



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES *ARF8* E *IAA25-Like*
DURANTE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO EN DOS
GENOTIPOS DE *Vanilla planifolia* Andrews (ORCHIDACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

OLGA ANDREA HERNÁNDEZ MIRANDA



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. VICTOR MANUEL SALAZAR ROJAS
2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la educación (SEP- CONACYT), Convocatoria de investigación Científica Básica 2015, Proyecto 255952.

Para Olga, Rolando y Eduardo

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, por haberme dado todo. Por educarme con cariño, comprensión y libertad, por enseñarme lo sencilla que es la vida y que lo más importante es la felicidad; gracias por ser mis mejores amigos, porque siempre han estado ahí y me han dado la seguridad para lograr lo que me proponga, por ayudarme a encontrar mi camino, gracias por enseñarme a nunca rendirme, por los consejos, por inculcarme sus valores y filosofía de vida.

A mi hermano, por ser mi persona favorita; por contagiarme de su alegría, espontaneidad y sencillez, gracias por confiar en mí, por el apoyo y las enseñanzas más auténticas.

Agradezco a mis abuelos Jesús (†), Paula (†), Rolando y Guillermina por demostrarme que se debe trabajar duro por lo que vale la pena, por enseñarme que merezco lo mejor, por despertar en mí el amor por la naturaleza y por motivarme a dejar mi granito de arena.

A mis tías Guadalupe y Malena gracias por enseñarme el valor de la familia, por todo el apoyo, comprensión y motivación.

A las familias Hernández y Miranda muchas gracias por los consejos y palabras de aliento, gracias por su cariño incondicional y por todos los momentos amenos que hemos compartido.

Muchas gracias a mis amigos Adriana, Yaira, Alejandra, Maya y Ricardo por ser un apoyo incondicional, por todos los momentos alegres, por sus consejos, charlas filosóficas y por ser parte de mi vida. A mis amigos de la facultad muchas gracias por los momentos más felices y divertidos de la carrera; por enseñarme el significado del trabajo en equipo, gracias por el apoyo y las experiencias que compartieron conmigo.

Quiero agradecer a Claudia y Mariano por los consejos, apoyo y palabras de aliento; a Alma por su apoyo y por ayudarme a descubrir mi fortaleza.

Me gustaría agradecer a mis sinodales y profesores que han contribuido a mi formación académica, en especial al Dr. Víctor Salazar por todo el apoyo y paciencia, gracias por compartir sus conocimientos, entusiasmo y manera de pensar, muchas gracias por su tiempo, amabilidad, consejos, por confiar en mí, por su amistad y por motivarme a ser mejor.

A la Dra. Martha Martínez quiero agradecer todo el apoyo que me ha dado durante mi formación profesional, por los consejos, la confianza, enseñanzas, por su amistad y palabras de aliento.

Al Dr. Jorge Campos me gustaría agradecer su apoyo, amabilidad y paciencia; gracias por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi segundo hogar y por mi formación profesional; al Macroproyecto de investigación aplicada de Vainilla y a los productores: Sr. Miguel Ángel Acosta y Sr. Edilberto Gallegos (†) por su apoyo.

Gracias a todos los que directa o indirectamente han aportado enseñanzas a mi vida y que han contribuido a la elaboración de esta tesis.

“El amor es la fuerza más humilde, pero la más poderosa de que dispone el mundo”

-Mahatma Gandhi



“Everything else can wait, agriculture can’t”

Dr. Norman E. Borlaug



Resumen

En los últimos 10 años la producción de vainilla en México y en otros países ha disminuido debido a un problema denominado agronómicamente como “caída prematura de fruto”, el cuál esta poco estudiado en orquídeas y biológicamente es distinto al documentado en otras plantas. Dado que las auxinas tienen una participación específica en la regulación del proceso de transición de flor a fruto, y concretamente que los genes *ARF8* e *IAA25* regulan la expresión de genes relacionados con la madurez de óvulos y el desarrollo del fruto, el objetivo del presente estudio fue analizar los niveles de expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante los 45 días críticos después de la polinización (ddp), en los genotipos CH-I (tolerante a caída) y CH-VI (susceptible a caída) de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Para lo cual se diseñaron primers específicos en dominios funcionales, que se usaron para el análisis de la expresión relativa (ER) de los genes *VpARF8* y *VpIAA25* mediante PCR cuantitativo (qPCR). Los resultados muestran diferencias significativas en los niveles de transcritos de *VpARF8* entre fases de desarrollo y en el caso de *VpIAA25-like* se observaron diferencias entre genotipos. A partir del análisis multivariado de los niveles de expresión relativa de *VpARF8* y *VpIAA25-like* se identificaron dos perfiles de expresión para ambos genes y genotipos, que sugieren que en *V. planifolia* el proceso de polinización y fertilización sucede en momentos diferentes y es contrastante entre genotipos. Se destaca que el genotipo CH-VI (Susceptible), no alcanza la etapa de fertilización; por lo que el fenómeno reconocido agronómicamente como “caída prematura de fruto” en *V. planifolia*, corresponde biológicamente con la abscisión de flores no fertilizadas.

Palabras clave: *Auxinas; Caída de fruto; Síndrome Post polinización; Variación infraespecífica.*

Abreviaturas

Introducción:

AIA: Ácido indol acético (auxina).

ARF: Del inglés *Auxin Response Factor*. Gen que expresa un factor de respuesta a auxinas.

ARF: Del inglés *Auxin Response Factor*. Proteína que participa como factor de respuesta a auxinas.

ARF8: Del inglés *Auxin Response Factor eight*. Gen que expresa el factor de respuesta a auxinas número ocho.

ARF8: Del inglés *Auxin Response Factor eight*. Proteína que participa como factor de respuesta a auxinas número ocho.

Aux/IAA: Del inglés *Auxin/Indole-3-Acetic Acid*. Gen que expresa una proteína sensible a auxinas.

Aux/IAA: Del inglés *Auxin/Indole-3-Acetic Acid*. Proteína sensible a auxina.

DNA: Del inglés *deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico).

IAA25-like: Del inglés *Auxin-responsive protein 25*. Gen que expresa la proteína sensible a auxinas número 25.

IAA25-like: Del inglés *Auxin-responsive protein 25*. Proteína sensible a auxinas número 25.

Marco teórico:

ac: Del inglés *Initial archesporial cell* (célula arcoespiral).

AuxRe: Del inglés *auxin-responsive element* (Elemento de respuesta a auxina).

DA: Dominio auxiliar.

DD: Dominio de dimerización.

E: Epidermis.

fv: Del inglés *fertile valve* (válvulas fértiles).

ii: Del inglés *inner integument* (integumento interior).

mc: Del inglés *megaspore mother cell* (célula madre de la megaspora).



mi: Del inglés *micropyle* (micrópilo).

mm: Del inglés *micropylar megaspores* (megaesporas micropilares).

ne: Del inglés *nucellar epidermis* (epidermis nucelar).

O: Óvulo.

oi: Del inglés *outer integument* (integumento exterior).

P: Placenta.

PO: Primordio de óvulo.

sv: Del inglés *sterile valve* (válvulas estériles).

Materiales y método:

A p: Botón floral en anthesis polinizado.

A s/p: Botón floral en anthesis sin polinizar.

BLAST: Del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*.

BLAST KOALA: Del inglés *KEGG Orthology And Links Annotation*.

cDNA: Del inglés *deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico complementario).

CDS: Del inglés *coding sequence* (Secuencia codificante).

CH-I: Genotipo de *V. planifolia* tolerante a caída de fruto.

CH-VI: Genotipo de *V. planifolia* susceptible a caída de fruto.

ER: Expresión relativa.

KEGG: Del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

qPCR: Del inglés *quantitative polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa).

RNA: Del inglés *ribonucleic acid*. (Ácido ribonucleico).

1dap: Un día antes de la polinización.

1ddp: Un día después de la polinización.

10ddp: Diez días después de la polinización.

25ddp: 25 días después de la polinización.



45ddp: 45 días después de la polinización.

Resultados y discusión:

VpARF8: Del inglés *Auxin Response Factor eight*. Gen ortólogo en *V. planifolia* que expresa el factor de respuesta a auxinas número ocho.

VpARF8: Del inglés *Auxin Response Factor eight*. Proteína ortóloga en *V. planifolia* que participa como el factor de respuesta a auxinas número ocho.

VpIAA25-like: Del inglés *Auxin-responsive protein 25-like*. Gen ortólogo en *V. planifolia* que expresa una proteína similar a la proteína sensible a auxina número 25.

VpIAA25-like: Del inglés *Auxin-responsive protein 25-like*. Proteína ortóloga en *V. planifolia* similar a la proteína sensible a auxinas número 25.

