés (Basso *et al*., 2019). Otras técnicas que se han explorado exitosamente para el mejoramiento de plantas modelo a través de la regulación de miRNAs son: transgénesis, cisgénesis, intragénesis, *MIRGEN* artificiales, mimetismo con el blanco (endógeno y artificial), edición de *MIRGEN* utilizando meganucleasas, la herramienta CRISPR/Cas9 y sus variantes, así como la entrega tópica de miRNAs (Basso *et al*., 2019). Las vías de regulación asociadas a la respuesta al estrés abiótico en las que participan miRNAs como moléculas regulatorias se conocen parcialmente, y comprender tales mecanismos se complica aún más por el hecho de que un miRNA puede regular varios genes y que algunos genes pueden estar regulados por múltiples miRNAs.

Uno de los objetivos más importantes para la aplicación de las tecnologías de miRNAs es el mejoramiento de la termotolerancia de los cultivos, y por ello se han realizado investigaciones para dilucidar los mecanismos que la promueven. Guan *et al.* (2013) descubrieron un nuevo mecanismo de termotolerancia vegetal, especialmente para la protección de órganos reproductivos. Este mecanismo implica la inducción de miR398, que reprime a sus genes blancos *CSD1* y *CSD2* (superóxido dismutasa de Cu Zn), así como *CCS* (un gen que codifica para una chaperona para CSD1 y CSD2) (Guan *et al.,* 2013). Se encontró que plantas mutantes en dichos genes mostraron una mayor tolerancia al estrés por calor que las plantas silvestres, asociada con el aumento de la acumulación de factores de transcripción de respuesta al estrés y HSPs (Guan *et al*., 2013). Estos

resultados indican que la manipulación del miR398 puede ser una estrategia aplicable para aumentar la tolerancia al calor en las especies vegetales como el mango, cuyos frutos pueden sufrir daños derivados de la aplicación de tratamientos postcosecha con calor como el THC.

El deterioro postcosecha de las frutas puede tener un impacto negativo en su comercialización, lo cual repercute en pérdidas económicas. Por lo que el aumento en la vida útil de las frutas por maduración tardía, es otro rasgo agronómico esencial que se está abordando a través de la tecnología de miRNAs. Un ejemplo de estos acercamientos son los estudios realizados en tomate, un fruto climatérico como el mango. El miR156 se dirige al gen *CNR* (Colorless non-ripening), importante en la maduración de este fruto (Molesini *et al*., 2012). Las plantas de tomate transgénicas que sobreexpresaban a miR156 mostraron un color ligeramente más claro, frutos más pequeños, mayor número de hojas, altura reducida y disminución del tamaño de la hoja (Zhang *et al.*, 2011). Lo anterior sugiere que reduciendo la expresión de miR156 sería posible obtener un mayor rendimiento en el cultivo de tomate y en otros frutos climatéricos, como el mango. Acorde con esto, plantas transgénicas de alfalfa que sobreexpresaban el miR156 mostraron una mayor tolerancia al estrés térmico (40 °C) (Aung *et al.*, 2015). Por lo anterior, la importancia del estudio de los microRNAs radica en la posibilidad de generar cultivos termotolerantes.

2.4.4. miRNAs Relacionados con la Respuesta al Estrés Térmico en las Plantas

En cuanto al estrés por calor, actualmente se conoce con suficiente profundidad cuáles son algunos de los miRNAs implicados, y cuáles son algunos de los genes blanco que regulan, sobre todo en organismos modelo como *Arabidopsis thaliana*. No obstante, la información encontrada en otras especies sugiere que en el reino vegetal estos mecanismos, y particularmente los *MIRGEN,* son relativamente conservados a nivel de secuencia, razón por la cual también predomina la escisión del mensajero como mecanismo de silenciamiento (Yu *et al*., 2017). Además, se ha visto que regularmente los genes silenciados por miRNAs son factores de transcripción, lo cual habla de lo fino de la regulación provocada por esas pequeñas moléculas. Los miRNA vegetales más frecuentemente implicados en respuesta al estrés térmico y sus genes blanco se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Algunos de los miRNAs más comunes relacionados con el estrés térmico en los organismos vegetales.

miRNA	Genes Blanco	Organismos	Referencias
miR156	*SPL*	*A. thaliana, Oryza sativa*	Stief et al., 2014; Liu et al., 2017
miR159	*MYB/TCP*	*A. thaliana*	Achard et al., 2004; Reyes y Chua, 2007
miR160	*ARF*	*A. thaliana, Helianthus annuus*	Mallory et al., 2005; Li et al., 2018
miR169	*NFY*	*A. thaliana, Oryza sativa*	Ni et al., 2013; Du et al., 2017.
miR172	*AP*	*A. thaliana, Oryza sativa*	Xin et al., 2010; Gupta et al., 2014.
miR319	*TCP, MYB*	*A. thaliana, Solanum habrochitaes*	Sunkar y Zhu, 2001; Shi et al., 2019.
miR393	*TIR, AFB2*	*A. thaliana, Agrostis stolonifer*	Jones-Rhoades y Bartel, 2006; Zhao et al., 2019
miR396	*GRF, WRKY*	*A. thaliana, Helianthus annuus*	Sunkar y Zhu, 2001; Giacomelli et al., 2012
miR398	*CSD*	*A. thaliana, Populus tomentosa*	Guan et al., 2013; Yu et al.,2013.
miR399	PHO	*A. thaliana*	Kim et al., 2011; Pegler, et al., 2019.

Nota: Existen múltiples referencias para cada miRNA, aquí solo se enlistan 2.

Los mecanismos moleculares completos en los que participa cada miRNA, se conocen o se hipotetizan para pocos miRNAs particulares, y su contribución a la termotolerancia se ha descrito en plantas modelo. Por ejemplo, se propone que el miR160 podría regular la expresión génica de HSPs durante el estrés por calor de manera indirecta (Li et al., 2018). En los blancos propuestos para este sentido, smiR160 son genes de la familia *ARF* que, a su vez, regulan negativamente genes *HSP* (Li et al., 2018). En este trabajo, los autores reportan que el miR160 fue inducido en el estrés por calor y reprimió la expresión de los genes *ARF10, ARF16 y ARF17*; lo cual provocó que dichos transcritos regularon la germinación de semillas, el crecimiento de hipocótilo y el crecimiento de raquis, además de contribuir en la regulación de la expresión de algunos genes *HSP* (Li *et al*., 2018). Lo anterior sugiere que el miR160 contribuye al incremento de la termotolerancia de las

plantas. Ante el creciente número de reportes sobre miRNAs, una nueva plataforma para el depósito y organización de dicha información fue habilitado en este año, en vista de las limitaciones de las bases de datos de miRNA de plantas que le preceden. Entre las restricciones se incluye la falta de entradas para muchas especies importantes, estándares de anotación desiguales en diferentes especies, abundantes entradas cuestionables y anotaciones limitadas. Para responder a esas carencias se desarrolló la base de datos Plant miRNA Encyclopedia (PmiREN, http://www.pmiren.com/). PmiREN actualmente contiene 16,422 *loci* de miRNA novedosos de alta confianza en 88 especies de plantas y 3,966 recuperados de miRBase (Guo *et al.,* 2020). La nueva base PmiREN es un recurso útil para la investigación de miRNAs vegetales, más organizado y de interfaz amigable.

Por todo lo anterior, destacando que el estudio de los miRNAs puede aportar información importante para explicar la respuesta al calor y considerando que el THC es una fuente de estrés térmico para los frutos de mango, surge la pregunta de investigación de este trabajo, ¿Cómo cambia el perfil de expresión de miRNAs en el mesocarpio de frutos de mango en respuesta al Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario? Lo anterior, debido a que en plantas modelo se ha descrito ampliamente la participación de los miRNA160, 169, 319, 393 y 399 en la respuesta al estrés por calor. Por lo tanto, es muy probable que el perfil de expresión de miRNAs en el mesocarpio de mango c.v. Ataulfo se vea influenciado por el THC, estimulándose los miRNAs antes mencionados, y algunos más. Es posible inferir que dichos miRNAs actúen reprimiendo la expresión de sus genes blanco, claves para mejorar la termotolerancia del fruto, como parte de una respuesta finamente regulada en los frutos de mango, después de ser sometido al THC durante la postcosecha.

3. HIPÓTESIS

El perfil de expresión de miRNAs en el mesocarpio de mango cv. Ataulfo se ve influenciado por el tratamiento hidrotérmico cuarentenario, incluyendo la inducción de los miRNA160, miRNA169, miRNA319, miRNA393 y miRNA399, asociados a estrés por calor, que a su vez reprimen la expresión de sus transcritos blanco.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el perfil de expresión de losmiRNA160, miRNA169, miRNA319, miRNA393 y miRNA399 asociados a estrés por calor, así como los transcritos de sus genes blanco, posterior a la aplicación del tratamiento hidrotérmico cuarentenario en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo.

4.2. Objetivos Específicos

1. Construir genotecas para la secuenciación de los miRNAs presentes en pulpa de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en frutos control y con tratamiento hidrotérmico cuarentenario.
2. Cuantificar la expresión de los miRNA160, miRNA319, miRNA393, miR169 y miR399 en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo control y sometidos al tratamiento hidrotérmico cuarentenario.
3. Predecir los transcritos blancos de los miRNA seleccionados utilizando herramientas bioinformáticas y cuantificar su expresión en los frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo control y sometidos al tratamiento hidrotérmico cuarentenario.
4. Predecir *in silico* la estructura secundaria de los miRNA maduros seleccionados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestreo de Mango cv. Ataulfo en El Rosario, Sinaloa

La recolección de los mangos cv. Ataulfo se llevó a cabo en el huerto "La Aviación" localizado en El Rosario, Sinaloa (Con coordenadas: 22°59′31″N 105°51′41″O). Se colectaron frutos (N = 90) en estado de madurez fisiológica, considerando ésta a partir de los 120 días después de floración. Se tomaron en cuenta criterios de inclusión como la uniformidad del peso y del color, así como frutos libres de daño aparente. Todos los frutos se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de Sodio (200 ppm, Clorox ®) para eliminar los microbios potenciales y se secaron a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente se almacenaron durante toda una noche en una cámara a 20°C antes de la aplicación del THC.

5.2. Aplicación del Tratamiento Hidrotérmico Cuarentenario y Submuestreos

Los frutos de mango colectados se dividieron en dos grupos, 45 mangos para el grupo experimental (THC) y 45 mangos para el grupo control. En el grupo experimental, los mangos se sometieron a las condiciones del THC definidas por la USDA-APHIS (2016), las cuales fueron de 46.1°C por 75 minutos (frutos de 250 g), seguido de un hidroenfriado a 25°C por 30 minutos y posterior secado. Después, los frutos se almacenaron a 20ºC y se tomaron muestras de pulpa a los 0 min, 1, 3, 6 y 24 horas posteriores. En el caso del grupo control se tomaron muestras de pulpa en los mismos tiempos. Los frutos del grupo control se mantuvieron a 20ºC. Para cada tiempo, en ambos grupos (THC y control) se realizaron tres réplicas biológicas conformadas por tres frutos cada una. Los mangos se pelaron y el mesocarpio se cortó en secciones longitudinales delgadas, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. Se utilizaron bolsas de polietileno resistentes a congelación. De cada uno de los tres mangos congelados que conforman una réplica biológica, se tomó una de las rebanadas y se pulverizaron juntas en un

mortero utilizando nitrógeno líquido, sin que se descongelaran durante el proceso. La muestra pulverizada se almacenó a -80 °C hasta la realización de los ensayos posteriores.

5.3. Extracción de RNA total

Se extrajo el RNA total de las muestras utilizando el método reportado por López-Gómez y Gómez-Lim (1992) con algunas modificaciones. Se pulverizaron 0.5 g de tejido de pulpa de mango utilizando nitrógeno líquido. A continuación, la muestra se mezcló en un vórtex con 1 mL buffer de lisis (SDS al 2%, mercaptoetanol al 1%, 50 mM EDTA y 150 mM Tris base a pH 7.5 con 1 M de ácido bórico). El ARN se dejó precipitar con 3 M cloruro de litio (concentración final) durante toda la noche. Se procedió a centrifugar la muestra a 20,000 g por 10 minutos. El pellet fue lavado con etanol al 75% dos veces y se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.1%. (Lopez-Virgen, 2019). El RNA obtenido se trató con DNasa I (Roche) para eliminar el DNA genómico contaminante, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La concentración de RNA y su pureza se evaluó con un equipo Epoch (BioTek). La integridad del RNA se analizó por electroforesis (en condiciones desnaturalizantes) en gel de agarosa al 1%.

5.4. Construcción de Genotecas de miRNAs

La construcción de genotecas de RNAs pequeños (sRNAs) de mesocarpio de mango (que incluyen a los microRNAs) se llevó a cabo como se describe a continuación, de acuerdo a lo reportado por Fishman *et al*., 2018), con algunas modificaciones. Las secuencias de los iniciadores utilizados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la construcción de genotecas de sRNAs

Iniciador	Secuencia 5´- 3´
Adaptador 5´	GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC
Adaptador 3´	5rApp/TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/3ddC/
RTprimer	GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
UPrimer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCT (…) (…) ACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGA

5.4.1. Ligación de Adaptador en 3´-OH

Para la ligación del adaptador al extremo 3´-OH se utilizaron 5 µg de RNA total libre de DNA y se combinaron en un tubo estéril con 1 µL (100 µM) del adaptador, 0.5 µL de inhibidor de RNAsa (20 U), 2 µL de tampón para la enzima T4-ligasa (10X), 1 µL de la enzima T4 RNA ligasa (truncada) y 4 µL de polietilenglicol (PEG) 8000 (50% m/v). Se incubó la mezcla a 25°C durante 1 hora. Posteriormente, se realizó la separación de los sRNAs con el adaptador ligado, utilizando las esferas Ampure XP (Beckman) para separación de RNAs pequeños por inmovilización reversible en fase sólida (la relación entre la concentración de alcohol y las perlas en suspensión de un poli-alcohol, hacen la diferencia de selectividad de las esferas por los diferentes tamaños de ácidos nucleicos). Para la primera fase se partió de 20 µL de la reacción de ligación, a la cual se agregaron 40 µL de H_2O libre de RNasas, 70 µL de las esferas (20% PEG) y 80 µL de isopropanol. Para la segunda fase de selección por tamaño, se partió del volumen final de la primera fase (210 µL) al cual se agregaron 90 µL de las esferas (20% PEG) y 150 µL de isopropanol. Finalmente, se realizó un lavado con etanol al 85%, seguido de la elución con 19 µL de H_2O libre de RNAsas.

5.4.2. Ligación de Adaptador en 5´-OH

Para la ligación del adaptador al extremo 5´-OH se utilizaron 18.0 µL de los sRNAs con el adaptador 3´-OH y se combinaron en un tubo estéril con 0.5 µL (100 µM) del oligonucleótido de

bloqueo y 0.5 µL (100 µM) del adaptador 5´-OH. Además, se agregó a la mezcla: 1 µL de inhibidor de RNasa (20 U), 3 µL de tampón para la enzima T4-ligasa (10X), 1 µL de la enzima T4 RNA ligasa (truncada), 3 µL de ATP (10 mM) y 3 µL de dimetilsulfóxido DMSO (100% v/v). Se incubó la mezcla a 95 °C durante 30 s y posteriormente, se realizó la separación de los sRNAs utilizando las esferas Ampure XP (Beckman). Se partió de 30 µL de la segunda reacción de ligación, a la cual se agregaron 20 µL de H_2O libre de RNAsas, 80 µL de las esferas (20% PEG) y 80 µL de isopropanol. Finalmente, se realizó un lavado con etanol al 85%, seguido de la elución con 15 µL de H_2O libre de RNAsas.

5.4.3. Síntesis de cDNA de los sRNAs

Para la transcripción inversa se combinaron en un tubo 12.5 µL de los sRNAs unidos a los adaptadores con 0.5 µL del RT Primer (100 µM), se llevó el tubo al termociclador (Applied Biosystems 2720) a 65°C durante 5 minutos y luego a 42°C y se agregaron 3 µL del tampón 5X de la enzima, 1 µL de SuperScript II (Invitrogen), 1 µL de dNTPs (2.5mM) y 2 µL de DDT 0.1 mM. Posteriormente, la mezcla se incubó en el termociclador a 42 °C durante 60 minutos, seguido de 10 minutos, luego a 85°C y finalmente a 10°C hasta retirar los tubos del termociclador.

5.4.4. Amplificación por PCR del cDNA

La amplificación por PCR para cada genoteca se llevó a cabo de la siguiente manera: de cada reacción se utilizaron 2 µL del producto de la retro transcripción, 33.7 µL de agua destilada, 10 µL del tampón 5X de la enzima, 1.25 µL del UPrimer (10 µM), 1.25 µL de un RPIPrimer (Identificadores) (10 µM), 0.8 µL de dNTPs 2.5 mM, 0.5 µL de DMSO y 1 µL de la DNA polimerasa Herculasa II (Agilent Technologies). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 minuto de precalentamiento a 94°C; 4 ciclos de 0.5 minutos a 94°C, 1 minuto a 50°C, 0.5 minutos a 68°C; 25 ciclos de 0.5 minutos a 94°C, 1 minuto a 62°C, 1 minuto a 68°C y una

temperatura final de 4°C hasta retirar los tubos del termociclador (Applied Biosystems 2720).
De esta manera se prepararon las genotecas de sRNAs para cada una de las 3 réplicas biológicas de los tiempos 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas de las muestras que recibieron el THC, y para los controles se prepararon 3 réplicas biológicas que contenían una mezcla de todas las muestras (muestras de todos los tiempos). Al finalizar el proceso, la calidad, integridad y concentración de las genotecas se analizó en gel de agarosa al 3% y mediante espectrofotometría en un equipo Epoch (BioTek) respectivamente, y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Posteriormente, la secuenciación de los sRNAs se realizará en una plataforma *Illumina MiSeq* en el laboratorio 8, de Genómica Funcional y Comparativa (IPYCIT, San Luis Potosí, México) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

5.5. Cuantificación de los Niveles de Expresión de los miRNAs

La cuantificación de la expresión de los miRNAs se realizó a utilizando cDNA como templado. Para la síntesis de cDNA de los miRNAs (miR160, miR169, miR319, miR393, miR399), se partió de 3 µg de RNA total y se realizó la transcripción inversa con los reactivos SuperScript II kit (Invitrogen), ™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando oligo dT y el iniciador universal RT Stem-Loop que se diseñó siguiendo las recomendaciones descritas por Chen *et al*. (2005). Al finalizar, la concentración del cDNA se cuantificó en el equipo Epoch (BioTek) y fue almacenado a -20°C hasta su uso. La cuantificación de los transcritos miR160, miR169, miR319, miR393, y miR399 se realizó utilizando el cDNA previamente sintetizado. Para el PCR cuantitativa se utilizó la mezcla iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), y las reacciones se corrieron en un termociclador StepOne (Life Sciences), por triplicado. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µL de la siguiente manera: 5 µL de iQ™ SYBR® Supermix (2X), 0.15 µL de cada iniciador (siendo específico para cada miRNA el iniciador sentido y el iniciador reverso universal) (10 µM), 0.7 µL de agua estéril y 4 µL dede cDNA (25 ng/µL). Los iniciadores se muestran en el Cuadro 3. La expresión relativa se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008) utilizando al sRNA-U6 de mango (con clave Manin18g010920.1, comunicación personal Dr. Kuhn) como normalizador.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para Stem-Loop RT-qPCR

Iniciador	Secuencia 5´- 3´
Sentido miR160	GTATACGCCTGGCTCCCTG
Sentido miR319	GTATACCTTGGACTGAAGGG
Sentido miR393	GTATACATCCAAAGGGATCGC
Sentido miR169	GTATACCAGCCAAGGATGACT
Sentido miR399	GTATACTGCCAGAGGAGAGG
Reverso Universal	GTGCAGGGTCCGAGGT
Sentido sRNA U6	GGAACGATACAGAGAAGATTAGCA
Reverso sRNA U6	CCATTTCTCGATTTATGCGTGTC
RT primer	GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA

5.6. Predicción de Genes Blanco de los miRNAs

La complementariedad perfecta o casi perfecta de los miRNAs de plantas y sus genes objetivos facilita la predicción *in silico* de blancos de miRNA en plantas no modelo. En este estudio, se utilizó la herramienta web psRNATarget (https://plantgrn.noble.org/psRNATarget/) para identificar los posibles blancos de los miRNAs 160, 169, 319, 393 y 399 de *M. indica* (Israr *et al*., 2018). Tanto las secuencias de los miRNAs como las de los transcritos de mango (Dautt-Castro *et al*., 2018) fueron depositadas en psRNATarget. Adicionalmente, se realizó una búsqueda de transcritos blanco utilizando los datos disponibles para *Citrus sinensis*, que se considera la especie filogenéticamente más cercana al mango (Xu, *et al*., 2013) y con la que mayor identidad genómica y transcriptómica tiene (Dautt-Castro *et al.,* 2018). La mayoría de los parámetros del *software* se conservaron por defecto, solo se ajustaron manualmente los siguientes: el valor de expectativa máxima de 3, el número de objetivos principales de 10 y el número de desajustes permitidos en la región de semilla de 1.5, con el objetivo de hacer la predicción más específica para blancos de miRNAs, ya que la herramienta puede predecir blancos para otros tipos de sRNAs.

5.7. Predicción de la Estructura Secundaria de los miRNAs Maduros

Las estructuras secundarias y la energía mínima de plegamiento de las secuencias maduras de los miRNAs de mango (Israr *et al*., 2018) seleccionados fueron predichas con la utilizando la herramienta web mFold (http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold) conservando los parámetros por defecto.

5.8. Cuantificación de los Niveles de Expresión de los Genes Blanco

Para la síntesis de cDNA, se partió de 3 µg de RNA total y se realizó la transcripción inversa con los reactivos SuperScript II kit (Invitrogen), ™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando oligo dT para la retrotranscripción. Al finalizar, la concentración del cDNA se cuantificó en el equipo Epoch (BioTek) y fue almacenado a-20°C hasta su uso. La cuantificación de los transcritos *MiARF17*, *MiMYB33*, *MiAFB2*, *MiINV3* y *MiNFY-3* se realizó utilizando el cDNA previamente sintetizado. Para el PCR en tiempo real se utilizó la mezcla iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), y las reacciones se corrieron en un termociclador StepOne (Life Sciences), por triplicado. Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen final de 10 µL de la siguiente manera: 5µL de iQ™ SYBR® Supermix (2X), 0.15 µL de cada iniciador (10 µM), 0.7 µL de agua estéril y 4 µL de cDNA (25 ng/µL). La expresión relativa se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008) utilizando a *GAPDH* como normalizador (Dautt-Castro *et al*., 2015), quedando de la siguiente manera: $2^{-\Delta\Delta Ct =}$ [Ct gen interés – Ct *GAPDH*) THC – (Ct gen interés – Ct *GAPDH*) Control]. Los iniciadores utilizados se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Iniciadores utilizados para RT-qPCR (genes blanco predichos)

Iniciador	**Secuencia 5´- 3´**
Sentido MiARF17	CCTACTCGGCCAATTCATAC
Antisentido MiARF17	CCGTCAGTGGAAAGAAGATT

Sentido MiMYB33	GCCAATCAGAGTGTCTTACC
Antisentido MiMYB33	CGGCATGAAGCTACAGAAT
Sentido MiAFB2	CTAATGGACGTGGGAAAGTATG
Antisentido MiAFB2	TATGATCTCAACGTTGACCATTC
Sentido MiTPS12	GTCATTCACTGCTGTCTGAA
Antisentido MiTPS12	GTGGAATGGTATGTGGATCAG
Sentido GAPDH	GTGGCTGTTAACGATCCCTT
Antisentido GAPDH	GTGACTGGCTTCTCATCGAA

5.9. Análisis de Elementos *cis* Regulatorios de los Genes Blanco Predichos

Para todos los genes blanco predichos, se localizaron 1.5 Kb de nucleótidos río arriba del codón de inicio (ATG) de la transcripción de cada gen en la base de datos del genoma de mango (comunicación personal del Dr. Khun, GenBank: PRJNA450143). El análisis de dichas regiones se realizó mediante la herramienta bioinformática Ciiider (http://www.ciiider.org) (Gearing *et al*., 2019), utilizando un 0.90 de similitud entre núcleo y matriz para los grupos de matrices de elementos de promotores generales y de plantas.

5.10. Diseño Experimental y Análisis de Datos

El análisis estadístico se realizó a través de un diseño completo al azar, para encontrar diferencias significativas se realizó la prueba de ANOVA de una vía para cada uno de los genes analizados, donde el factor experimental fue la expresión relativa y la variable de agrupamiento el tiempo posterior a la aplicación del THC (0.5, 1, 3, 6 y 24 horas). De existir diferencias significativas entre las medias, éstas se determinaron utilizando la prueba de Tukey-Kramer. Todas las pruebas se realizaron a un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), mediante el paquete estadístico NCSS versión 2020.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Predicción de transcritos blancos de los miRNAs de mango que responden al calor

Los miR160, miR169, miR319, miR393 y miR399 de mango, identificados *in silico* por Israr *et al*. (2018) se seleccionaron por su relación con el estrés térmico en otras plantas. La predicción de los posibles blancos se realizó utilizando psRNAtarget, y de la salida se seleccionó al menos un transcrito blanco para cada miRNA de mango. Los blancos seleccionados fueron los que cumplieron con tener un valor de Expect entre 0 y 3 (esperado para una alta complementariedad entre el miRNA y su blanco) y que presentaran menos de 3 nucleótidos discordantes al alinear el blanco con el miRNA correspondiente. Los resultados del análisis se detallan en el cuadro 5 mientras que, en la figura 2 se muestran los alineamientos entre los miRNAs que participan en la regulación de la expresión de genes. Las secuencias nucleotídicas de los blancos se obtuvieron del ensamble del genoma de mango (comunicación personal Dr. Kuhn, GenBank: PRJNA450143) para el mapeo de los transcritos de mRNA. La predicción de cuál o cuáles serán los transcritos silenciados por una secuencia de un miRNA particular es importante para entender su función biológica.

La herramienta psRNATarget se utilizó para identificar blancos de sRNAs (que incluyen a los miRNAs) de plantas por: (1) análisis de complementariedad reversa entre la secuencia del sRNA y el blanco (mRNA) utilizando un esquema de puntaje predefinido y (2) mediante la evaluación de la accesibilidad del sitio de unión en el mRNA (Dai *et al*., 2018). Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los genes blanco predichos en mango para los miRNAs evaluados en el presente trabajo fueron factores de transcripción, al igual que en la mayoría de las plantas (Dai y Zhao, 2011). Por ejemplo, en el caso de los miR156, miR159 y miR160, sus blancos corresponden a los genes que codifican los factores de transcripción *SPL, MYB y ARF*, en *A. thaliana*, arroz y girasol (*Helianthus annus*), respectivamente (Liu *et al.,* 2017; Reyes y Chua, 2007; Li *et al.,* 2018). Por lo anterior, es posible que los miRNAs seleccionados estén participando de forma indirecta, y no directamentente sobre la expresión de proteínas efectoras, en la regulación de la respuesta al calor.

Cuadro 5. Predicción *In silico* de transcritos blancos de los miRNAs seleccionados utilizando psRNAtarget comparado con el transcriptoma de *Mangifera indica* L. cv. Ataulfo (Dautt-Castro *et al*., 2018) y *Citrus sinen*sis (Xu *et al*., 2013).

miRNA	**Gen blanco vs. Mango (Identificador)**	**Expect**	**Gen blanco vs. Naranja (Identificador)**	**Expect**	**Ortólogos BLASTn (No. Acceso).**	**Organismo**	**% ID**
miR160	Manin01g009690.2	0	-		***ARF10*** (XM_006488016)	*C. sinensis*	85
	Manin03g010260.1	0	-		***ARF18*** (XM_031429431)	*P. vera*	94
	Manin13g005110.1	0	-		***ARF16*** (XM_006485635)	*C. sinensis*	88
	Manin08g004360.1	0	-		***ARF16*** (XM_031396063)	*P. vera*	94
	Manin10g000460.1	0.5	-		***ARF18*** (XM_006481402)	*C. sinensis*	87
	Manin15g006750.2	0.5	c24628	0.5	***ARF17*** (XM_006472629)	*C. sinensis*	81
miR169	Manin18g008780.1	2	-		***NFYA-3*** (XM_031405989)	*P. vera*	80
	Manin04g010680.2	2	-		***NFYA-3*** (XM_031405989)	*P. vera*	81
	Manin07g004250.1	2	-		***NFYA-3*** (XM_031432268)	*P. vera*	91
	Manin05g004980.1	2	-		***NFYA-3*** (XM_031432268)	*P. vera*	90
	Manin03g005330.1	2	c23576	2	***NFYA-3*** (XM_031416168)	*C. sinensis*	89
miR319	Manin08g002560.2	2.5	-		***ARF16*** (XM_031396063)	*C. sinensis*	87
	Manin15g000090.1	2.5	-		***END2L*** (XM_031427314)	*P. vera*	93
	Manin00g013600.2	2.5	c25136	2.5	***MYB33*** (XM_025095846)	*C. sinensis*	86
miR393	Manin12g005250.1	0	-	0	***AFB2*** (XM_031397449)	*P. vera*	92
	Manin11g012230.1	0	c22459	0	***AFB2*** (XM_031416664)	*P. vera*	93
miR399	Manin08g001520.2	0	c16859	0	***INV3*** (XM_031412828)	*P. vera*	88

Abreviaturas: Factor de respuesta a auxinas (*ARF*), Factor de transcripción nuclear Y subunidad A-3 (*NFYA-3*), Endoglucanasa-2-like (*END2*), Factor de transcripción tipo MYB (*MYB),* Auxin F box-2 *(AFB2),* Invertasa-3 *(INV3),* Identidad (ID) del ortólogo más idéntico; *P. vera (Pistacia vera).* y *C. sinen*sis (*Citrus sinen*sis). En color rojo se indican los transcritos seleccionados para evaluar su expresión. Se incluyen identificadores de mango y sus ortólogos anotados en *C. sinen*sis.