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Modelo teórico de la fertilización en orquídeas	12
Figura 2. Modelo de actividad de las proteínas ARF8 y Aux/IAA en el control de la iniciación del fruto	15
Figura 3. Filogenia de genes <i>Aux/IAA</i> y <i>ARF</i> en <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Selaginella moellendorffii</i> y <i>Picea abies</i>	16
Figura 4. Filogenia y estructura de los genes <i>ARF</i> en plantas terrestres	17
Figura 5. Relación filogenética entre genes <i>Aux/IAA</i> canónicos	18
Figura 6. Estructura de los dominios conservados de las proteínas ARF8 y Aux/IAA	20
Figura 7. Diseño experimental con siete fases del desarrollo del ovario de los genotipos CH-I y CH-VI	27
Figura 8. Árbol filogenético del gen <i>ARF8</i> de especies pertenecientes al superorden Lilianae	28
Figura 9. Alineamiento nucleótido y traducción de los dominios de ARF8.	29
Figura 10. Árbol filogenético del gen <i>IAA25-like</i> e <i>IAA10</i> de especies pertenecientes al superorden Lilanae.	31
Figura 11. Alineamiento nucleótido y traducción de los dominios de <i>IAA25-like</i> .	32
Tabla 1. Primers específicos para <i>VpARF8</i> , <i>VpIAA25-like</i> y <i>VpACT</i> con características para qPCR.	33
Tabla 2. Medias y coeficiente de variación de la expresión relativa (ER) de los genes <i>VpARF8</i> y <i>VpIAA25-like</i> de los genotipos CH-I y CH-VI de <i>V. planifolia</i>	34
Tabla 3. Medias del nivel de expresión relativa (ER) de los genes <i>VpARF8</i> y <i>VpIAA25-like</i> , de los genotipos CH-I y CH-VI.	35
Figura 12. <i>Heat map</i> de los niveles ER de los genes <i>VpARF8</i> y <i>VpIAA25-like</i> durante siete fases del desarrollo.	37
Figura 13. Gráfica comparativa de los niveles de expresión relativa (ER) de los genes <i>VpARF8</i> y <i>VpIAA25-like</i> en los genotipos CH-I y CH-VI. Se incluyen cortes macroscópicos de ovario.	40
Figura 14. Modelo de transición de flor a fruto en <i>V. planifolia</i> .	42



	Página
1. Introducción general	
1.1 Introducción	11
2. Marco teórico	
2.1 El proceso de fertilización	13
2.2 Origen evolutivo de los genes <i>ARF</i> y <i>Aux/IAA</i>	15
2.3 El efecto de la variación intraespecífica sobre la expresión genética	20
3. Hipótesis	
3.1 Hipótesis	22
4. Objetivos	
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. Materiales y método	
5.1 Colecta del material biológico	23
5.2 Extracción de RNA _{Total}	23
5.3 Síntesis de cDNA	23
5.4 Diseño de primers	24
5.4.1 Búsqueda de secuencias	24
5.4.2 Características del diseño de primers	25
5.4.3 Construcción de árboles filogenéticos	26
5.5 qPCR	26
5.6 Análisis estadísticos	26
5.7 Análisis de conglomerados <i>Heat map</i>	27
6. Resultados y discusión	
6.1 Análisis <i>in silico</i> de la homología de secuencias de <i>ARF8</i> e <i>IAA25-like</i> para el diseño de primers en dominios específicos	28
6.2 Análisis de la expresión diferencial de los genes <i>ARF8</i> e <i>IAA25-like</i> durante la transición de flor a fruto en <i>V. planifolia</i>	34
6.2.1 Perfil de expresión de los genes <i>ARF8</i> e <i>IAA25</i> durante la transición de flor a fruto en <i>V. planifolia</i>	36
6.2.2 Modelo de expresión de los genes <i>VpARF8</i> y <i>VpIAA25-like</i> durante la transición de flor a fruto en <i>V. planifolia</i>	41
7. Conclusiones	
7.1 Conclusión general	43
7.2 Perspectivas y aplicaciones	44
8. Literatura citada	
8.1 Literatura citada	46
9. Anexos	
Anexos 1	50
Anexos 2	51
Anexos 3	52

1. Introducción general

1.1 Introducción

La fertilización es un proceso crítico en la historia de vida de todas las plantas terrestres. Define su éxito reproductivo, supervivencia y contribuye a mantener la variabilidad genética de las poblaciones (O'Neill, 1997). En algunas angiospermas como la familia Orchidaceae, dicho proceso de fertilización es muy largo y ocurre entre los 45 y 70 días después de la polinización (ddp) (Chen & Fang, 2016).

A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las angiospermas, el ovario de las orquídeas no tiene óvulos o están inmaduros en el momento de antesis, ya que evolutivamente los óvulos se desarrollan después de la polinización (Síndrome Post-polinización) como una estrategia para optimizar recursos; de manera que es el contacto del polen con el estigma, la señal que activa el mecanismo hormonal que permite el desarrollo de los óvulos de manera sincrónica a la elongación del tubo polínico hasta su fertilización (O'Neill, 1997). Dicho sistema de fertilización es altamente sensible a cambios ambientales que modifican señales hormonales (principalmente de auxinas y etileno), desincronizando el desarrollo de los óvulos y el crecimiento de los tubos polínicos, lo cual interrumpe el proceso de fertilización de la flor y provoca su abscisión (Chen & Fang, 2016; O'Neill, 1997; Pérez, Calderon & Nomura, 1998).

Se sabe que la auxina ácido indol acético (AIA) tiene un papel central en la regulación de los procesos de polinización, fertilización, inicio y maduración del fruto; encendiendo y apagando genes de respuesta a auxinas, principalmente de las familias *ARF* (*Auxin Response Factor*) y *Aux/IAA* (*Auxin/Indole-3-Acetic Acid*) (Kang et al, 2013; Kumar, Khurana & Sharma, 2014; Pandolfini, Molesini & Spena, 2007).

Hasta el momento se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) y *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) que la regulación transcripcional del metabolismo de auxinas durante las primeras etapas del desarrollo del fruto, esta mediada por la heterodimerización de las proteínas sintetizadas por genes *ARF* y *Aux/IAA* (Goetz et al., 2007; Pandolfini et al., 2007).

Específicamente, se ha definido que ARF8 e IAA25 pueden estimular la expresión temprana de genes relacionados con la madurez de óvulos y el desarrollo del fruto (Goetz



et al., 2007; Pomares-Viciano, Die, Del Río-Celestino, Román & Gómez, 2017; Wu et al., 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la expresión del gen *ARF8* puede variar entre cultivares de *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) y *Musa acuminata* (Musaceae) (Hu et al., 2015; Pomares-Viciano et al., 2017).

Cabe resaltar que la mayor parte de la información se concentra en organismos modelo como *A. thaliana* y se plantea que los mecanismos de regulación de auxinas durante el desarrollo del fruto pueden ser distintos en otros grupos taxonómicos como la familia Orchidaceae (Ljung, 2013; Pattison, Csukasi & Catalá, 2014); en la cual se conoce parcialmente el proceso de transición de flor a fruto y no se conoce el papel de los genes *ARF8* e *IAA25* durante dicho proceso.

En orquídeas con interés comercial como *Vanilla planifolia* Andrews (Orchidaceae), que además es fuente de ingreso para numerosas comunidades rurales e indígenas del trópico mexicano, se ha observado que en los últimos 10 años, la producción ha disminuido hasta en 80% por un fenómeno reconocido inicialmente como “caída prematura de fruto” el cual se presenta entre los 45 y 55 ddp (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural [SAGARPA], 2013; Soto-Arenas, 2006).

Hasta el momento se desconocen las causas de dicho fenómeno; sin embargo, datos preliminares sugieren que puede estar vinculado con modificaciones al metabolismo de auxinas como respuesta a variaciones ambientales (Liu et al., 2010; Salazar-Rojas et al., 2016). Por otra parte, se ha observado, que existe una respuesta diferencial a la “caída prematura”, entre genotipos, concretamente se ha observado que el genotipo CH-I es un material tolerante, mientras que el genotipo CH-VI es más susceptible a la caída prematura (Salazar-Rojas et al., 2016).

Dicho lo anterior y dado que no se conocen con detalle los genes específicos, su comportamiento a lo largo del proceso de transición de flor a fruto en vainilla y que este conocimiento podría contribuir a comprender la problemática de producción que presenta *V. planifolia*; se planteó como objetivo, analizar los niveles de expresión de los genes *ARF8* e *IAA25-like* durante la transición de flor a fruto en dos genotipos de *V. planifolia*.

2. Marco teórico

2.1 El proceso de fertilización

La transición de flor a fruto en la familia Orchidaceae se caracteriza por ser un proceso largo en el que la polinización es la señal que activa el desarrollo de los óvulos hasta la fertilización por lo cual la polinización y la fertilización ocurren en momentos distintos del desarrollo de la planta (Mayer, Carmello-Guerreiro & Appezzato-da-Glória, 2011; O'Neill, 1997).

Durante la antesis, el ovario presenta una región de placenta con válvulas estériles, no presenta óvulos desarrollados, solo pequeñas proyecciones compuestas por células con citoplasma denso; una vez que ocurre la polinización, la placenta comienza a proliferar y germinan los granos de polen (Mayer et al., 2011). Posterior a la polinización, entre 1-5ddp, los tubos polínicos comienzan a crecer, en la placenta se forman proyecciones y en el óvulo, la célula terminal subdémica se diferencia en una célula arcospiral con un núcleo evidente. Posteriormente las divisiones celulares de la capa dérmica conducen a la formación de los integumentos y la curvatura del óvulo. Hacia los 25ddp la célula arcospiral se convierte en una célula madre de la megaspora y el ovario sigue engrosándose, hacia los 45ddp ocurre la diferenciación de los óvulos, posteriormente ocurre la fertilización y la degradación de los tubos polínicos (Fig. 1) (Mayer et al., 2011).

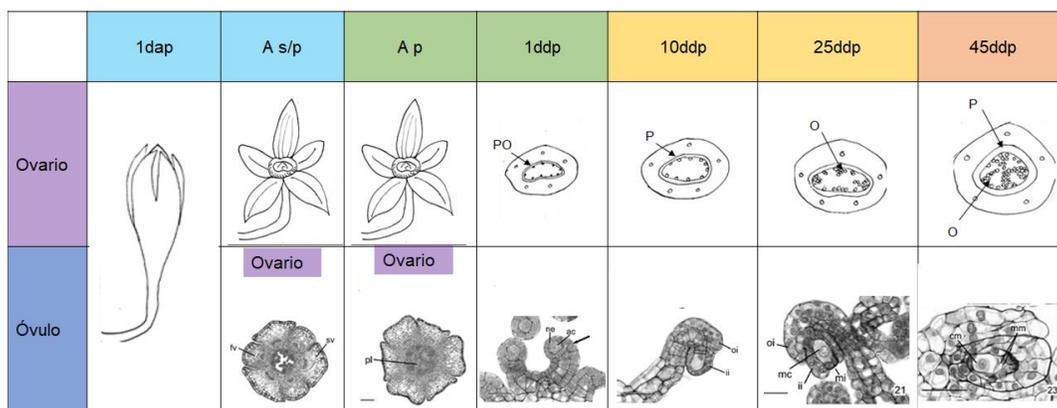


Figura 1. Modelo teórico de la fertilización en orquídeas, donde se muestran siete fases del desarrollo: Botón floral un día antes de la polinización (1dap), flor en antesis sin polinizar (A s/p), flor en antesis polinizada (A p), ovario un día después de la polinización (1ddp), diez días después de la polinización (10ddp), 25 días después de la polinización (25ddp) y 45 días después de la



polinización (45ddp). Donde en el óvulo se muestran válvulas fértiles (fv), válvulas estériles (sv), placenta (pl), epidermis nucelar (ne), célula arcoespiral (ac), integumento interior (ii), integumento exterior (oi), célula madre de la megaspora (mc), micrópilo (mi), megasporas micropilares (mm) En el ovario se muestran primordios de óvulo (PO), la placenta (P), y óvulos formados (O) (Mayer et al., 2011).