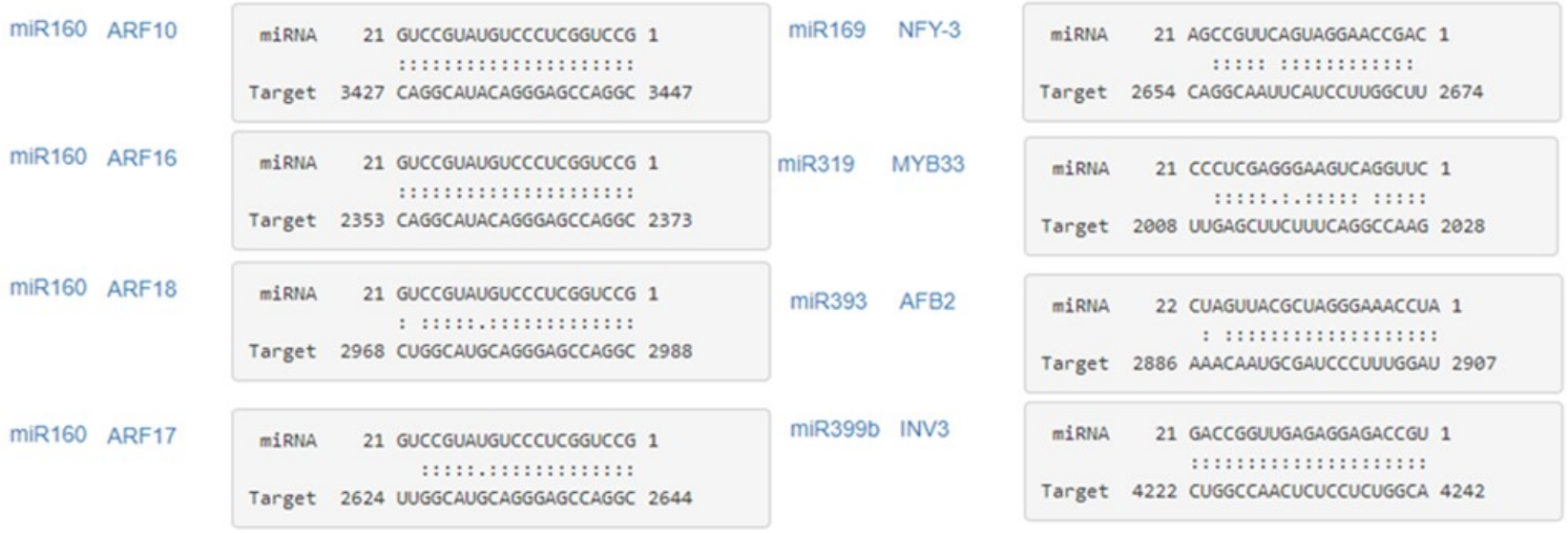

Figura 2. Alineamiento entre los miRNAs de mango seleccionados y de sus transcritos blanco putativos predichos por psRNATarget2017.

Después del THC se esperaría que la expresión miRNAs de mango seleccionados esté inducida y que la expresión de sus respectivos mRNAs blanco se encuentre reprimida, simultáneamente. Sin embargo, lo anterior puede depender no sólo de la complementariedad entre secuencias, si no de la accesibilidad estructural y de la multiplicidad de blancos que un solo miRNA puede reprimir (Dai y Zhao, 2011).

6.2. La Estructura Secundaria de los miRNAs de Mango Evaluados Podría Explicar su Efectividad Como Reguladores Negativos de los Genes Blanco Predichos

Los cinco miRNAs evaluados en este trabajo, cuyas secuencias fueron identificadas *in silico* por Israr et al. (2018), poseen una estructura secundaria de tallo horquilla favorecida energéticamente, es decir con una energía libre mínima de plegamiento negativa. Esta estabilidad energética que le confieren los puentes de hidrógeno en el apilamiento (*stacking*) que van de 3 hasta 5 puentes, como se muestra en la Figura 3. Dichas estructuras y energías mínimas de plegamiento (EMP) fueron predichas utilizando el algoritmo m-FOLD (disponible en el servidor http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold), y que se representan en la (Figura 3). Las representaciones de Viena, son otra forma de representar la estructura secundaria del RNA, en la que un punto indica un nucleótido no enlazado y un paréntesis indica que el nucleótido está formando un enlace de hidrógeno. Dichas estructuras y las EMP de las estructuras predichas para cada miRNA se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Representación de Vienna de la estructura secundaria de los miRNA de mango evaluados.

miRNA	**Secuencia**	**Representación de Viena**	**EMP (ΔG)**
miR160	GCCUGGCUCCCUGUAUGCCUG	....(((.........)))..	-2.38
miR169	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA	....((((.....))))....	-2.80
miR319	CUUGGACUGAAGGGAGCUCCC	...........(((....)))	-1.46
miR393	AUCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC	((((....))))..........	-2.27
miR399	UGCCAGAGGAGAGUUGGCCAG	.(((((.......)))))…	-4.60

El modelo aceptado de la represión de mRNA guiada por miRNA sugiere que los miRNAs maduros

se dirigen a sus blancos de manera secuencia específica. Sin embargo, existe evidencia de que la secuencia de nucleótidos del miRNA no es el único determinante de la especificidad por su blanco. Usando nucleasas específicas, T1, V1 y S1, así como diferentes técnicas espectroscópicas (RMN, UV/Vis y CD) se encontró que el miR21, miR93 y miR296 en humanos pueden adoptar estructuras de horquilla y / o homodúplex en su forma madura (Belter et al., 2014). Además, se reportó que la estructura secundaria de esos miRNA en solución estuvo en función de la concentración de RNA y las condiciones iónicas de la solución (Belter *et al*., 2014). Por lo que surgen nuevas hipótesis sobre los factores que modulan la eficiencia del silenciamiento de blancos dirigido por miRNAs.

Por otra parte, la estructura del RNA blanco puede también ser determinante para un silenciamiento efectivo. Se ha demostrado que algunos motivos estructurales de mRNA, como los pseudo-nudos, hacen que el sitio objetivo sea inaccesible para las interacciones con el miRNA, ya que la energía requerida para separar los puentes de hidrógeno podría ser insuficientemente compensada por la formación de nuevos enlaces con una molécula externa (Hariharan *et al*., 2009). En consecuencia, se cree que un miRNA unido a regiones no estructuradas de mRNA se ve favorecido energéticamente y que solo estos blancos pueden ser regulados eficientemente por miRNAs (Harharan *et al*., 2009). Entonces, la estructura del mRNA también es un punto importante para que el silenciamiento se lleve a cabo, de ahí la importancia del estudio estructural a nivel tridimensional del RNA.

La eficiencia del miRNA sobre el mRNA blanco depende también de la estructura del miRNA y del mRNA una vez dentro del complejo RISC. Las proteínas argonautas reorganizan la estructura de miRNA, exponen la región denominada "semilla" y, por lo tanto, facilitan el reconocimiento específico del blanco (Bartel, 2004). Sin embargo, el modelo actual de acción de miRNA no explica en su totalidad cómo una secuencia de nucleótidos tan corta de la región "semilla" puede determinar la especificidad de la acción de miRNA. Por lo que se propone que, dentro de la célula, las horquillas de miRNA son más abundantes que sus dímeros (Belter *et al*., 2014). El argumento adicional para apoyar esta idea es el exceso de miRNAs totales, en relación con la concentración de las proteínas AGO (1-4) (Flores *et al*., 2013). Teniendo en cuenta que los miRNAs evaluados poseen una estructura de horquilla energéticamente favorecida, es posible que en dicha conformación su incorporación en las proteínas argonautas se vea comprometido, por la concentración citoplasmática tanto de los argonautas, como de los propios miRNAs y RNAs blancos.

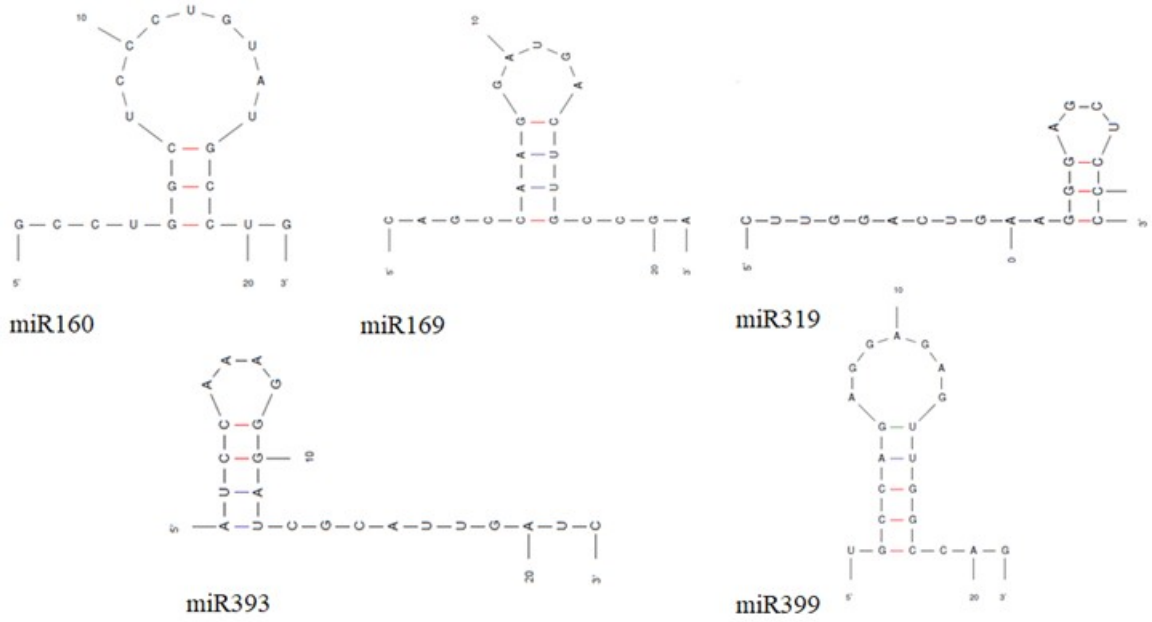

Figura 3. Estructura secundaria predicha para los miRNAs de mango evaluados utilizando mFOLD (http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold).

6.3. La Expresión del miR160 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC, y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *ARF17*

De acuerdo con la predicción de genes blanco, el miR160 potencialmente podría regular la expresión de factores de transcripción *ARF* en frutos de mango para favorecer la tolerancia al calor al que son sometidos durante el THC. En nuestro estudio, la expresión del miR160 fue inducida por efecto del THC durante todo el tiempo evaluado (Figura 4A), aumentando su expresión 13.6 veces a la media hora posterior al THC, 35.1 veces después de 1 hora, 15.3 veces a las 3 h, 14.9 veces a las 6 h y 4.9 veces a las 24 h posteriores al THC ($p < 0.05$), con respecto a los frutos sin THC. Sin embargo, al evaluar la expresión de *ARF17*, uno de los genes blanco predichos, se observa que su expresión no se reprime en los tiempos evaluados con respecto a los frutos controles, Además, se observaron cambios en los niveles de expresión de *ARF17* en los distintos tiempos, sin diferencias estadísticamente significativas. En este sentido, los datos analizados mostraron un aumento en la expresión de *ARF17* por efecto del THC 1.7 veces a la media hora posterior al THC, 1.7 veces después de 1 h, es decir se mantuvo, posteriormente 7.30 veces a las 3 h, 2.5 veces a las 6 h y 8.2 veces a las 24 h posteriores al THC ($p > 0.05$) (Figura 4B).

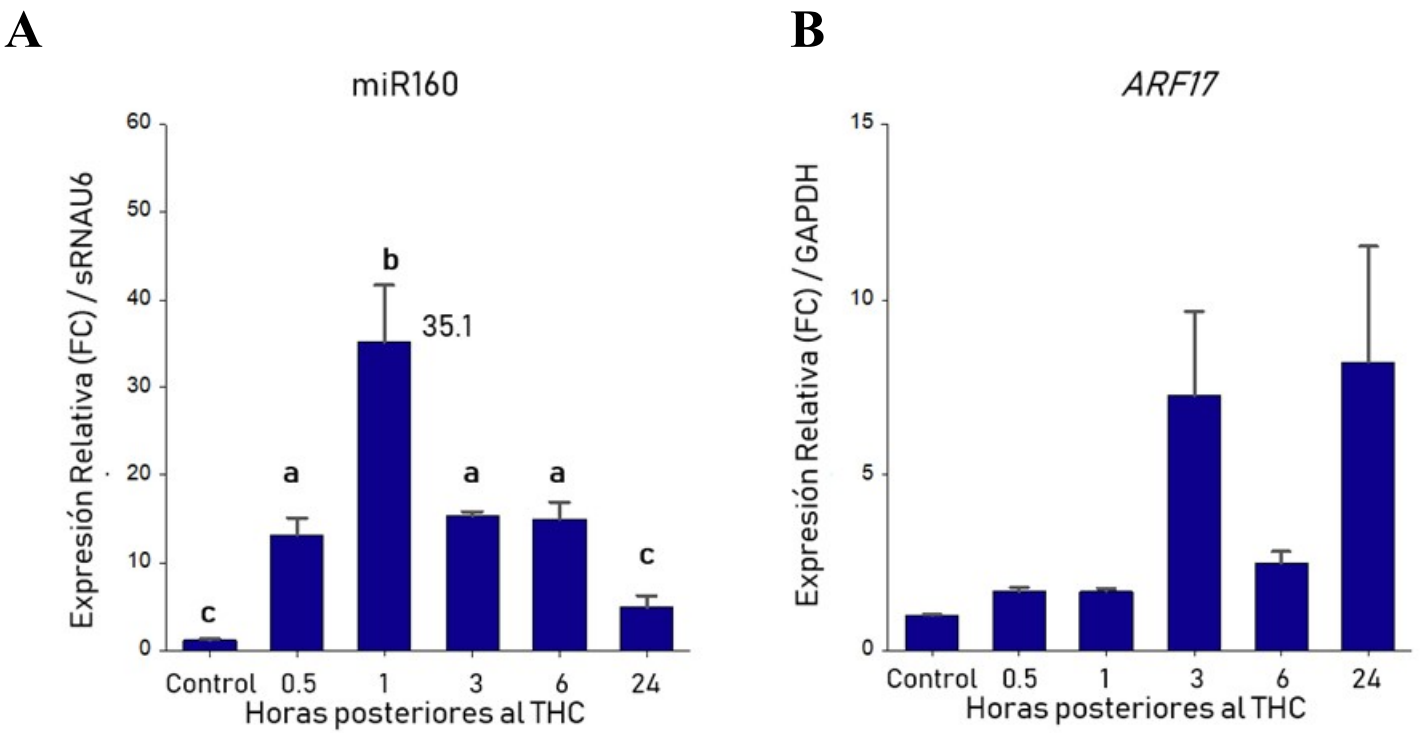

Figura 4. Expresión relativa del miR160 (A) y *ARF17* (B)en frutos de mango control y sometidos al THC). Las barras indican el EE de tres réplicas biológicas y tres técnicas. Las literales diferentes indican diferencia estadística en los casos en que se presentó ($p < 0.05$; $p > 0.05$). El control representa la expresión en las muestras agrupadas de todos los tiempos muestreados sin la aplicación del THC.

En la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que el miR160 es estimulado en respuesta acondiciones de alta temperatura, para reprimir la expresión de sus genes blanco *ARF10, ARF16* y *ARF17* (Lin *et al*., 2018). En tomate, la represión de *ARF10* causada por miR160, se relacionó con la regulación del balance hídrico de las hojas, lo cual podría ser un mecanismo adaptativo ante el estrés (Liu *et al*., 2016). La familia de factores de transcripción *ARF* modulan la expresión de algunos genes de proteínas de choque térmico (HSPs), como respuesta para incrementar la termotolerancia en las plantas. En un estudio realizado por Lin *et al*. (2018), con semillas de *Arabidopsis* incubadas a 44°C, la expresión del miR160 fue estimulada mientras que la expresión de *ARF16* y *ARF17* fue significativamente reprimida (Lin *et al*., 2018). Además, se encontró que los niveles de expresión de *HSP101, HSP70B, HSP21,* y *HSP17* fueron inducidos a la par del miR160 durante el estrés térmico aplicado (Lin *et al*., 2018).

El papel de las HSPs en la termotolerancia es ampliamente conocido, éstas actuan como chaperonas moleculares contribuyendo en el mantenimiento de la estructura terciaria de otras proteínas, previniendo la desnaturalización térmica. En el mango cv. Ataulfo sometido al THC, se encontró un incremento en la expresión de la *HSP90*, desde la primera hasta la sexta hora posteriores al tratamiento. Es posible su participación tanto en la termotolerancia, como en su función de chaperona durante la biogénesis de los miRNAs (López-Virgen, 2019). Por lo que, probablemente los mecanismos de regulación inducidos por miR160 podrían elevar la termotolerancia no sólo en *Arabidopsis* u otros organismos modelo, sino también en los frutos de mango. Será necesario evaluar la expresión del resto de los transcritos *ARF* predichos para elucidar causas por las que *AFR17* no se encontró significativamente reprimido, hipotetizando que probablemente alguno de los otros *ARF*s predichos sí presente la represión esperada.

6.4. La Expresión del miR169 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *NFY-3*

El miR169 ha sido reportado como uno de los miRNAs vegetales que intervienen en la regulación de la respuesta de las plantas al calor (Zhang *et al*., 2011). En este trabajo se encontró que el miR169 se indujo por efecto del THC durante las primeras horas posteriores a su aplicación, a excepción

de los tiempos 6h y 24 h (Figura 5A). Encontrándose estimulado 1.4 veces a la media hora posterior al THC, 3.4 veces después de 1 h, 2.4 veces a las 3 h, y se vió reprimido 0.1 veces a las 6 h y se vio reprimido 0.2 veces a las 24 h posteriores al THC. La consecuencia de dicha inducción podría contribuir en cambios como controlar la apertura y cierre estomáticos, la conductancia estomática, la velocidad respiratoria, entre otros, respuesta al estés abiótico, como ya se ha visto en otros organismos (Ni *et al*., 2013).

En cuanto a la expresión del blanco predicho, *NFY-3*, se encontró inducido por efecto del THC 2.4 veces a la media hora posterior al THC, reprimido 0.7 veces después de 1 h, inducido 5.3 veces a las 3 h, y se vió reprimido 0.3 veces a las 6 h e inducido 3.4 veces a las 24 h posteriores al THC (Figura 5B). Resulta importante destacar que la represión de este blanco ocurre simultáneamente a la estimulación del miR169 1h después de recibir el THC, como se esperaría para cada par predicho. La estirpe celular también puede ser un factor importante en las diferencias encontradas sobre la expresión del miRNA169 y su blanco. El *NF-YA5* en las células de guarda controla la apertura estomática, mientras que el *NF-YA5* expresado en otras células importantes regula la expresión de genes asociados al estrés (Zhao *et al*., 2009). Por lo que el estudio de la vía reguladora miR169/*NFY-A5* podría conducir al desarrollo de estrategias para el mejoramiento de la termotolerancia de las plantas.

Existe evidencia de que el miRNA169 es regulado de maneras distintas frente al estrés térmico en diferentes especies vegetales. La familia del miR169 es una de las más ampliamente conservadas en los vegetales. Se ha demostrado que esta familia de miRNAs tiene un papel importante en las adaptaciones fisiológicas (Zhang *et al*., 2011). El miR169 en *A. thaliana* tiene como blanco el factor de transcripción *NF-YA5*, que participa en la regulación de la respuesta al estrés abiótico (Gahlaut *et al*., 2018). En varios estudios, se demostró que la represión de miR169 permite la expresión de *NF-YA5*, que desempeña un papel esencial en respuesta al estrés térmico en cultivos importantes. En contraste con las observaciones anteriores, también se ha reportado la estimulación del miR169 en trigo bajo estrés térmico. Esto sugiere que el miR169 puede tener patrones de expresión contrastantes en diferentes plantas ante condiciones de estrés térmico, probablemente debido a su participación en la coordinación de la regulación río de un conjunto de genes blanco.

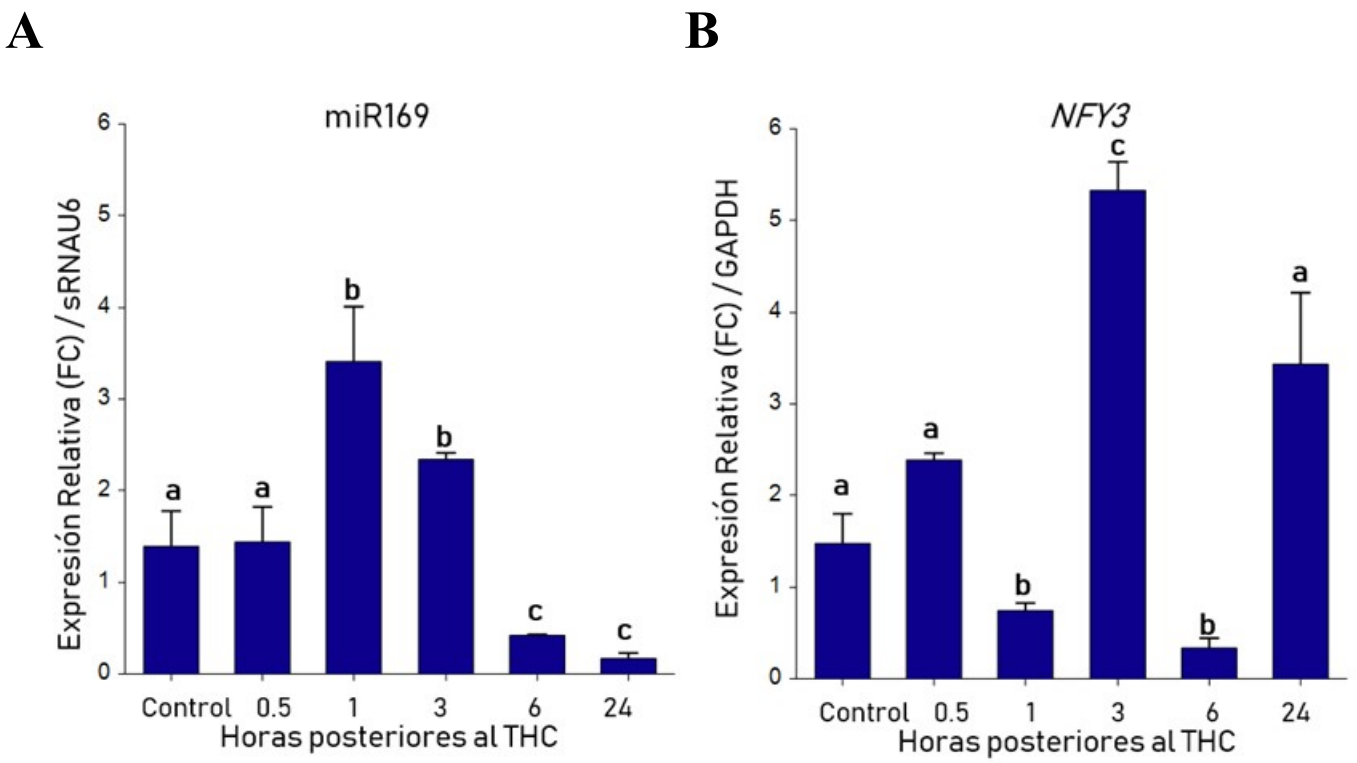

Figura 5. Expresión relativa del miR169 (A) y *NFY3* (B) en frutos de mango sometidos al THC. Literales indican diferencia estadística ($p < 0.05$; $p < 0.05$). Las barras indican el EE de tres réplicas biológicas y tres técnicas. El control representa la expresión en las muestras agrupadas de todos los tiempos muestreados sin la aplicación del THC.

6.5. La Expresión del miR319 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC, y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *MYB33*

El miR319 está potencialmente implicado en la respuesta al aumento de la temperatura ocasionado por el THC aplicado a los frutos de mango, reprimiendo la expresión de uno de sus blancos. En el mesocarpio de mango, el miR319 se encontró inducido durante todo el tiempo posterior al THC evaluado, 5.9 veces a la media hora posterior al THC, 23.5 veces después de 1 hora, 12.3 veces a las 3 h, 4.6 veces a las 6 h y 1.7 veces a las 24 h posteriores al THC (Figura 6A). Asimismo, encontramos que al evaluar la expresión de *MYB33*, uno de los genes blancos predichos se encontró reprimido por efecto del THC 0.7 veces a los 30 minutos posteriores al THC, inducido 1.6 veces después de 1 hora, 2.6 veces a las 3 horas, 0.6 veces a las 6 horas y volvió a reprimirse 0.4 veces a las 24 horas posteriores al THC ($p < 0.05$) (Figura 6B).

Por su parte, en otro estudio, la sobreexpresión del sha-miR319d en plantas de tomate incrementó la tolerancia de las mismas ante bajas y altas temperaturas. También, incluyendo una disminución de la pérdida de electrolitos, de la concentración de malondialdehído y de la generación de anión superóxido y H_2O_2, así como un incremento en el contenido de clorofila en comparación con los organismos silvestres (Shi *et al*., 2019). En cuanto a la regulación de expresión génica, se ha reportado que algunos genes relacionados con la respuesta a la temperatura como *MYB83, Hsp90* y otros relacionados con las EROs (*ZAT12 y ZAT10*) tienen patrones de expresión diferentes en las plantas sobreexpresantes del miR319 comparado con el fenotipo silvestre (Shi *et al*. 2019). Lo anterior puede indicar que el miR319 regula la respuesta al estrés térmico a través de mecanismos que involucran proteínas de choque térmico y especies químicas señalizadoras del estrés, como las EROs que actúan como transductores de señales.

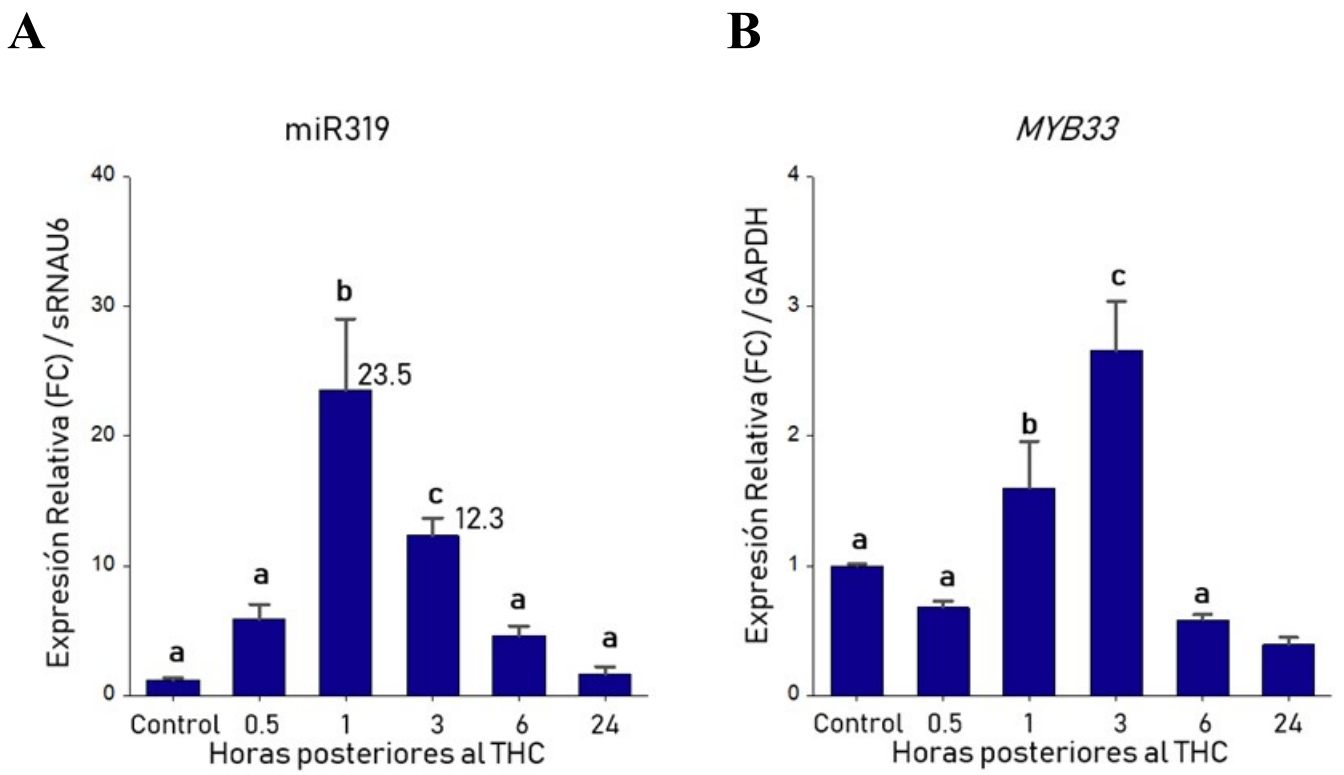

Figura 6. Expresión relativa del miR319*3* (A) y de *MYB33* (B) en frutos de mango sometidos al THC. Las barras indican el EE de tres réplicas biológicas y tres técnicas. Literales diferentes indican diferencia estadística ($p < 0.05$; $p < 0.05$). El control representa la expresión en las muestras agrupadas de todos los tiempos muestreados sin la aplicación del THC.

6.6. La Expresión del miR393 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA *AFB2*

En este caso, el análisis de expresión mostró que el miR393 tuvo un comportamiento distinto a los dos anteriores miRNA evaluados (Figura 7A). Se encontró casi al nivel de los controles a la media hora posterior al THC, mientras que se indujo 2.49 veces después de 1 hora, recuperando el estado basal a las 3 y 6 horas post tratamiento, mientras que fue reprimido 3.44 veces a las 24 horas posteriores al THC ($p > 0.05$). Asimismo, encontramos que al evaluar la expresión de *AFB2*, uno de los genes blancos predichos, estuvo reprimido en al menos uno de los tiempos evaluados. Detallando, la expresión de *AFB2* se indujo por efecto del THC 1.6. veces a la media hora posterior al THC, reprimido 0.6 veces después de 1 hora, luego se mantuvo inducido 5.8 veces a las 3 horas, 11.1 veces a las 6 horas y 4 veces a las 24 horas posteriores al THC (Figura 7B).