A nivel molecular se ha descrito que cuando ocurre la polinización, se desencadena una serie de señales hormonales inducidas por el AIA proveniente del polen, dichas señales ocurren de manera simultánea en el estigma y el ovario (O'Neill, 1997). En la parte del estigma, la explicación se concentra principalmente en el metabolismo de etileno (O'Neill, Nadeau, Zhang, Bui & Halevy, 1993; Ozga & Reinecke, 2003; Zhang & O'Neill, 1993), mientras que en el tejido del ovario, se han descrito varios genes relacionados con biosíntesis, señalización, transporte y degradación de auxinas, que participan en la coordinación del desarrollo de los óvulos antes de la fertilización (Domingos, Fino, Paulo, Oliveira & Goulao, 2016; Kang et al., 2013; Pattison et al., 2014). Particularmente se sabe que las familias mutagénicas *ARF* y *Aux/IAA* son clave en la regulación del encendido y apagado de genes blanco de auxinas en distintos procesos del desarrollo de las plantas (Leyser, 2018). Concretamente se ha relacionado a los genes *ARF8* e *IAA25* con la inducción del desarrollo de óvulos y frutos en *A. thaliana* (Pandolfini et al., 2007), *C. pepo* (Pomares-Viciano et al., 2017) y *S. lycopersicum* (Wu et al., 2012).

Por lo cual, se ha planteado un modelo que explica el mecanismo molecular donde intervienen estos genes durante la polinización (Goetz, Vivian-Smith, Johnson & Koltunow, 2006; Goetz et al., 2007; Pomares-Viciano et al., 2017; Wu et al., 2012).

Dicho modelo considera que antes de la polinización, la baja concentración de auxinas en el tejido incrementa la expresión de los genes *ARF8* e *IAA25*; por lo cual ocurre la heterodimerización de las proteínas *ARF8* e *IAA25*; debido a esto, *ARF8* no puede participar como factor de transcripción de genes de inducción y crecimiento del fruto (Fig. 2) (Audran-Delalande et al., 2012; Bassa et al., 2012a; Goetz et al., 2007).

Una vez que ocurre la polinización, las auxinas provenientes del polen llegan al tejido y los niveles de expresión de *ARF8* e *IAA25* descienden, ya que el gen *ARF8* participa como regulador negativo del inicio del fruto; entonces el receptor TIR1/AFB transporta a la proteína *IAA25* al proteosoma para su degradación. De esta manera *ARF8* queda libre para encender genes de inducción y desarrollo del fruto (Goetz et al., 2006 y 2007; Pandolfini et al., 2007; Pomares-Viciano et al., 2017; Wu et al., 2012) (Fig. 2).



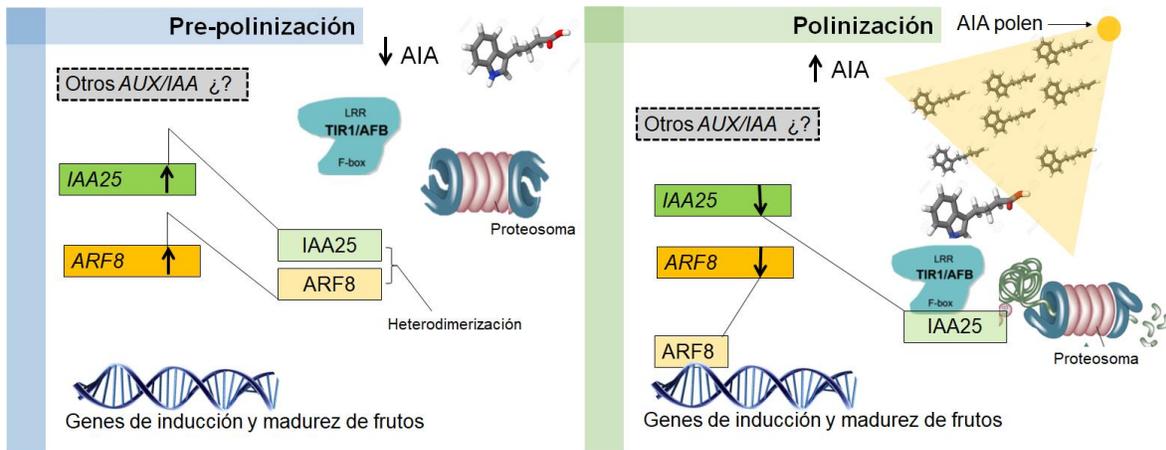


Figura 2. Modelo de actividad de las proteínas ARF8 e IAA25 en el control de la iniciación del fruto, basado en el modelo de Goetz et al. (2007). Donde Los niveles altos de ER de los genes *ARF8* e *IAA25* sugieren la retención de la proteína ARF8 por heterodimerización, la cual evita el encendido de genes de inducción de frutos. Por otro lado, Los niveles bajos de ER de los genes *ARF8* e *IAA25* sugieren la liberación de la proteína ARF8 y el encendido de genes de inducción de óvulos y frutos.

2.2 Origen evolutivo de los genes *ARF* y *Aux/IAA*

Las familias mutagénicas *ARF* y *Aux/IAA* están estrechamente relacionadas debido a que los genes *Aux/IAA* se originaron de un gen *ARF* ancestral proveniente de algas que quedó truncado y perdió su dominio B3 en la traducción (Fig. 3) (Mutte et al., 2018; Wu et al., 2017). Una evidencia de esto es que existe una clase de genes *Aux/IAA* que provienen directamente de genes *ARF* truncados (Fig. 3) (Wu et al., 2017).

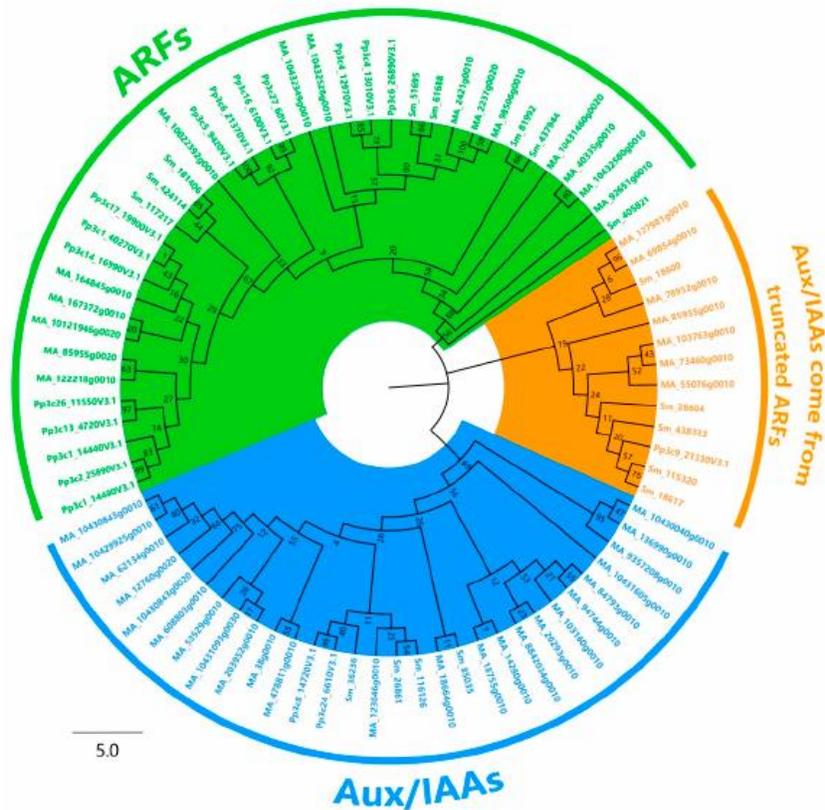


Figura 3. Filogenia de genes *Aux/IAA* y *ARF* en *Physcomitrella patens* (Funariaceae), *Selaginella moellendorffii* (Selaginellaceae) y *Picea abies* (Pinaceae). Se resaltan en verde los clados pertenecientes a secuencias de genes *ARF*, en azul los pertenecientes a *Aux/IAA* y en naranja las secuencias de genes *Aux/IAA* provenientes de secuencias de *ARF* truncados. Árbol propuesto por Wu et al. (2017).

Además, no se han encontrado secuencias de genes *Aux/IAA* en algas, por lo que se ha propuesto que el surgimiento de la familia *Aux/IAA* fue una innovación evolutiva de las plantas terrestres (Wu et al., 2017). A partir de esto, los principales loci de *ARF* y *Aux/IAA* se desarrollaron por eventos de duplicación cromosómica (Finet, Berne-Dedieu, Scutt & Marlétaz, 2012). Esto favoreció la formación de genes parálogos con cambios de bases que generaron diferencias en la organización y función de los dominios proteicos relacionados con la señalización del metabolismo de auxinas; lo que ha favorecido la evolución y diversificación de las plantas terrestres (Fig. 4) (De Smet et al., 2011; Finet et al., 2012; Remington, Vision, Guilfoyle, & Reed, 2004).

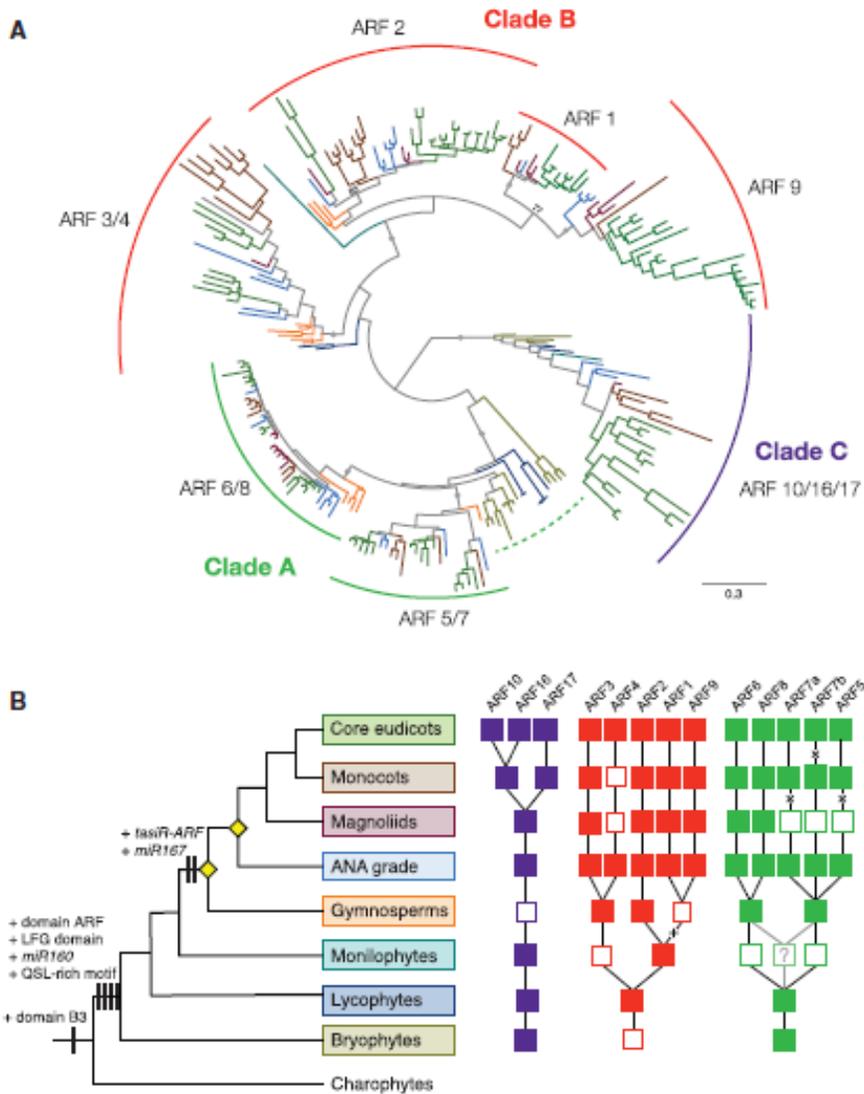


Figura 4. Filogenia y estructura de los genes *ARF* en plantas terrestres. A) Filograma de los análisis de 224 taxones con dominios funcionales. B) Origen evolutivo de dominios funcionales de *ARF*. Los cuadros rellenos indican la presencia de datos genómicos, los cuadrados abiertos indican falta de datos, las líneas punteadas indican hipótesis alternativas y los diamantes amarillos indican un evento de duplicación del genoma completo. Propuesto por Finet et al. (2012).

Concretamente, se ha relacionado al gen *ARF8* con el surgimiento de las plantas con flor ya que se encontró un patrón de duplicación que coincide con el surgimiento y evolución del desarrollo floral, el cual se diversificó durante la radiación adaptativa de las angiospermas (Fig. 4) ya que *ARF8* ha tenido un papel central en funciones reproductivas como la polinización, fertilización y formación del fruto durante la evolución de estas plantas (Finet et al., 2012; Pandolfini et al., 2007).

Por otro lado, se conoce muy poco acerca del papel evolutivo y funcional de la familia multigénica *Aux/IAA* ya que presenta redundancias funcionales con los distintos *ARF* dependiendo de la concentración de auxinas en el tejido y etapa de desarrollo (Winkler et al., 2017; Wu et al., 2017). Además, existe dificultad para clasificar los genes *Aux/IAA* debido a la baja cantidad de información sobre estas secuencias en muchos grupos taxonómicos y que se han encontrado genes truncados de los cuales no se conoce su función (Wu et al., 2017); sin embargo, es importante mencionar que el gen *IAA25* descrito en *S. lycopersicum* tiene implicaciones importantes en la formación del fruto y se ha relacionado filogenéticamente con genes del clado E (Fig. 5); como es el caso del gen *IAA27* de *Oryza sativa* (Poaceae) que produce una proteína capaz de regular la polinización mediante la formación de heterodímeros con ARF debido a sus dominios funcionales (Bassa et al., 2012a y 2012b; Jain et al., 2006; Li, Xie, Hu & Zhang, 2016; Wu et al. 2012; Wu et al., 2017).

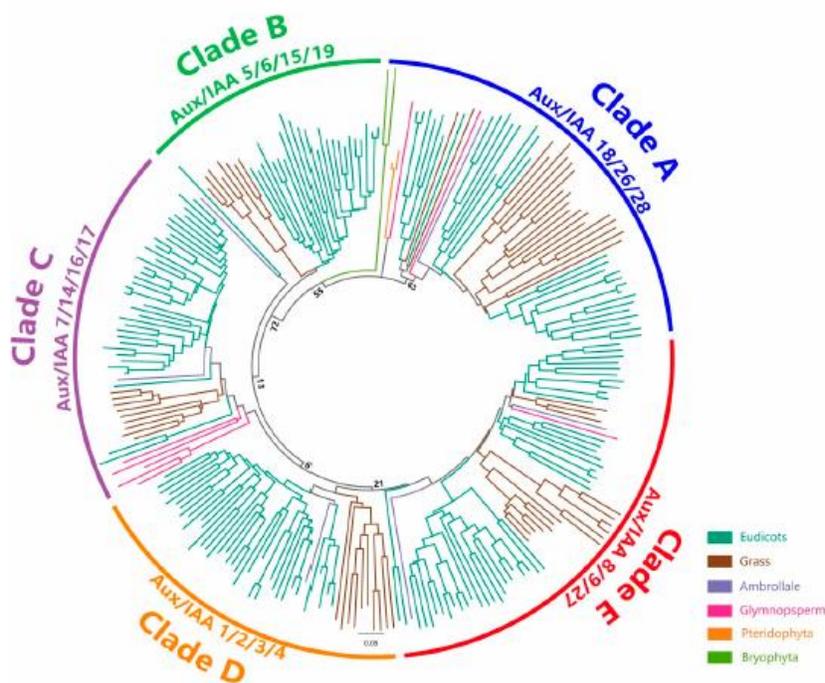


Figura 5. Relación filogenética entre genes *Aux/IAA* canónicos. Los genes derivados de diferentes categorías se agruparon en distintos clados. Árbol propuesto por Wu et al. (2017).

Estructuralmente en ARF8, se distinguen tres dominios funcionales en la proteína:

Un dominio amino-terminal tipo B3 que sirve para la unión a DNA en la región TGTCTC/GAGACA del AuxRe del gen blanco de auxinas. Recientemente se ha descrito



que existen cuatro dominios asociados al dominio amino-terminal, dos dominios de dimerización (DD) y dos dominios auxiliares (DA) de los cuales no se conoce su función (Fig. 6) (Li et al, 2016).

El segundo es una región variable que funciona como dominio activador de la transcripción ya que presenta una región rica en Glu/Ser/Leu (Fig. 6) (Garay-Arroyo, Sánchez, García-Ponce, Álvarez-Buylla, 2014).

Finalmente existe una región que comprende a los dominios III y IV que forman una dimerización carboxilo-terminal involucrada en la interacción proteína-proteína con otros ARF o con miembros de la familia Aux/IAA (Fig. 6) (Garay-Arroyo et al., 2014; Li et al., 2016; Tiwari, Hagen, & Guilfoyle, 2003).

En cuanto a la estructura de la familia Aux/IAA se reconocen cuatro dominios:

El dominio I, que es el menos conservado, presenta un extremo amino terminal para el reclutamiento de co-represores transcripcionales; por lo tanto, tiene un papel represor (Fig. 6) (Garay-Arroyo et al., 2014).

El dominio II, que es necesario para la asociación TIR1-Aux/IAA, resulta importante para la degradación mediada por el proteosoma; por lo tanto, es altamente conservado (Fig. 6) (Garay-Arroyo et al., 2014).

Finalmente los dominios III y IV median la dimerización entre otras proteínas Aux/IAA y ARF por lo que son específicos de cada proteína (Fig. 6) (Garay-Arroyo et al., 2014; Hagen & Guilfoyle, 2002; Reed, 2001).

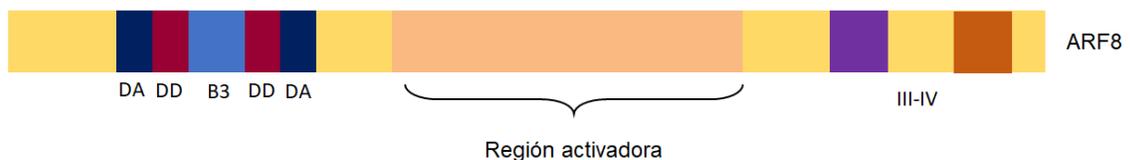


Figura 6. Estructura de los dominios conservados de las proteínas ARF8 y Aux/IAA:

En las proteínas ARF se muestra un dominio B3 con sus respectivos dominios auxiliar (DA) y de dimerización (DD); posteriormente la región variable, seguida por los dominios III y IV.

En Aux/IAA se observa los dominios I, el dominio II; seguido por los dominios III y IV (Finet, Berne-Dedieu, Scutt, & Marlétaz, 2012; Garay-Arroyo et al., 2014; Reed, 2001; Tiwari et al., 2003).