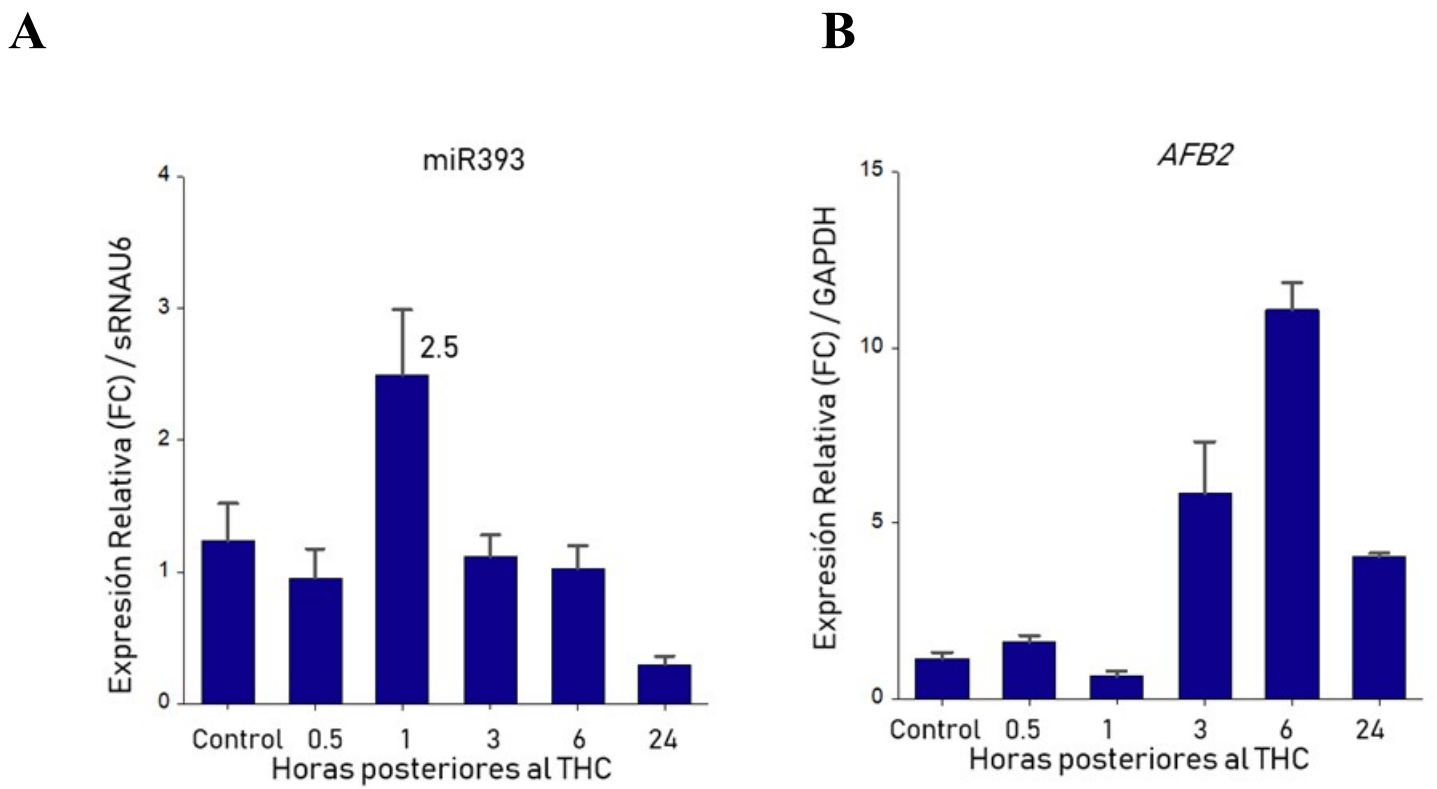

Figura 7. Expresión relativa del miR393 (A) y de *AFB2* (B) en frutos de mango sometidos al THC. Las barras indican el EE de tres réplicas biológicas y tres técnicas. El control representa la expresión en las muestras agrupadas de todos los tiempos muestreados sin la aplicación del THC.

Se han realizado investigaciones recientes en las que se observó una disminución de la cantidad de transcritos de *AsAFB2* en tres líneas transgénicas de la especie *Agrostis stolonifera* L. que sobreexpresaban el miR393, en comparación con la línea silvestre, lo que indica que *AsAFB2* está siendo regulado negativamente por miR393 (Zhao *et al*., 2019). En ese mismo trabajo evaluaron la expresión de algunas proteínas HSP, para validar que la represión del gen blanco se haya debido al calor, y encontraron niveles altos de proteínas relacionadas con el estrés térmico en los individuos sobreexpresantes (Zhao *et al*. 2019). Lo anterior sugiere que, en los frutos de mango, un mecanismo similar podría suceder, protegiendo a las células de los estragos de la temperatura reglamentaria para el THC.

El miR393 participa indirectamente en la respuesta al estrés térmico, al no tener un efecto directo sobre las moléculas efectoras de tolerancia al calor. Se ha reportado que la expresión de miR393 se ve alterada por diferentes tipos de estrés abiótico (calor, frío, deshidratación, salinidad, respuesta a hormonas) en *Arabidopsis* (Gao *et al*., 2011; Guan *et al*., 2013), trigo (Xin *et al*., 2010), arroz (Gao *et al*., 2011; Mangrauthia *et al*., 2017) y césped (Hivrale *et al*., 2016). Se ha demostrado que el miR393 regula negativamente la expresión del gen Inhibidor de Transporte 1 (*TIR1*), así como de algunos genes de la familia F-BOX de señalización de auxinas (*AFB1-3*) (Jones-Rhoades y Bartel 2004; Sunkar *et al*., 2012). Ambos genes (*TIR1 y AFB)* participan en el desarrollo de la raíz y la respuesta al tratamiento de estrés por calor, a través de su participación en la señalización de auxina (Meng *et al*., 2010). Por lo tanto, la vía reguladora miR393/*AFB2* podría ser otro objetivo plausible para mejorar la tolerancia de las plantas de cultivo al estrés térmico.

6.7. La Expresión del miR399 se Induce en Frutos de Mango cv. Ataulfo Después de Recibir el THC y es Potencialmente Dirigido a Regular la Expresión del mRNA INV*3*

Se ha reportado que la familia del miR399 puede estar implicada en las respuestas al estrés térmico en los organismos vegetales. En este trabajo se encontró que el miR399 se indujo por efecto del THC, a excepción del tiempo 24 horas (Figura 8A); 1.33 veces a la media hora posterior al THC, 6.0 veces después de 1 hora, 3.6 veces a las 3 horas, 1.3 veces a las 6 horas y se vio reprimido 0.1 veces a las 24 horas posteriores al THC.

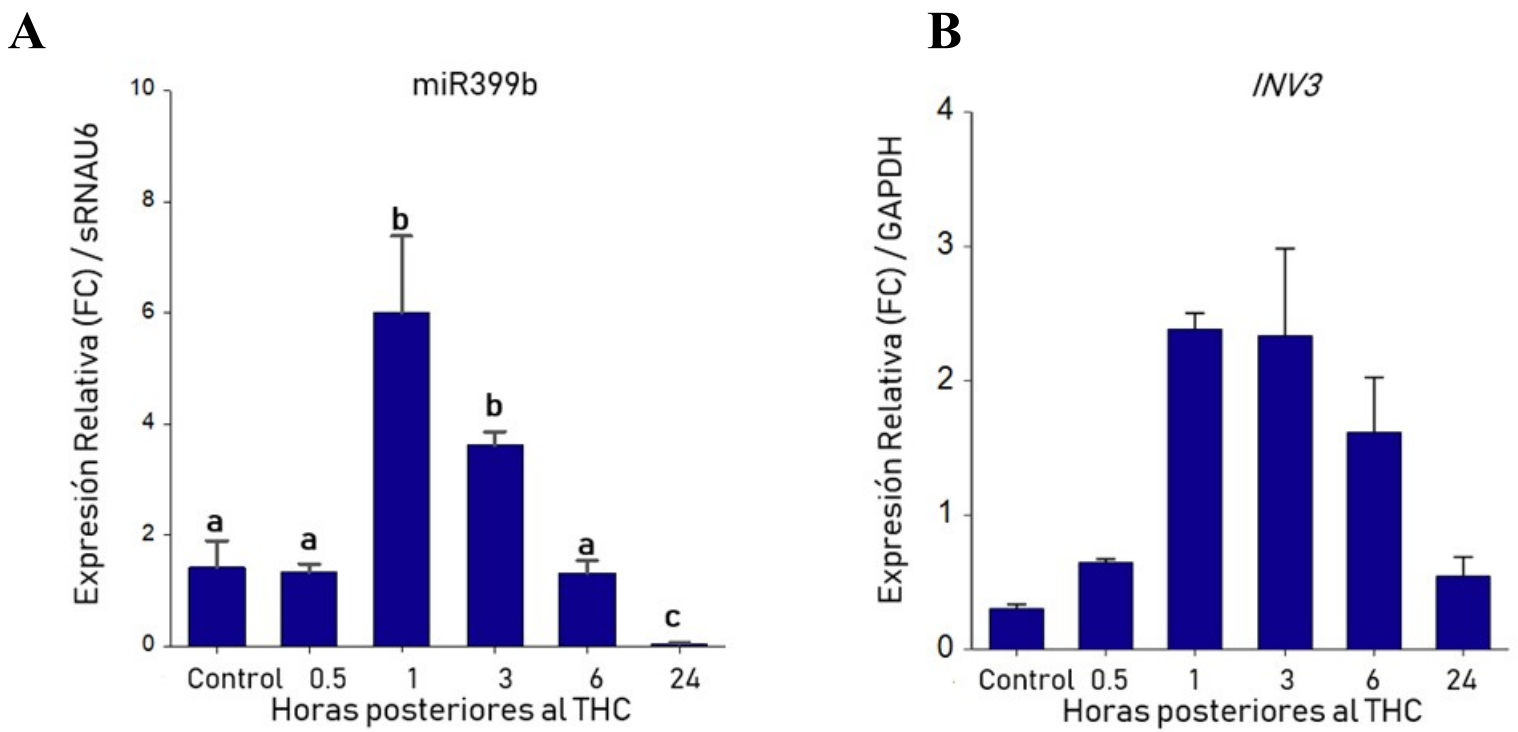

Figura 8. Expresión relativa del miR399 (A) en frutos de mango sometidos al THC. Las barras indican el EE de tres réplicas biológicas y tres técnicas. Literales indican diferencia estadística ($p < 0.05$). El control representa la expresión en las muestras agrupadas de todos los tiempos muestreados sin la aplicación del THC.

La contribución de la inducción del miR399 a la mejora de la termotolerancia no está completamente esclarecida, aunque algunos autores han reportado su participación en algunas redes de señalización relacionadas con el estrés abiótico. En el caso del mRNA blanco predicho y evaluado en este trabajo, el *INV3*, no se expresó de manera diferencial por efecto del THC en la pulpa de mango cv. Ataulfo (el cambio en expresión no superó el valor de 2.5) (Figura 8B). El par miR399/*PHO2* representa una vía reguladora importante tanto en el control del tiempo de floración como en las respuestas de estrés abiótico (Kim *et al.* 2011; Kruszka *et al*. 2014). El miR399 puede contribuir en la conservación de la homeostasia del fósforo regulando la expresión de la enzima E2 conjugadora de ubiquitina FOSFATO 2 (*PHO2*) en *Arabidopsis* (Kruszka *et al*., 2014). Además, la actividad de miR399 en el silenciamiento de *PHO2* se afecta negativamente por *IPS1* (Inducido por Carencia de Fosfato 1), que es un RNA largo no codificante, ya que *IPS1* funciona como un imitador objetivo secuestrando a miR399, evitando así la escisión de *PHO2* (Franco-Zorrilla *et al*., 2007).

En contraste, encontramos que la predicción del gen blanco del miR399 en fruto de mango cv. Ataulfo muestra a *INV3* (Invertasa alcalina / neutra 3), como su blanco más probable. Las invertasas alcalinas / neutras, que catalizan irreversiblemente la hidrólisis de sacarosa en fructosa y glucosa, desempeñan funciones cruciales en el metabolismo de los carbohidratos y el desarrollo de las plantas (Zhou *et al.,* 2019). Estas enzimas pueden localizarse en la pared celular o en las vacuolas, lo que indica el papel de *INV* en las respuestas de las plantas a las señales ambientales a través del metabolismo del azúcar (Zhou *et al.,* 2019). Se ha encontrado que la expresión de estos genes es tejido específica, y también que responden a diferentes tipos de estrés abiótico como la sequía, el ácido salicílico, el extracto de levadura y los tratamientos con metil-jasmonato (Zhou *et al.,* 2019). Más importante aún, se ha demostrado a través de predicción computacional y de validación experimental (RT-qPCR y RNAseq), que *INV3* e *INV4* son blancos del miR399 en la salvia roja asiática (*S. miltiorrhiza*), y se ha predicho que varios genes de la misma familia pueden ser blancos del miR399 en *Arabidopsis thaliana, Populus trichocarpa, Manihot esculenta* y *Solanum lycopersicum* (Zhou *et al.,* 2019). Lo anterior, en conjunto con la predicción realizada en el presente estudio, indican que el módulo miR399-INV existe ampliamente en las plantas y que posiblemente también en el mango, así como su relación con la respuesta a estrés abiótico.

Como se mencionó antes, el miR399 está involucrado en las respuestas de las plantas a la carencia de fosfato inorgánico (Pi) mediante la escisión de *PHO2* en las plantas (Zhou *et al.,* 2019). Sin

embargo, además del estrés de Pi, estudios recientes mostraron que miR399 también participó en las respuestas de las plantas a la carencia de múltiples nutrientes, como hierro (Fe), potasio (K), sodio (Na) y calcio (Ca) (Zhou *et al.,* 2019). Aunado a ello, se ha propuesto que las vías miR399-*PHO2* y miR399-*INV* están conectadas en las plantas. En la vía miR399-*PHO2* la ausencia de Pi y de sacarosa endógena inducen la expresión de miR399, lo que mejora aún más la captación y translocación de Pi a través de la represión de *PHO2*. Por otro lado, en la vía miR399-*INV* la sacarosa exógena inhibe la expresión de miR399, lo que resulta en una inducción de *INV* y la hidrólisis de la sacarosa, de esta forma, el miR399 actúa como un puente entre de las dos vías (Zhou *et al.,* 2019). Tales evidencias sugieren que la participación del miR399 en la regulación de la expresión de genes posee una amplia diversidad funcional y complejidad en plantas.