A pesar de que se conoce que ARF8 y proteínas Aux/IAA han tenido un papel evolutivo importante en la formación del fruto de las angiospermas; y que el proceso de fertilización es diferente en la familia Orchidaceae, donde los óvulos se desarrollan después de la polinización (O'Neill, 1997); no existe información sobre la identidad y la función de los genes *ARF8* e *IAA25-like* asociados con la transición de flor a fruto en orquídeas y particularmente en *V. planifolia*.

2.3 El efecto de la variación infraespecífica sobre la expresión genética

Se ha observado que uno de los efectos más evidentes del cambio climático en las orquídeas, incluida *V. planifolia*, es la modificación de la fenología reproductiva de las poblaciones (Liu et al., 2010; Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural [SAGARPA], 2013; Soto-Arenas, 2006). Sin embargo, los factores ambientales no tienen el mismo efecto en todos los individuos de una especie, por lo cual, la variación infraespecífica que integra un linaje, expresa diferencias en las respuestas adaptativas entre genotipos o subpoblaciones (Des Roches et al., 2017). En este sentido, el estudio de la variación infraespecífica de tipo funcional, aporta información ecológicamente importante sobre la relación de los fenotipos asociados con patrones de crecimiento, fenología y fisiología que son reflejo de variaciones en la regulación y expresión diferencial de genes entre diferentes genotipos (Des Roches et al., 2017; Mimura et al., 2016).

En el caso concreto del gen *ARF8*, se ha identificado variación en los niveles de ER en tres genotipos de *C. pepo* durante la polinización; por lo cual se observó que en cada genotipo, opera un mecanismo de regulación distinto para la formación de fruto (Pomares-Viciano et al., 2017).

También se ha descrito que *ARF8* tiene una expresión distinta durante la formación del fruto, según el genotipo de *M. acuminata*. Se observaron niveles altos de ER de este gen, en genotipos de alta calidad de producción y valores bajos en genotipos resistente al estrés abiótico (temperatura, salinidad y sequía) (Hu et al., 2015).

Por otro lado, se sugiere que la variación en los niveles de ER de *ARF8* también está influenciada por las fases del desarrollo del tejido. Particularmente se han identificado niveles altos de expresión de *ARF8* durante la antesis de la flor y niveles bajos de expresión durante el desarrollo del fruto de dos genotipos de *M. acuminata* (Hu et al., 2015).

En el caso de *IAA25*, también se ha identificado un efecto de la fase de desarrollo del fruto sobre la expresión de dicho gen en *S. lycopersicum*. Particularmente se observó que su nivel de expresión disminuye durante la formación del fruto (Wu et al., 2012).

Debido a esto se ha sugerido que el comportamiento a lo largo del tiempo de los genes *ARF8* e *IAA25* es determinante en el mecanismo de formación del fruto (Hu et al., 2015; Wu et al., 2012).

Recientemente se ha planteado que en *V. planifolia* existe una respuesta diferencial a la “caída prematura”, entre genotipos cultivados, concretamente se ha observado que el genotipo CH-I es un material tolerante, mientras que el genotipo CH-VI es susceptible a la caída de frutos, dicha respuesta se ha atribuido a un patrón diferencial en la expresión de genes de la ruta metabólica de auxinas (Salazar-Rojas et al., 2017); por lo que se propone que podrían existir diferencias en los niveles de expresión relativa de los genes *ARF8* e *IAA25-like* determinadas por el genotipo (CH-I y CH-VI) y la fase del desarrollo del fruto de *V. planifolia*. Por esta razón se propone utilizar la PCR cuantitativa (qPCR) como estrategia para monitorear la variación infraespecífica funcional, ya que permite analizar niveles de expresión de genes específicos que tienen un papel central en rasgos funcionales (Mimura et al., 2016).

3. Hipótesis

3.1 Existen diferencias en los niveles de expresión relativa de los genes *ARF8* e *IAA25-like* determinadas por el genotipo (CH-I y CH-VI) y la fase del desarrollo del fruto en *Vanilla planifolia*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Analizar los niveles de expresión de los genes *ARF8* e *IAA25-like* durante la transición de flor a fruto en dos genotipos de *Vanilla planifolia*.

4.2 Objetivos particulares

- Analizar *in silico* la homología de secuencias de *ARF8* e *IAA25-like* para el diseño de primers en dominios específicos para *Vanilla planifolia*.
- Comparar los niveles de expresión entre genotipos, de los genes *ARF8* e *IAA25-like* durante los 45 días después de la polinización de la flor mediante qPCR.
- Describir el perfil de expresión de los genes *ARF8* e *IAA25-like* durante los 45 días después de la polinización de la flor mediante qPCR.

5. Materiales y método

5.1 Colecta del material biológico

Se colectaron flores de dos genotipos de *V. planifolia*: El genotipo tolerante (CH-I), el cual fue colectado en el municipio de Pantepec, perteneciente al estado de Puebla y el genotipo susceptible a caída (CH-VI), colectado en el Municipio de San Rafael, perteneciente al estado de Veracruz. El material biológico se almacenó en la solución de preservación RNA*later*[®] (SIGMA) y N₂ líquido como conservadores del material biológico.

5.2 Extracción de RNA_{Total}

Se disectó el gineceo y se trituró con N₂ líquido para evitar la degradación del material biológico. Posteriormente se realizó la extracción de RNA_{Total}, con TRIZOL Reagent[®] siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1).

Al RNA obtenido se le realizó un tratamiento con DNasa I, para eliminar remanentes de DNA genómico: Se precipitó el RNA en 20µl de acetato de sodio 3M y 60µl de etanol frío al 100% durante 12 h a -80°C, posteriormente se removió el etanol y se resuspendió la pastilla en 20µl de agua libre de nucleasas. Finalmente se verificó la integridad del RNA_{Total} mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo 2).

5.3 Síntesis de cDNA

Las muestras de RNA_{Total} se mantuvieron en hielo. La reacción de síntesis de cDNA se realizó con la enzima SuperScript[™] III Reverse Transcriptase de Invitrogen[®] y oligodT, en un termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler con un ciclo inicial de 42° durante 60 minutos, 70°C por 10 min (Anexo 3).

5.4 Diseño de primers

5.4.1 Búsqueda de secuencias

Gen ARF8: Se descargó la secuencia CDS del gen *ARF8* de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (AT5G37020.1) (Goodstein et al., 2011). Dicha secuencia se mapeo con un transcriptoma de *V. planifolia* (Publicación en preparación) en el programa Geneious® versión 9.0.4.

Posteriormente se tomaron fragmentos de la secuencia consenso y se utilizaron a manera de sonda para buscar un *contig* ensamblado del transcriptoma de *V. planifolia*.

La secuencia del *contig* se ingresó en la base de datos de nucleótidos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) para realizar una búsqueda sobre la ontología del gen mediante la herramienta BLAST (Benson et al., 2008).

A partir de los resultados obtenidos en BLAST, se descargaron secuencias CDS del gen *ARF8* con las siguientes claves de acceso: *Asparagus officinalis* (Asparagaceae) (XM_020292188.1), *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) (XM_020844939.1), *Zea mays* (Poaceae) (XM_008663932.2), *Elaeis guineensis* (Arecaceae) (XM_010909924.2), *Illicium parviflorum* (Schisandraceae) (FN433177.1), *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (AT5G37020.1) y *Cabomba aquatica* (Cabombaceae) (FN433174.1) (Benson, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell & Wheeler 2008).

También se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos Phytozome de la cual se descargaron las secuencias CDS del gen *ARF8*: *Panicum virgatum* (Poaceae) (Pavir. Ga00205.1), *Setaria itálica* (Poaceae) (Seteria.3G020000.1), *Musa acuminata* (Musaceae) (GSMUA_Achr4T25960_001) y *Ananas comosus* (Bromeliaceae) (Aco011886.1) (Goodstein et al., 2011).

Gen IAA25: A partir de un transcriptoma de referencia de *V. planifolia* (Publicación en preparación), se seleccionaron *contigs* involucrados en la ruta metabólica de auxinas mediante la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa & Goto, 2000). Dichos *contigs* se analizaron mediante la herramienta BLAST KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation) y se consideraron las coincidencias de las secuencias de *V. planifolia* con el gen *IAA25-like* de *Ananas comosus* (Bromeliaceae) (Aco003342.1) y con *IAA10* de *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) (Araha.3365s0019.1) (Goodstein et al., 2011).



Las secuencias previamente identificadas se sometieron a una segunda búsqueda BLAST en la base de datos de nucleótidos de NCBI, Phytozome y en la base de datos especializada en la familia Orchidaceae *Orchidstra 2.0*.

A partir de las coincidencias obtenidas de la búsqueda BLAST, se seleccionaron las siguientes accesiones del gen *IAA25-like*:

XM_010913523.2 de *Elaeis guineensis* (Arecaceae) y *Anthurium amnicola* (Araceae) (GDJX01024158.1) (Benson et al., 2008). *Apostasia wallichii*: AUTC010604, *Orchis itálica*: OITC018615, *Cymbidium ensifolium*: CETC015813, *Phalaenopsis aphrodite*: PATC150223, *Phalaenopsis bellina*: PBTC020065, *Phalaenopsis lueddemanniana*: PLTC006303, *Phalaenopsis modesta*: PMTC021387, *Cypripedium formosanum*: CFTC015517 y *Vanilla planifolia*: VPTC014163 (Chao, Yen, Yeh, Chen, & Shih, 2017). *Brachypodium distachyon* (Poaceae) (Bradi3g13370.3), *Musa acuminata* (Musaceae) (GSMUA_Achr7T03120_001), *Oryza sativa* (Poaceae) (LOC_Os08g01780.1) (Goodstein et al., 2011).

Finalmente, se descargó la secuencia CDS del gen actina de *V. planifolia* (KF513175.1) (Benson et al., 2008).

Los criterios de elección para las secuencias fueron: Relación de ancestría común, particularmente que pertenecieran al superorden Lillanae. Además, una identidad y cobertura del 80% de coincidencia.

5.4.2 Características de los primers

Los primers se diseñaron con el programa Geneious 9[®] versión 9.0.4 en los dominios funcionales de cada gen, que fueron localizados a partir de la traducción de las secuencias descargadas y su comparación con los dominios de la proteína ARF8 anotados en la base de datos Uniprot (UniProt Consortium, 2014).

Las condiciones para el diseño de primers fueron una longitud de 21pb, Tm de 60°C, 50% de GC y un producto de amplificación de 80-120 bases.

Posteriormente se ingresaron distintas propuestas de primers en la página IDT OligoAnalyzer 3.1 para verificar que no se formaran homodímeros y heterodímeros (Owczarzy et al., 2008).

5.4.3 Construcción de árboles filogenéticos

Se eligió el modelo de sustitución JC69 a partir del programa jModelTest. Se realizó un análisis bayesiano en los programas Geneious 9[®] versión 9.0.4. y BEAST. Se utilizaron como grupos externos a *Illicium parviflorum* y *Anthurium amnicola* para ARF8 e IAA25 respectivamente.

5.5 qPCR

La reacción de qPCR se realizó por triplicado mediante el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix ajustado a 10µl con 1µl de cDNA por reacción, en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR System con el siguiente programa: Ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos.

La expresión se calculó de acuerdo con $E = Peff (-\Delta Ct)$ (Pfaffl, 2004), donde Peff es la primera eficiencia calculada utilizando el programa LinRegPCR v3.0.0. Los niveles de expresión se indican como expresión relativa (ER) comparados con el gen constitutivo (*House keeping*) de la proteína actina.

5.6 Análisis estadísticos

Se consideró a las fases del desarrollo del fruto (siete fases) y el genotipo (dos genotipos) como fuentes de variación (Fig. 4). En las fases se analizaron siete momentos de desarrollo: el botón floral previo a la antesis (1dap), la antesis en dos condiciones, sin polinizar (A s/p) y polinizada (A p), también la flor un día después de ser polinizada (1 ddp), 10 días después (10 ddp), 25 días después (25 ddp) y 45 días después de ser polinizada (45 ddp). Las fases se basaron en el periodo crítico de desarrollo del fruto en *V. planifolia*. Los datos para cada factor fueron analizados mediante un modelo equivalente a un diseño de dos factores en completamente al azar balanceado (Littell, Stroup & Freund, 2002). La comparación de medias entre genotipos, tiempos y la interacción genotipo por tiempo, se realizó mediante una prueba de Tukey (Littell et al., 2002).

G	1dap	A s/p	A p	1ddp	10ddp	25ddp	45ddp
CH-I							
CH-VI							

Figura 7. Diseño experimental con siete fases del desarrollo del ovario de los genotipos CH-I y CH-VI: un día antes de la polinización (1dap), antesis sin polinizar (A s/p), antesis polinizada (A p), un día después de la polinización (1ddp), diez días después de la polinización (10ddp), 25 días después de la polinización (25ddp) y 45 días después de la polinización (45ddp) Salazar-Rojas (Comunicación directa) y Sandoval et al. (Comunicación directa).

5.7 Análisis de conglomerados *Heat map*

Se realizó un análisis de conglomerados tipo *Heat map*, para conocer el perfil global de expresión relativa de los genes *ARF8* e *IAA25-like*, en las siete fases del desarrollo y en dos genotipos (CH-I y CH-VI). Se trabajó en línea con la aplicación Heatmapper/Expression Heat Map mediante el método de medición de distancias euclidianas como medida de distancia y método de agrupamiento de enlace promedio (Babicki et al., 2017).

6. Resultados y discusión

6.1 Análisis *in silico* de la homología de secuencias de *ARF8* e *IAA25-like* para el diseño de primers en dominios específicos

A partir de la revisión sobre las relaciones filogenéticas de las secuencias del gen *ARF8* dentro del superorden Liliae, se identificó mediante inferencia bayesiana que la mayor relación de la secuencia del *contig* de *V. planifolia* (*VpARF8*) corresponde al clado del orden Asparagales, donde se observa un nivel de identidad de secuencias de 65-72% (Fig. 8). Se identificó un segundo nivel de identidad entre secuencias con un rango entre 66-68% correspondiente a los órdenes Poales, Zingiberales y Arecales (Fig. 8).

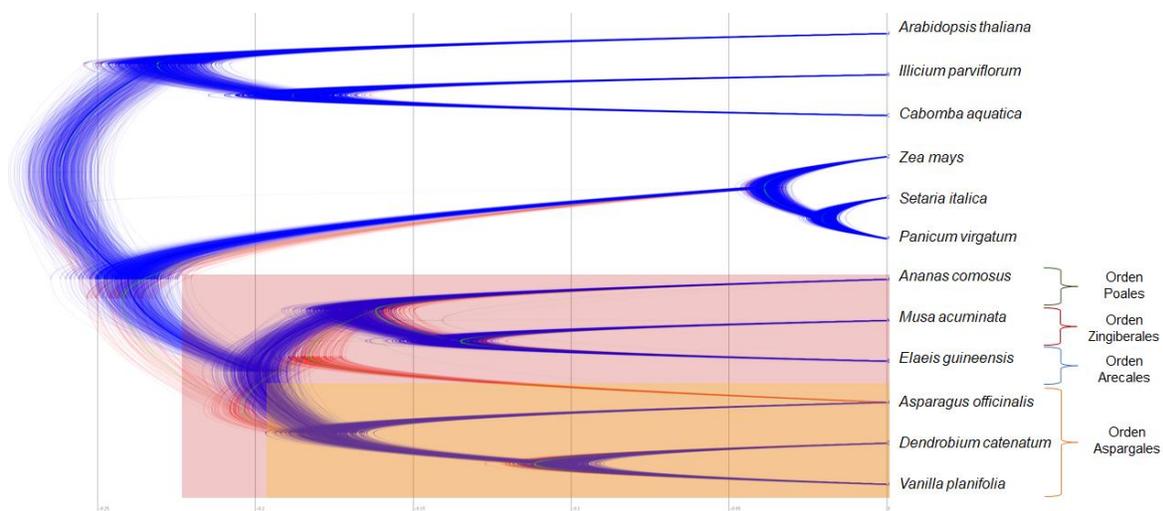


Figura 8. Árbol filogenético del gen *ARF8* de especies pertenecientes al superorden Liliae. Realizado con el modelo de sustitución JC69.

El análisis bayesiano sugiere que la traducción de *VpARF8* es homóloga a la proteína *ARF8* dado que es posible reconocer relaciones de ancestría en la secuencia que explican altos niveles de similitud en los dominios funcionales (Fig. 9) (Pearson, 2013). Particularmente el dominio III-IV está altamente conservado entre clados (Fig. 9-B). Dicho dominio es exclusivo de *ARF8* y le confiere la capacidad de formar heterodímeros con las proteínas Aux/IAA, por lo que se consideró como la región óptima para el diseño de primers específicos para el análisis cuantitativo de expresión diferencial (Li et al., 2016).

A)

Dominio B3

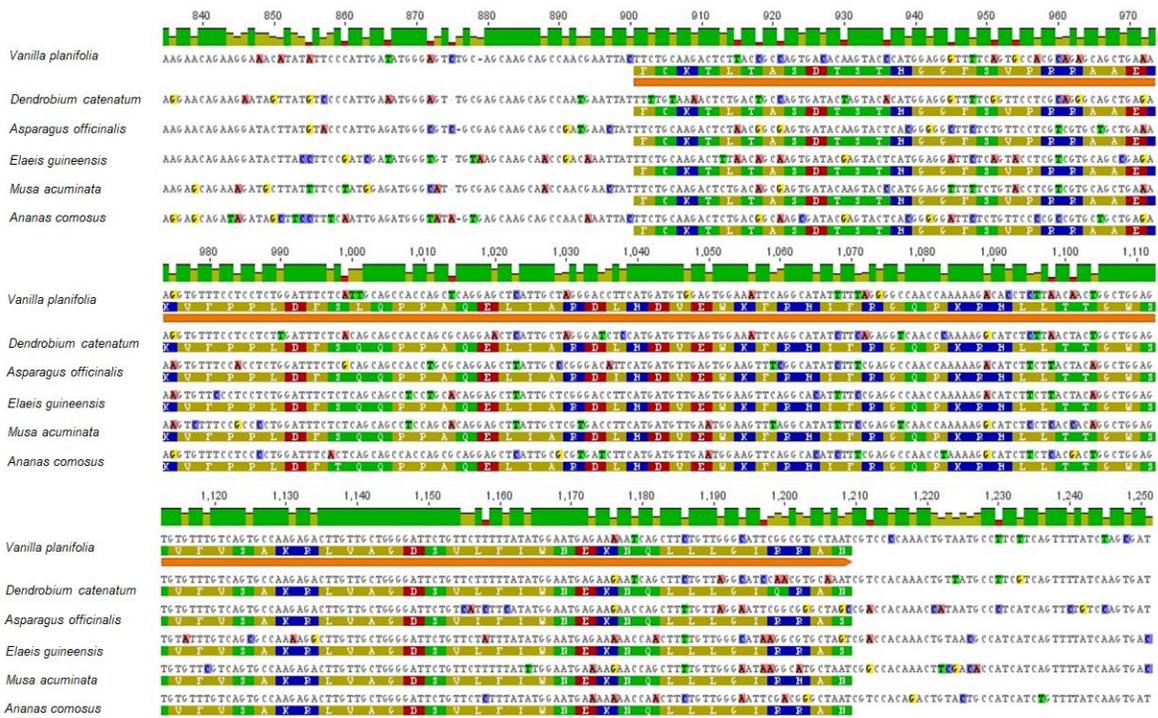


Figura 9. Alineamiento nucleótido y traducción de los dominios de ARF8: A) Dominio B3 (unión a DNA), B dominio III-IV (función de formar heterodímeros con Aux/IAA). Se incluyen especies pertenecientes al superorden Lilianae. Los dominios fueron anotados con una flecha naranja.