En conjunto, puede afirmarse que el THC aplicado a los frutos de mango cv. Ataulfo induce la expresión de los miR160, miR169, miR319, miR393 y miR399, y que esto ocurre dentro de las primeras 24 horas después de la aplicación del tratamiento. Lo anterior indica que la percepción de la señal de estrés térmico, la transducción de dicha señal y la regulación de la transcripción, son eventos que ocurren de manera prácticamente inmediata después de la aplicación del THC. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos, se hipotetiza que todos los miRNA analizados pudieran contribuir de manera indirecta a la respuesta de homeostasia al calor en el fruto de mango, ya que sólo se observó una represión del blanco acompañada de inducción de miRNA simultáneas para dos de los pares evaluados (miR169/*NFY-3;* miR393*/AFB2*) (Figura 9).

Los efectos en la termotolerancia son un producto de la combinación de todos los cambios observados. El no haber encontrado una represión directa sobre la mayoría de los mRNAs blanco predichos puede explicarse de manera clara con al menos tres argumentos: 1) Las secuencias de los miRNA de mango fueron obtenidas mediante predicción *in silico*, lo cual implica que pudieran existir más errores de apareamiento entre el blanco y el miRNA de los que se contemplan en este trabajo; 2) la efectividad del silenciamiento de un mRNA blanco por un miRNA también depende de las potenciales estructuras secundarias que formen los RNAs involucrados que pudieran impedir su ensamblaje en el RISC y; 3) ya que cada miRNA puede silenciar múltiples blancos, es posible que el silenciamiento efectivo de uno en particular se vea diluido o potenciado en función de la concentración citoplasmática, tanto del miRNA, como de todos sus mRNAs blanco. Es por ello que, aunque las herramientas bioinformáticas y los análisis *in silico* son de gran ayuda, al contribuir a la delimitación del trabajo experimental, no son suficientemente aproximadas a la realidad. De

tal forma que se hace evidente la necesidad complementar estos hallazgos con la secuenciación de los sRNAs de mango, para lo cual durante el presente trabajo ya se han elaborado las genotecas de los sRNAs, pero su secuenciación y análisis aún no se concluyen.

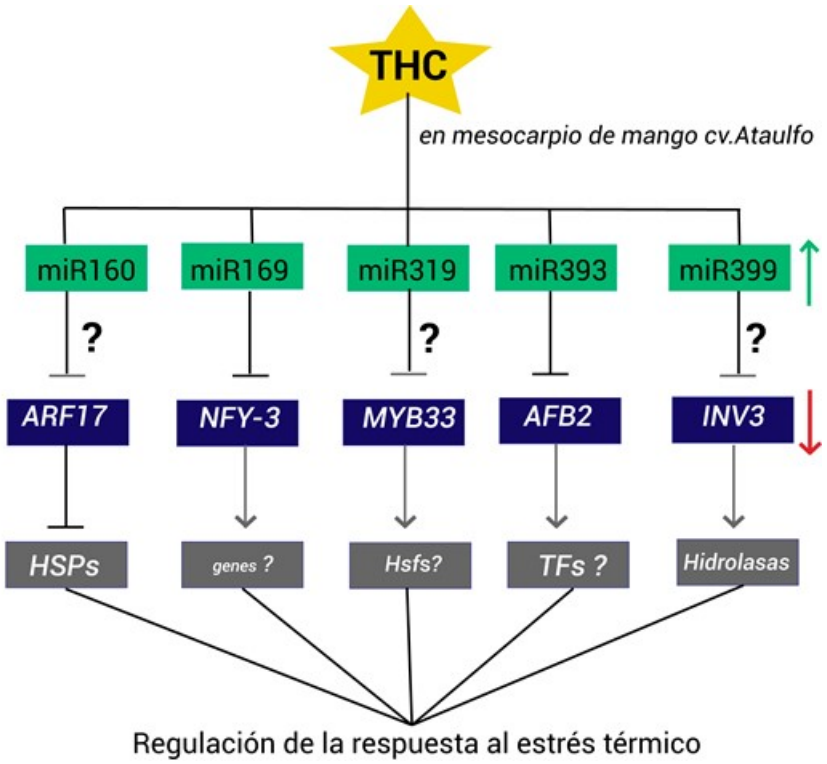

Figura 9. Modelo propuesto de la regulación mediada por miRNAs y sus genes blanco en frutos de mango. Los miRN160, 169, 319, 393 y 399 se inducen en el mesocarpio de mango cv. Ataulfo por efecto del THC aplicado a los frutos. Se espera que estos miRNAs repriman a sus genes blanco implicados en las rutas que conducen a la termotolerancia en el fruto. Se hipotetiza cuáles podrían ser estos genes (recuadro azul) y se incluyen cuáles podrían ser los pasos subsecuentes, como, por ejemplo, de-represión de la expresión de HSPs, HSFs, hidrolasas, y/u otros factores de transcripción. Las flechas grises indican estimulación y las líneas con remate indican represión, mientras que las flechas roja (represión) y verde (inducción), la tendencia esperada en la expresión.

6.8. El Análisis de Elementos *cis*- regulatorios Reveló Presencia de Sitios para la Unión de Factores de Transcripción Relacionados con el Estrés por Calor en las Plantas

Las regiones promotoras de los genes blancos predichos para los miRNAs seleccionados, poseen

elementos *cis* regulatorios para la unión de factores de transcripción relacionadas con el estrés por calor en las plantas. Los elementos particulares localizados en este estudio se enlistan en el Cuadro 7. La ubicación de dichos elementos en la región del promotor y en el 5´- UTR de los genes blanco evaluados se esquematiza en la Figura 10. Se ha encontrado que varios factores de transcripción juegan un papel crucial en la señalización del estrés abiótico en las plantas, ya sea actuando como reguladores positivos o negativos de los genes sensibles al estrés (Roy, 2016). Estudios anteriores han demostrado un papel importante de diferentes familias de factores de transcripción, incluidos AP2 / ERF, NAC, MYB, DREB, LEP y WRKY, en la regulación de la tolerancia al estrés abiótico en plantas (Roy, 2016). En el presente estudio, conocer dicha información nos proporciona una visión ampliada de la regulación de la transcripción, que incluye a los miRNAs (a nivel de secuencia y de estructura secundaria), pero también la contribución de los factores de transcripción, que en conjunto determinan la expresión de los mRNA blanco evaluados.

Cuadro 7. Elementos de respuesta presentes en los genes blanco predichos para los miRNAs

Matriz	**Presencia de elementos en *cis* en los genes evaluados**	**Procesos fisiológicos regulados**	**Referencia**
MYB	TODOS	Respuestas múltiples incluido estrés abiótico	Roy, 2016
DREB	*MYB33, ARF17, INV3*	Respuesta celular al calor	Vázquez-Hernández, *et al.,* 2017
WRKY	*MYB33, ARF17, INV3, AFB2*	Respuestas al estrés biótico y abiótico en las plantas	Chen *et al*., 2019
AFB	*MYB33, ARF17, INV3*	Respuesta a Auxinas y estrés térmico	Parry *et al.,* 2009
ERF	*ARF17*	Desarrollo y estrés abiótico	Saleh y Pagés, 2003
LEP	*AFB2*	Desarrollo y estrés abiótico	Graaff *et al.,* 2000
NAC	*AFB2, INV3, NFY-3*	Desarrollo y estrés abiótico	Wellner *et al*., 2016

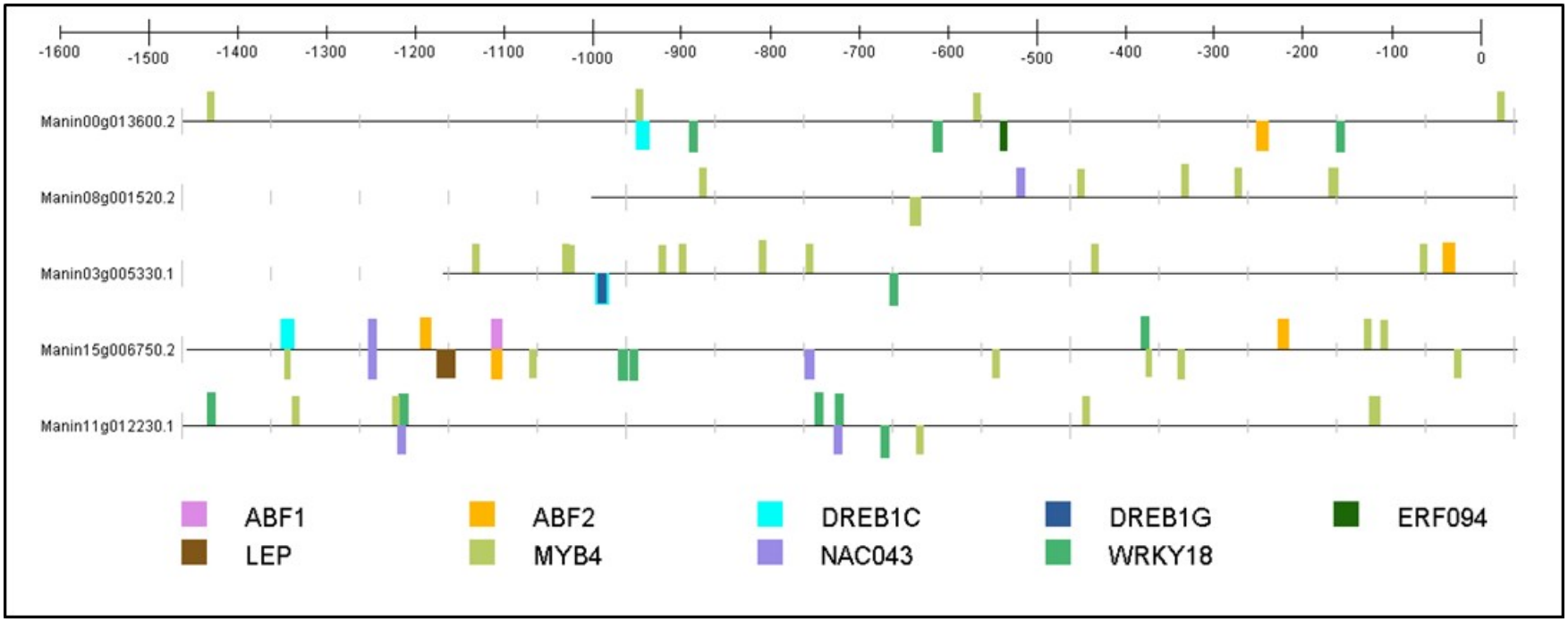

Figura 10. Localización de los elementos *cis*-regulatorios identificados en los genes blanco de los miRNAs estudiados. AFB (*Auxin F-Box*), LEP (*Leafy Petiole response element*), MYB (*MYB repeat family*), DREB (*dehydration-responsive element binding factors*), NAC (*NAC response element*), WRKY (*WRKY repeat family*) y ERF (*Ethylene-responsive element binding factors*). Identificadores: Manin15g006750.2 (*ARF17*), Manin03g005330.1 (*NFY-3*), Manin00g013600.2, (*MYB33*); Manin11g012230.1 (*AFB2*), Manin08g001520.2 (*INV3*).

En el caso de la matriz MYB que se localizó en todos los mRNAs blanco evaluados, se ha visto que forma parte del regulón MYB/MYC implicado en la regulación de la expresión de genes asociada a estrés (Lippold *et al*., 2009). En eucariotas, incluidas las plantas, se realiza a través de una red de señalización compleja, que involucra actividades a nivel epigenético, regulación vía sRNAs y remodelación de la cromatina (Roy, 2016). Curiosamente, estudios recientes han indicado el papel de los microRNAs en la regulación de los niveles de mensajes endógenos de los factores de transcripción MYB. En Arabidopsis, los factores de transcripción MYB33 y MYB101 actúan como reguladores positivos de las respuestas ABA (Ácido abscísico) durante la germinación de la semilla (Reyes y Chua, 2007). Sin embargo, al germinar semillas, ABA induce la acumulación del miR159 a través de la actividad del factor de transcripción ABI3 (insensible al ácido abscísico 3). Además de ello, se encontró que los transcritos *MYB33 y MYB101* fueron escindidos por el miR159 (Reyes y Chua, 2007), por lo que ha de entenderse que tal proceso es retroalimentativo o cíclico, es decir, que se ha visto que un tipo de regulador puede tener efecto sobre otros tipos de reguladores y que éstos a su vez pueden haber sido activados o reprimidos por el primero.

En mango cv. Ataulfo se ha encontrado que algunos reguladores transcripcionales involucrados en las respuestas al estrés de las plantas como WRKY y DREB se reprimen después de que los frutos reciben el THC (Dautt-Castro *et al*., 2018). Cinco transcritos de genes *WRKY* de mango fueron regulados negativamente por el THC. Además, un transcrito de un gen *DREB* (factor de transcripción de la proteína de unión al elemento sensible a la deshidratación), que es un factor de transcripción relacionado con la temperatura, se redujo 4.8 veces en mangos que recibieron el THC. Curiosamente, se observó una represión de 4.1 veces para el factor de transcripción de estrés por calor (*HSF*) que se ha demostrado que actúa en etapas posteriores de la respuesta al estrés por calor en comparación con otros HSF (Schramm *et al*., 2008).

Los miRNA y los factores de transcripción son las familias más grandes de especies reguladoras de genes de acción *trans*, que son actores fundamentales en una red reguladora compleja. La extensa investigación que se ha realizado sobre miRNAs y factores de transcripción de las plantas, ha identificado estas moléculas reguladoras de acción *trans* como una herramienta efectiva para diseñar nuevos cultivares con rendimiento y la calidad aumentados, así como una mejora en la tolerancia al estrés abiótico de diferentes especies vegetales (Sharma *et al.,* 2020). Sin embargo, nuestro conocimiento de la red reguladora aún no es suficiente para descifrar con exactitud dichos mecanismos.

6.9. La Respuesta al THC de los Frutos de Mango cv. Ataulfo Regula la Expresión de Algunos miRNAs Cuyos mRNAs Blanco Contribuyen a la Mejora de la Tolerancia al Calor

Los patrones de expresión de los miRNAs evaluados responden a una circunstancia particular, a un tejido y a un estado de madurez específicos. Algunos miRNAs tienen patrones de expresión intrigantes, por lo que establecer una relación entre éstos y el fenotipo observado demanda la integración de las evidencias encontradas (Paul *et al*., 2020). Los transcritos blancos predominantes de los miRNAs son factores de transcripción que juegan roles importantes en la fisiología vegetal, tal como los *ARF*s (Paul *et al*., 2020) y que en conjunto con los miRNAs conducen a un fenotipo en particular. Aunque la evidencia reportada apoya la tendencia de los miRNAs evaluados a inducirse como respuesta al calor aplicado durante el THC, aún quedan preguntas sobre el papel de dicha inducción. El efecto represor de los miRNAs sobre transcritos los blancos, no se vió claramente reflejado, como era esperado. Sin embargo, tales hallazgos son útiles para explicar, a nivel molecular, los cambios fisiológicos que sufren los frutos de mango tras recibir el THC y quizá especular sobre las funciones celulares que se podrían estar regulando por tales miRNAs.