B)

Dominio III-IV

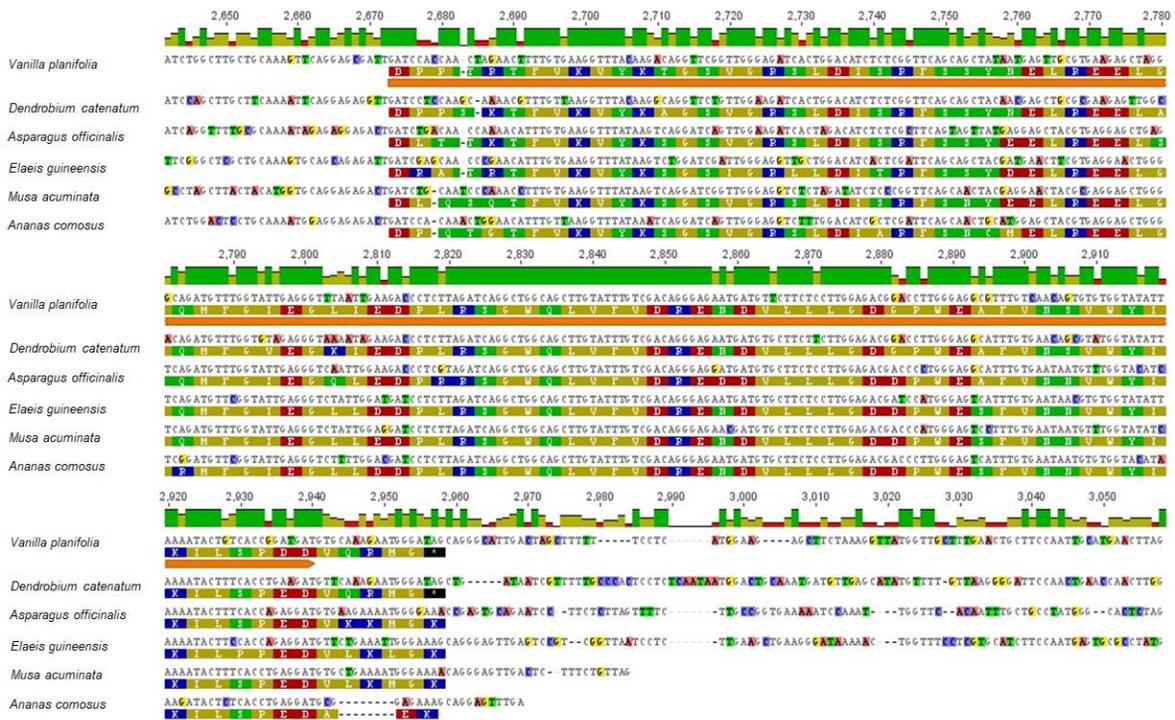


Figura 9. Continuación. Alineamiento de nucleótidos y traducción de los dominios de ARF8: A) Dominio B3 (unión a DNA), B dominio III-IV (función de formar heterodimeros con Aux/IAA). Se incluyen especies pertenecientes al superorden Liliae. Los dominios fueron anotados con una flecha naranja.

En el caso del análisis sobre las relaciones filogenéticas de las secuencias del *gen IAA25-like* dentro del superorden Liliae mediante inferencia bayesiana, se observó que la mayor relación de la secuencia del *contig* de *V. planifolia* de *IAA25-like* (*VpIAA25-like*) corresponde al clado del orden Asparagales, donde se observa un rango de identidad de secuencias de 57-89% (Fig. 10). Particularmente se identificó un nivel de identidad mayor (89%) entre secuencias de la familia Orchidaceae, Subfamilia Vanilloideae (Fig. 10).

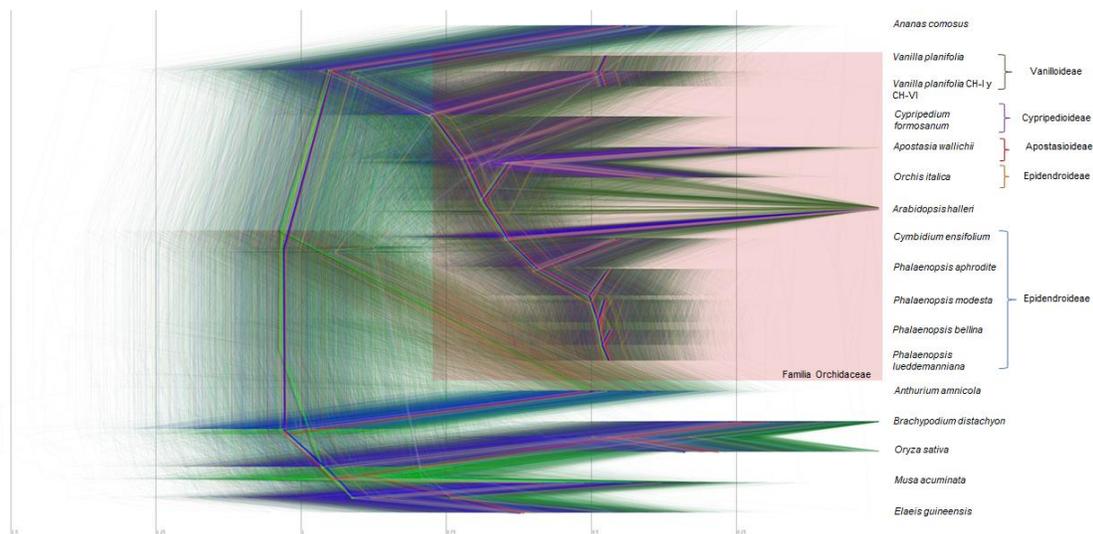


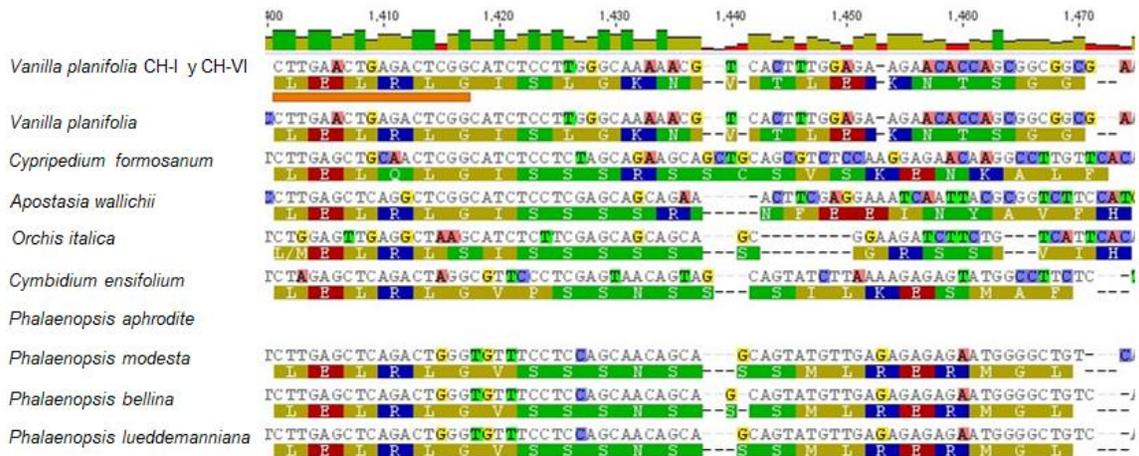
Figura 10. Árbol filogenético del gen *IAA25-like* e *IAA10*. Se incluyen especies pertenecientes al superorden Lillanae. Realizado con el modelo de sustitución JC69.

Una situación particular que se observó en el cladograma de la figura 10, es la presencia de una secuencia del gen *IAA10* *A. halleri* dentro del clado de la familia Orchidaceae, con el cuál se encontró alta similitud en el *contig* de *V. planifolia*. Y la ausencia dentro del cladograma de la secuencia de *IAA25* descrita en *A. thaliana*. Dicha información sugiere que aún existe controversia sobre la identidad del gen, ya que la mayoría de las secuencias revisadas como *IAA25-like* en el Superorden Lillanae, comparten una relación de ancestría con *IAA10* de *A. halleri*.

Sin embargo, se observa que el *contig* de *V. planifolia* podría ser homólogo de dicho gen (por el momento *IAA25-like*), debido a que, en la traducción, existe alta conservación en los dominios funcionales (Fig. 11) (Pearson, 2013). Particularmente en el dominio IV que habilita la capacidad de la proteína *IAA25-like* para formar heterodímeros con ARF8 (Li et al., 2016), por tal razón se diseñaron los primers en dicha zona (Fig. 11-D).