Como se ha visto, entre las diferentes funciones de los vegetales en las que se ven involucrados los miRNAs, destacan las respuestas al estrés abiótico. Los resultados de diversas investigaciones han mostrado que algunos miRNAs son potenciales candidatos para la ingeniería transgénica a la orden de la resistencia o tolerancia al estrés ambiental (Paul *et al*., 2020). La sobreexpresión impulsada por promotores inducibles por estrés abiótico, específicos de cierto tejido o etapa de desarrollo, es un enfoque poderoso para superar los efectos indeseables del estrés térmico, desde el punto de vista de calidad y productividad de las plantas (Basso *et al*., 2019). La caracterización de elementos *cis* reguladores en secuencias promotoras de genes *MIR* canónicos puede proporcionar conocimiento de los factores de transcripción asociados con las respuestas al estrés y cómo los genes *MIR* están regulados por el estrés abiótico o biótico (Basso *et al*., 2019). Con el rápido incremento de la identificación de los miRNAs que participan en la resistencia al estrés, la producción de plantas transgénicas podría ser una aproximación efectiva al mejoramiento de la productividad de las plantas bajo condiciones de estrés.

Ahora bien, es importante tener en cuenta que la respuesta al estés térmico en las plantas es producto de una serie de eventos sucesivos que terminan en un cambio observable y mensurable

(Figura 11). El primero de estos eventos es la percepción de señal a través de uno o varios receptores. Esta señal será posteriormente traducida en algún "segundo mensajero", una molécula pequeña generalmente, capaz de iniciar una cascada de señales que marquen la pauta para el inicio de la transcripción y finalmente, ocurrirá lo que hemos evaluado en este trabajo, la regulación de la expresión. Es aquí y sólo en este punto, donde junto con factores de transcripción y otros elementos *cis* regulatorios, los sRNAs (incluidos los miRNAs) estarían ejerciendo un efecto sobre la respuesta de las plantas al calor. El efecto regulatorio de los miRNAs y otras moléculas que actúan en pasos subsecuentes es fino y no siempre tiene un impacto fácilmente mensurable.

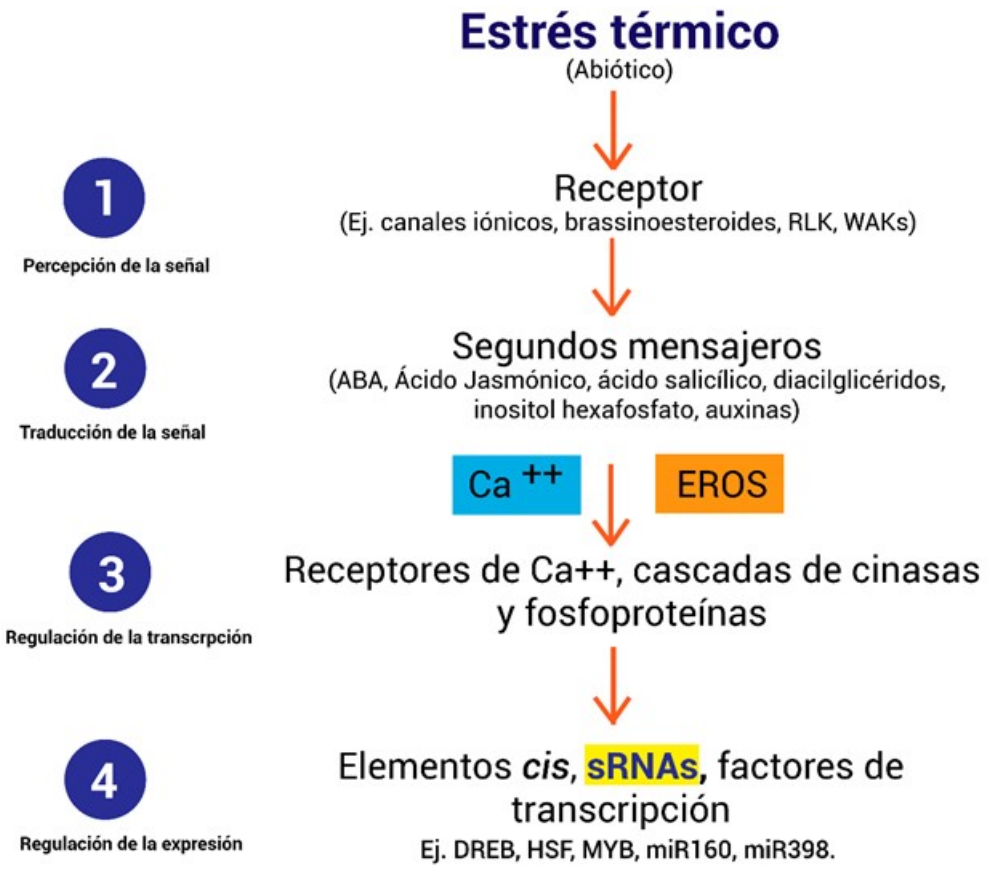

Figura 11. Rutas de Señalización involucradas en el estrés abiótico en las plantas.

7. CONCLUSIONES

La expresión de los miRNA160, miRNA169, miRNA319, miRNA393 y miRNA399 asociados a estrés por calor se estimula por el THC, durante las 24 horas posteriores al tratamiento. Los hallazgos de la presente investigación muestran resultados adicionales a los reportados previamente por nuestro grupo de trabajo, donde una vez cosechados los frutos de mango cv. Ataulfo y sometidos al THC (46.1°C, durante 75 minutos), se modifican los patrones y niveles de expresión de diversos genes, promoviendo mecanismos moleculares relacionados con la respuesta al estrés abiótico en las plantas. Además de modificar la expresión de factores de transcripción y de genes que codifican para enzimas, este estudio presenta evidencia que los miRNA160, 169, 319, 393 y 399 participan en la respuesta de los frutos de mango ante el calor. Estos miRNAs pueden actuar silenciando transcritos situados río arriba de la respuesta efectora al calor, como los factores de transcripción ARF17, NFY-3, MYB33, AFB2 e INV3, que fueron predichos a través de psRNAtarget como blancos putativos para los miRNA evaluados y cuya expresión se cuantificó a través de RT-qPCR, encontrando patrones de expresión diferencial a lo largo del tiempo evaluado. Además, a través de mFold se predijeron las estructuras secundarias de los miRNAs maduros, encontrando energías libres negativas para todos ellos en su conformación de horquilla, es decir, al presentar estructura secundaria, ésta podría tener un impacto en su función al silenciar eficaz, o ineficazmente sus blancos. En cuanto al análisis de las regiones regulatorias de los genes blanco, se encontraron elementos *cis*-regulatorios relacionados con las respuestas vegetales al estrés, a las cuales se unen factores de transcripción como AP2 / ERF, NAC, MYB, DREB, LEP y WRKY, lo cual apoya la hipótesis de la existencia de una relación entre la regulación de la expresión de tales transcritos y la respuesta de los frutos de mango al incremento de temperatura.

8. RECOMENDACIONES

Es importante corroborar la secuencia nucleotídica de los miRNAs del presente estudio, para lo cual se puede realizar la secuenciación de los sRNAs de pulpa de mango cuyas genotecas fueron preparadas en esta investigación y analizar los miRNAs expresados. Además de ello, sería interesante caracterizar mediante un estudio *in silico*, los productos de los genes blanco que son regulados por esos miRNAs; en el caso del mango, aún hay pocos estudios publicados y la genómica de este fruto ha avanzado mucho en los últimos 6 años. Por otro lado, se sabe que un miRNA particular puede regular la expresión de un grupo de genes blanco, por lo que se puede realizar la búsqueda de otros genes de la misma familia, por ejemplo, de factores de transcripción en el genoma y transcriptoma de mango, a los que se tiene acceso en el grupo de trabajo. La evaluación de la expresión de todos los miembros de una misma familia, podría ayudarnos a dilucidar de manera más completa las rutas regulatorias en las que los miRNA del mango se ven involucrados, más allá de su acción en estrés por el THC. La validación experimental a través del mapeo preciso de los sitios de escisión dirigidos por los miRNA dentro de los transcritos blanco utilizando la amplificación rápida mediada por RNA ligasa de los extremos de cDNA (RLM-RACE), sería de apoyo para confirmar o descartar los blancos predichos para cada miRNA analizado.

9. REFERENCIAS

Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C. y Harberd, N.P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. Development. 131(14):3357–3365. doi:10.1242/dev.01206

Ahsan, M. U., Hayward, A., Irihimovitch, V., Fletcher, S., Tanurdzic, M., Pocock, A., Mitter, N. (2019). Juvenility and vegetative phase transition in tropical/subtropical tree crops. Frontiers in Plant Science, 10(June). https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00729

An, N. (2018). Identification and Characterization of miRNAs in Self-Rooted and Grafted Malus Reveals Critical Networks Associated with Flowering. Int J Mol Sci. 19(8): 2384-20. doi:10.3390/ijms19082384

Aung, B., Gruber, M. Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A., y Hannoufa, A. (2015). MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement. Plant Biotechnology Journal, 13(6), 779–790. https://doi.org/10.1111/pbi.12308

Báez, R.E., Bringas, G., González, T., Mendoza, J., Ojeda, J. y Mercado, J. (2001). Comportamiento postcosecha del mango 'Tommy Atkins' tratado con agua caliente y ceras. Proc Interamer Soc Trop Hort. 44: 39-43.

Basso, M. F., Ferreira, P. C. G., Kobayashi, A. K., Harmon, F. G., Nepomuceno, A. L., Molinari, H. B. C., y Grossi-de-Sa, M. F. (2019). MicroRNAs and new biotechnological tools for its modulation and improving stress tolerance in plants. Plant Biotechnology Journal, 17(8), 1482–1500. https://doi.org/10.1111/pbi.13116

Belter, A., Gudanis, D., Rolle, K., Piwecka, M., Gdaniec, Z., Naskre¸t-Barciszewska, M. Z., y Barciszewski, J. (2014). Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC. PLoS ONE, 9(11), 1–23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113848

Bita, C. E., y Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. Frontiers in Plant Science, 4(JUL), 1–18. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273

Borges, F., y Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 16(12), 727–741. https://doi.org/10.1038/nrm4085

Bray, E.A., Bailey-Serres, J., y Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Plants (B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones, eds), American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md., EEUU. pp. 1158-1203.

Brecht, J.K., Sargent, S.A., Kader A. A., Mitcham E. J., Maul F., y Brecht P. E. (2010). Mango Postharvest Best Management Practices Manual. Brecht, J. K. (ed.), HS1185. National Mango Board and UF/IFAS, Gainesville, FL, EEUU 78 pp.

Bulgakov, V.P. y Avramenko, T.V. (2015). "New opportunities for the regulation of secondary metabolism in plants: focus on microRNAs." Biotechnol Lett. 37(9):1719-27. doi:

10.1007/s10529-015-1863-8

Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Research, 33(20). https://doi.org/10.1093/nar/gni178

Dai, X., y Zhao, P. X. (2011). PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. Nucleic Acids Research, 39(SUPPL. 2), 155–159. https://doi.org/10.1093/nar/gkr319

Dai, X., Zhuang, Z., y Zhao, P. X. (2018). PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server (2017 release). Nucleic Acids Research, 46(W1). https://doi.org/10.1093/nar/gky316

Daryanto, S., Wang, L., y Jacinthe, P. A. (2016). Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. PLoS ONE 11: e0156362. doi: 10.1371/journal.pone.0156362.

Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Muhlia-Almazán, A., Rivera-Domínguez, M., Casas-Flores, S., … Islas-Osuna, M. A. (2018). Mesocarp RNA-Seq analysis of mango (*Mangifera indica* L.) identify quarantine postharvest treatment effects on gene expression. Scientia Horticulturae 227 146–153. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.031

Du, Q., Zhao, M., Gao, W., Sun, S. y Li, W.X. (2017) microRNA/microRNA* complementarity is important for the regulation pattern of NFYA5 by miR169 under dehydration shock in Arabidopsis. Plant J. 91(1):22–33. doi:10.1111/tpj.13540

FAO Statistical Database—Agriculture. (2018). Food and Cultural Organization of the United Nations. Roma, Italia. http://www.fao.org/statistics/en/ Accesso: Junio 2020.

FAO. (2009). Food and Agriculture Organisation (FAO) of the United Nations, Declaration of the World Summit on Food Security, Roma, Italia, 16–18. www.fao.org/wsfs/world–summit/en/Accesso: Marzo 2019.

Fishman, A., Light, D., y Lamm, A. T. (2018). QsRNA-seq: A method for high-throughput profiling and quantifying small RNAs. Genome Biology, 19(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13059-018-1495-0

Flores, O., Nakayama, S., Whisnant, A.W., Javanbakht, H. y Cullen, B.R. (2013). Mutational inactivation of herpex virus 1 microRNAs identifies viral mRNA targets and reveals phenotypic effects in culture.J Virol 87: 6589–6603.

Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I. y Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. Nature genetics, 39(8), 1033-1037.

Gahlaut, V., Baranwal, V. K., & Khurana, P. (2018). miRNomes involved in imparting thermotolerance to crop plants. 3 Biotech, 8(12), 1–19. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1521-7

Gao, P., Bai, X. y Yang, L. (2011). osa-MIR393: a salinity- and alkaline stress-related microRNA gene. Mol Biol Rep. 2011;38(1):237–242. doi:10.1007/s11033-010-0100-8

German, M.A., Pillay, M., y Jeong, D.H. (2008). Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. Nature Biotechnology 26(8): 941–946. doi:10.1038/nbt1417

Giacomelli, J. I., Weigel, D., Chan, R. L., y Manavella, P. A. (2012). Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. New Phytologist, 195(4), 766–773. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04259.x

Grover A., Mittal D., Negi M., y Lavania D. (2013). Generating high temperature tolerant transgenic plants: achievements and challenges. Plant Science 205–206:38–47. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.01.005.

Guan, Q. M., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., y Zhu, J. (2013). Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. Plant J. 74(5):840-51. doi: 10.1111/tpj.12169.

Guo, Z., Kuang, Z., Wang, Y., Zhao, Y., Tao, Y., Cheng, C., … Yang, X. (2020). PmiREN: a comprehensive encyclopedia of plant miRNAs. Nucleic acids research, 48(D1), D1114–D1121. https://doi.org/10.1093/nar/gkz894

Gupta, O.P., Meena, N.L., Sharma, I. y Sharma, P. (2014). Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. Mol Biol Rep. 41(7):4623–4629. doi:10.1007/s11033-014-3333-0

Hariharan, M., Scaria, V., y Brahmachari, S. K. (2009). dbSMR: a novel resource of genome-wide SNPs affecting microRNA mediated regulation. BMC bioinformatics, 10(1), 108.

Hivrale, V., Zheng, Y., Puli, C., Jagadeeswaran, G., Gowdu, K., Kakani, V., Barakat, A. y Sunkar, R. (2015). Characterization of drought- and heat-responsive microRNAs in switchgrass. Plant Science. 242. 10.1016/j.plantsci.2015.07.018.

IPCC. (2014). Summary for policymakers. In: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of The Intergovernmental Panel on Climate Change., (1–32).

Israr, A. & Manoharan, M. y Umesh, H. & Shailendra, R. (2018). In silico identification of mi-RNAs from Mango (*Mangifera indica* L.) fruit transcriptome data. Research Journal of Biotechnology. 13. 98-104.

Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F. Y., Nyam, K. L., Norulaini, N. A. N., Mohd Omar, A. K. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. Food Chemistry, 183, 173–180. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.046

Jiang, Q., Wang, F., Li, M. Y., Tan, H. wei, Ma, J., y Xiong, A. S. (2014). High-throughput analysis of small RNAs and characterization of novel microRNAs affected by abiotic stress in a local celery cultivar. Scientia Horticulturae, 169, 36–43. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.007

Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs AND THEIR REGULATORY ROLES IN PLANTS. Annual Review of Plant Biology, 57(1), 19–53. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218

Kim, W., Ahn, H. J., Chiou, T. J., y Ahn, J. H. (2011). The role of the miR399-PHO2 module in the regulation of flowering time in response to different ambient temperatures in Arabidopsis thaliana. Molecules and Cells, 32(1), 83–88. https://doi.org/10.1007/s10059-011-1043-1

Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., Scharf, K.D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. Curr Opin Plant Biol. 10, 310–316. doi:10.1016/j.pbi.2007.04.011

Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Nuc, P., Alaba, S. y Wroblewska, Z. (2014). Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. J. Exp. Bot. 65 6123–6135. 10.1093/jxb/eru353

Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., y Bekkaoui, F. (2018). Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. Frontiers in Chemistry, 6(February), 1–14. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00026

Larkindale, J., y Vierling, E. (2008). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. Plant Physiology, 146(2), 748–761. https://doi.org/10.1104/pp.107.112060

Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W. y Yu, D. (2011). *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. Planta 233, 1237–1252. doi:10.1007/s00425-011-1375-2

Liang, C., Zhang, X., Shi, L., Hao, C., Ye, N., y Li, F. (2018). Conserved and novel heat stress-responsive microRNAs identified by deep sequencing in Pyropia yezoensis. Journal of Applied Phycology, 30(1), 685–696. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1260-x

Lin, J. S., Kuo, C. C., Yang, I. C., Tsai, W. A., Shen, Y. H., Lin, C. C., … Jeng, S. T. (2018). MicroRNA160 modulates plant development and heat shock protein gene expression to mediate heat tolerance in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science, 9(February), 1–16. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00068

Liu, J., Cheng, X., Liu, P. y Sun, J. (2017). miR156-Targeted SBP-Box Transcription Factors Interact with DWARF53 to Regulate TEOSINTE BRANCHED1 and BARREN STALK1 Expression in Bread Wheat. Plant Physiol. 174(3):1931–1948. doi:10.1104/pp.17.00445

Liu, X., Dong, X., Liu, Z., Shi, Z., Jiang, Y. y Qi M., (2016). Repression of ARF10 by microRNA160 plays an important role in the mediation of leaf water loss. Plant Mol. Biol. 92, 313–336. 10.1007/s11103-016-0514-3

Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 25, 402-408.

López-Gómez, R., y Gómez-Lim, M. A. (1992). A Method for Extracting Intact RNA from Fruits Rich in Polysaccharides using Ripe Mango Mesocarp. HortScience, 27(5), 440–442. https://doi.org/10.21273/hortsci.27.5.440

López-Virgen, A. (2019). Identificación y expresión de genes de biogénesis de RNAs pequeños en respuesta al tratamiento hidrotérmico cuarentenario en mango. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Tesis de Maestría en Ciencias. 74 pp.

Luna E.G., Arévalo G.M.L., Anaya R.S., Villegas M.A., Acosta R.M. y Leyva R.G. (2006). Calidad del mango 'Ataulfo' sometido a tratamiento hidrotérmico. Revista Fitotecnia Mexicana 29(2):123-128.

Luria, N., Sela, N., Yaari, M., Feygenberg, O., Kobiler, I., Lers, A., y Prusky, D. (2014). De-novo assembly of mango fruit peel transcriptome reveals mechanisms of mango response to hot

water treatment. BMC Genomics, 15(1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-957

Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T. y Marmiroli, N. (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. Plant Mol. Biol. 48, 667–681.doi:10.1023/A:1014826730024

Mallory, A.C., Bartel D.P. y Bartel, B. (2005). MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. Plant Cell. 17(5):1360–1375. doi:10.1105/tpc.105.031716

Mangrauthia, S.K., Bhogireddy, S., Agarwal, S. y Prasanth, V.V. (2017). Genome-wide changes in microRNA expression during short and prolonged heat stress and recovery in contrasting rice cultivars, Journal of Experimental Botany. 68 (9): 2399–2412, https://doi.org/10.1093/jxb/erx111

Meng, Y., Gou, L., Chen, D., Wu, P. y Chen, M. (2010). High-throughput degradome sequencing can be used to gain insights into microRNA precursor metabolism. J Exp Bot 61: 3833–3837

Mitcham, E.J. y McDonald, R.E. (1993). Respiration rate, internal atmosphere and ethanol and acetaldehyde accumulation in heat treated mango fruit. Postharvest Biology and Technolology 3(1):77-86.

Mitcham, E.J. y Yahia, E. (2008). Tratamientos alternativos a la inmersión de agua caliente en mango. Final report. National Mango Board. EEUU. 54 p.

Mohanpuria, P., Duhan, N., Sarao, N. K., Kaur, M., y Kaur, M. (2018). In Silico Identification and Validation of Potential microRNAs in Kinnow Mandarin (*Citrus reticulata Blanco*). Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 10(4), 762–770. https://doi.org/10.1007/s12539-017-0235-6

Molesini, B., Pii, Y., y Pandolfini, T. (2012). Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. Trends in Biotechnology, 30(2), 80–88. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.07.005

Ndlela, S., Ekesi, S., Ndegwa, P. N., Ong'amo, G. O., y Mohamed, S. A. (2017). Post-harvest disinfestation of Bactrocera dorsalis (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in mango using hot-water treatments. Journal of Applied Entomology, 141(10), 848–859. https://doi.org/10.1111/jen.12404

Ngamchuachit, P., Barrett, D. M., y Mitcham, E. J. (2014). Effects of 1-Methylcyclopropene and Hot Water Quarantine Treatment on Quality of "Keitt" Mangos. Journal of Food Science, 79(4), 505–509. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12380

Ni, Z., Hu, Z., Jiang, Q. y Zhang, H. (2013). GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. Plant Mol Biol. 82(1-2):113–129. doi:10.1007/s11103-013-0040-5

NMB, (2008). National Mango Board. EE. UU. Recuperado de https://www.mango.org/es/investigacion-y-recursos/

Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Kumar, S., Ganguli, A., y Scharf, K.D. (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? Cell Stress Chaperones. 6(3):177-89. doi: 10.1379/1466-1268

Ortiz, R.; Braun, H.J.; Crossa, J.; Crouch, J.H.; Davenport, G.; Dixon, J.; Dreisigacker, S.; Duveiller, E.; He Zhonghu; Huerta-Espino, J.; Joshi, A.K.; Kishii, M.; Kosina, K.; Manes, Y.; Mezzalama, M.; Morgounov, A.I.; Murakami, J.; Nicol, J.M.; Ortiz Ferrara, G.; Ortiz-Monasterio, I.; Payne, T.S.; Peña-Bautista, R.J.; Reynolds, M.P.; Sayre, K.D.; Sharma, R.C.; Singh, R.P.; Jiankang Wang; Warburton, M.L.; Wu Huixia; y Iwanaga, M. (2008). Wheat genetic resources enhancement by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Genet Resour Crop Evol 55, 1095–1140.

Osuna-García, J. A. (2015). Determinación del daño por tratamiento hidrotérmico cuarentenario en frutos de la variedad "Tommy Atkins producidos en México. Informe Convenio INIFAP-NMB. 25 pp.

Pan, C., Ye, L., Zheng, Y., Wang, Y., Yang, D., Liu, X., … Lu, G. (2017). Identification and expression profiling of microRNAs involved in the stigma exsertion under high-temperature stress in tomato. BMC Genomics, 18(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12864-017-4238-9

Paul, S., de la Fuente-Jiménez, J. L., Manriquez, C. G., y Sharma, A. (2020). Identification, characterization and expression analysis of passion fruit (Passiflora edulis) microRNAs. 3 Biotech, 10(1), 1–9. https://doi.org/10.1007/s13205-019-2000-5

Pegler, J., Oultram, J. M. J., Grof, C. P. L., y Eamens, A. L. (2019). DRB1, DRB2 and DRB4 are required for appropriate regulation of the microRNA399/PHOSPHATE2 expression module in arabidopsis thaliana. Plants, 8(5), 1–26. https://doi.org/10.3390/plants8050124

Petit, J.D., Bringas, T. E., González, L.A., García, R.J.M. y Báez, S.R. (2009). Efecto del tratamiento hidrotérmico sobre la ultraestructura de la cutícula del fruto de mango. Revista UDO Agrícola 9(1):96-102.

Prusky, D., Shalom, Y., Kobiler, I., Akerman, M. y Fuchs, Y. (2002). The level of quiescent infection of *Alternaria alternata* in mango fruits at harvest determines the postharvest treatment applied for the control of rots during storage. Postharvest Biol Technol. 2002, 25 (3): 339-347.

Reyes, J.L. y Chua, N.H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. Plant J. 49(4):592–606. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02980.x

Rogers, K., y Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover and mode of action of plant microRNAs. Plant Cell 25, 2383–2399. doi: 10.1105/tpc.113.113159

Sabzehzari, M., y Naghavi, M. R. (2019). Phyto-miRNA: A molecule with beneficial abilities for plant biotechnology. Gene, 683, 28–34. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.054

SAGARPA. (2017). Agrícola Nacional. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, I(1), 1–14.

Saidi, Y., Finka, A., y Goloubinoff, P. (2011). Heat perception and signalling in plants: A tortuous path to thermotolerance. New Phytologist, 190(3), 556–565. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03571.x

Schmittgen, T. D., y Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3(6), 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73

Schramm, F., Larkindale, J., y Kiehlmann, E. (2008). A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis.

Plant J. 53 (2), 264–274. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03334.x

Sheu-Gruttadauria, J., y MacRae, I. J. (2017). Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. Journal of Molecular Biology, 429(17), 2619–2639. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.07.018

Shi, X., Jiang, F., Wen, J., y Wu, Z. (2019). Overexpression of Solanum habrochaites microRNA319d (sha-miR319d) confers chilling and heat stress tolerance in tomato (S. lycopersicum). BMC Plant Biology, 19(1), 1–17. doi.org/10.1186/s12870-019-1823

Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B.D., Scheible, W.R. y Bäurle, I. (2014). Arabidopsis miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. Plant Cell. 26(4):1792–1807. doi:10.1105/tpc.114.123851

Sunkar, R. y Zhu, J.K. (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. Plant Cell. 16(8):2001–2019. doi:10.1105/tpc.104.022830

Tester, M. y Langridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. Science 327, 818–822.doi: 10.1126/science.1183700

Tiyayon, C., y Paull, R. E. (2017). Handbook of Mango Fruit. Handbook of Mango Fruit, 17–35. https://doi.org/10.1002/9781119014362

Trumbo, J.L., Zhang, B. y Stewart, C.N. Jr. (2015). Manipulating microRNAs for improved biomass and biofuels from plant feedstocks. Plant Biotechnol J 13(3):337–354. doi:10.1111/pbi.12319

U.S. Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. (2016). Plant protection and quarantine. Treatment Manual. APHIS-USDA: http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/ports/downloads/treatment.pdf

Vithana, M. D. K., Singh, Z. y Johnson, S. K. (2018). Dynamics in the concentrations of health-promoting compounds: lupeol, mangiferin and different phenolic acids during postharvest ripening of mango fruit. J Sci Food Agric 98: 1460–1468 doi:10.1002/jsfa.8614

Xin, M., Wang, Y. y Yao, Y. (2010). Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Plant Biol. 10:123. doi: 10.1186/1471-2229-10-123

Xu, Q., Chen, L., Ruan, X. et al. (2013) The draft genome of sweet orange (Citrus sinensis). Nat Genet 45, 59–66 https://doi.org/10.1038/ng.2472

Yahia, E. M., y Jones, R.W. (2011). Quarantine pests of tropical and subtropical fruits and their control. En: Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, 1: 224-287. Cambridge: Woodhead Publ Ltd. EEUU.

Yahia, E.M. (2006). Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. Stewart Postharvest Rev. 2006, 2 (5): 1-10.

Yahia, E.M. y Campos J. P. (2000). The effect of hot water treatment used for insect control on the ripening and quality of mango fruit. Acta Horticulturae 509:495-501.

Yu, X., Yang, J., y Li, X. (2013). Global analysis of cis-natural antisense transcripts and their heat-responsive nat-siRNAs in *Brassica rapa.* BMC Plant Biol. 13, 208. doi:10.1186/1471-2229-13-208. doi:/10.1186/1471-2229-13-208

Yu, Y., Jia, T., y Chen, X. (2017). Tansley review The ‘ how ’ and ‘ where ’ of plant microRNAs. 1002–1017.

Zhang, B. (2015). MicroRNA: A new target for improving plant tolerance to abiotic stress. Journal of Experimental Botany, 66(7), 1749–1761. https://doi.org/10.1093/jxb/erv013

Zhang, Q., Zhang, Y. y Wang, S. (2019). Characterization of genome-wide microRNAs and their roles in development and biotic stress in pear. Planta. 249(3):693-707. doi: 10.1007/s00425-018-3027-2

Zhang, X., Zou, Z. y Gong, P. (2011). Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. Biotechnol Lett. 33(2):403–409. doi:10.1007/s10529-010-0436-0

Zhang, X., Zou, Z. y Zhang J. (2011). Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. FEBS Lett. 585, 435–439. doi:10.1016/j.febslet.2010.12.036

Zhao, J., He, Q., Chen, G., Wang, L., y Jin, B. (2016). Regulation of non-coding RNAs in heat stress responses of plants. Frontiers in Plant Science, 7(AUG2016), 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01213

Zhao, J., Yuan, S., Zhou, M., Yuan, N., Li, Z., Hu, Q., Luo, H. (2019). Transgenic creeping bentgrass overexpressing Osa-miR393a exhibits altered plant development and improved multiple stress tolerance. Plant Biotechnology Journal, 17(1), 233–251. https://doi.org/10.1111/pbi.12960

Zhong, S. H., Liu, J. Z., Jin, H., Lin, L., Li, Q. y Chen Y. (2013). Warm temperatures induce transgenerational epigenetic release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 9171–9176. 10.1073/pnas.1219655110

Zhou, H., Li, C., Qiu, X., & Lu, S. (2019). Systematic Analysis of Alkaline/Neutral Invertase Genes Reveals the Involvement of Smi-miR399 in Regulation of *SmNINV3* and *SmNINV4* in *Salvia miltiorrhiza*. *Plants (Basel, Switzerland)*, *8*(11), 490. https://doi.org/10.3390/plants8114

Zhu, H., Hu, F. y Wang, R. (2011). Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. Cell 145: 242–256. doi:10.1016/j.cell.2011.03.024

Zhu, H., Zhang, Y., Tang, R., Qu, H., Duan, X., y Jiang, Y. (2019). Banana sRNAome and degradome identify microRNAs functioning in differential responses to temperature stress. Biochemistry and Cell Biology. BMC Genomics, 20(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12864-018-5395-1

Zinn, K. E., Tunc-Ozdemir, M., y Harper, J. F. (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. J. Exp. Bot. 61,1959–196