A)

Dominio I



B)

Dominio II

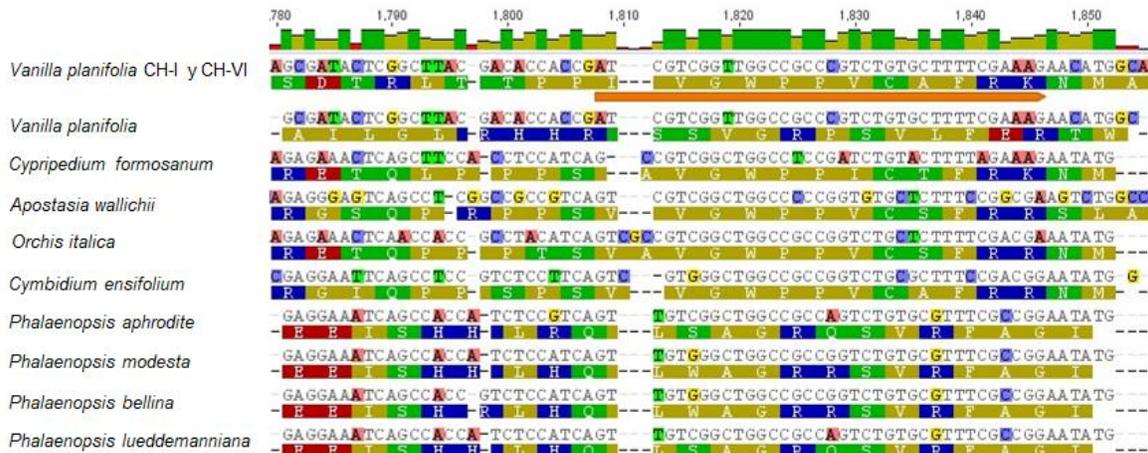
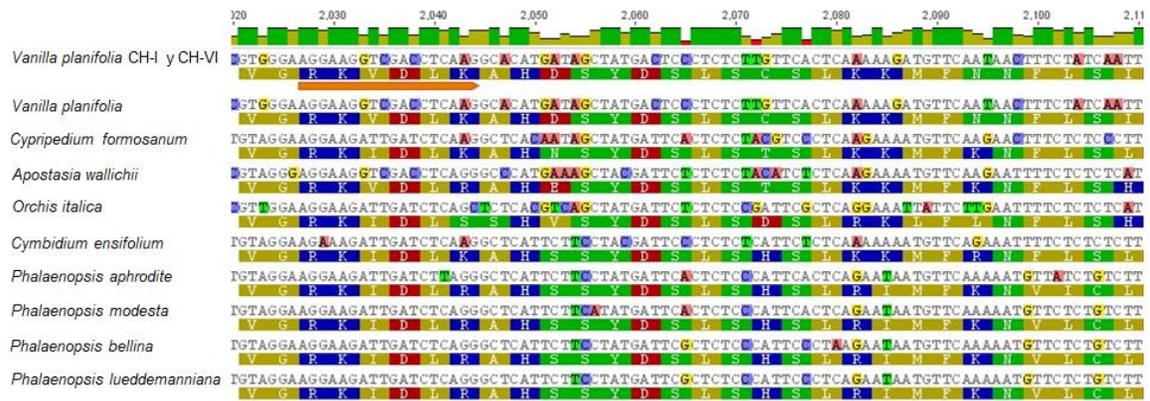


Figura 11. Alineamiento de nucleótidos y traducción de los dominios de IAA25-like: A) Dominio I, B) Dominio II, C) dominio III y D) Dominio IV. Se incluyen especies pertenecientes al superorden Lilianae. Los dominios fueron anotados con una flecha naranja.



C)

Dominio III



D)

Dominio IV

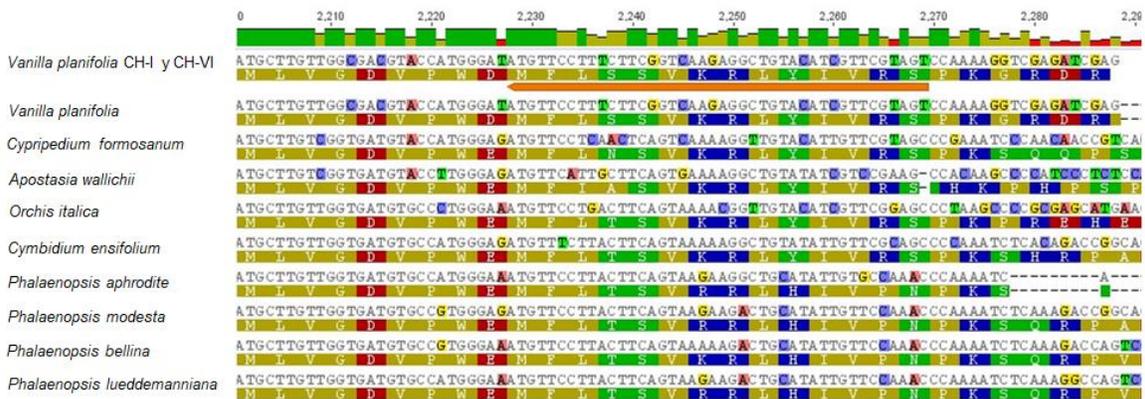


Figura 11. Continuación. Alineamiento de nucleótidos y traducción de los dominios de IAA25-like: A) Dominio I, B) Dominio II, C) dominio III y D) Dominio IV. Se incluyen especies pertenecientes al superorden Liliales. Los dominios fueron anotados con una flecha naranja.

Tabla 1. Primers específicos para *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpACT* con características para qPCR.

Nombre del gen	Directo (F)	Reverso (R)
<i>VpARF8</i>	GAGCTAGGGCAGATGTTTGGT	GGTCGTCTCCAAGAAGAAGCA
<i>VpIAA25-like</i> (Dominio IV)	TCTCCTCTACGAAGACCACGA	GCCTCTTGACCGAAGAAAGGA
<i>VpACT</i>	GGTTACTCCTTTACGACCACA	GCTGCTCTTCGCTGTCTCAA



6.2 Análisis de la expresión diferencial de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante la transición de flor a fruto en *V. planifolia*

Se analizaron tres fuentes de variación sobre la expresión relativa de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like*: El genotipo, la fase de desarrollo y la interacción entre ellas (genotipo por fase de desarrollo).

Entre genotipos únicamente se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *VpIAA25-like*, mientras que entre fases de desarrollo, sólo se distinguieron diferencias significativas para la expresión del gen *VpARF8* ($P < 0.0001$) (Tabla 2).

Tabla 2. Medias y coeficiente de variación de la expresión relativa (ER) de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* de los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia*.

Genes	Media (ER)	Coeficiente de variación	Cuadrados medios		
			Genotipo	Fase del desarrollo	Genotipo*Fase del desarrollo
<i>VpARF8</i>	0.413***	60.989	0.020 ^{NS}	1.686***	1.314***
<i>VpIAA25-like</i>	1.220***	12.069	0.497***	0.071 ^{NS}	0.307***

Se presentan los valores no estadísticamente significativos (NS) y los que presentaron diferencias significativas *** ($P < 0.0001$).

En el caso del análisis sobre el efecto de la interacción, genotipo por fase del desarrollo, para cada gen se analizaron 14 combinaciones de medias a través de la prueba de Tukey (Tabla 2).

Para el gen *VpARF8* se observaron cuatro grupos estadísticamente significativos en los datos de expresión relativa (Tabla 3). El genotipo CH-VI presentó los mayores valores de expresión 1dap, seguido por el genotipo CH-I a los 25ddp y solo en el genotipo CH-VI no se registró expresión en las fases de Ap y 1ddp (Tabla 3).

Respecto al análisis de la expresión del gen *IAA25-like* mediante la prueba de Tukey, se observaron 11 grupos estadísticamente significativos. Las principales diferencias estadísticas se observaron en el genotipo CH-I durante 1dap (menores valores de expresión) y 1ddp (el valor más alto de expresión) (Tabla 3). De manera que en general se observó un nivel menor de expresión del gen *ARF8* en el genotipo CH-VI y un mayor nivel de expresión de *IAA25-like* en el genotipo CH-I (Tabla 3).



Tabla 3. Medias del nivel de expresión relativa (ER) de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like*, de los genotipos CH-I y CH-VI, donde D. S. (desviación estándar).

Genotipo	Fase del desarrollo	<i>VpARF8</i>		<i>VpIAA25-like</i>	
		Media	D. S.	Media	D. S.
CH-I	1dap	0.631 ^{bc}	0.138	0.763^f	0.114
CH-I	A s/p	0.656 ^{bc}	0.119	1.420 ^{abc}	0.146
CH-I	A p	0.035 ^{bc}	0.040	1.287 ^{bcd}	0.197
CH-I	1ddp	0.073 ^{bc}	0.020	1.813^a	0.186
CH-I	10ddp	0.664 ^{bc}	0.162	0.976 ^{def}	0.168
CH-I	25ddp	0.756^b	0.224	1.427 ^{abc}	0.087
CH-I	45ddp	0.236 ^{bc}	0.205	1.615 ^{ab}	0.184
CH-VI	1dap	2.479^a	0.851	1.583 ^{ab}	0.256
CH-VI	A s/p	0.202 ^{bc}	0.110	1.296 ^{bcd}	0.054
CH-VI	A p	0^c	0	1.022 ^{cdef}	0.098
CH-VI	1ddp	0^c	0	0.851 ^{ef}	0.070
CH-VI	10ddp	0.002 ^{bc}	0.003	1.133 ^{cdef}	0.139
CH-VI	25ddp	0.023 ^{bc}	0.020	0.937 ^{def}	0.090
CH-VI	45ddp	0.033 ^{bc}	0.017	0.956 ^{def}	0.118

*Letras distintas en columnas indican diferencias significativas. Tukey ($\alpha = 0.05$).

Al respecto, en *C. pepo* se ha documentado un efecto del genotipo sobre los niveles de expresión de *ARF8*. Concretamente se observó que en tres genotipos, existe una disminución en la expresión del gen *ARF8* cuando hay un incremento en la concentración de AIA; sin embargo, la magnitud de la disminución es distinta entre genotipos, por lo cual se sugiere que para la formación de fruto, existe variación en el mecanismo de regulación entre genotipos (Pomares-Viciana et al., 2017).

En el caso de *IAA25*, Wu et al. (2012) identificaron un efecto de la fase de desarrollo del fruto sobre la expresión de dicho gen en *S. lycopersicum*. Particularmente observaron que el nivel de expresión de dicho gen es alto durante la polinización y disminuye durante el desarrollo de los frutos.

Por otro lado en *M. acuminata*, se ha descrito que existe un efecto conjunto de los genotipos y fases de desarrollo del fruto, sobre los niveles de expresión de *ARF8* (Hu et al., 2015). Se observó que a lo largo del tiempo, en un genotipo de alta calidad de producción, los niveles de expresión de *ARF8* se mantienen altos; mientras que en otro



genotipo resistente a estrés abiótico sus niveles de expresión fueron bajos durante todas las fases de desarrollo del fruto (Hu et al., 2015).

En este sentido, la información observada en *C. pepo*, *S. Lycopersicum* y *M. acuminata* coincide con los resultados observados en *V. planifolia*, donde cada genotipo, en diferente etapa de desarrollo, presenta niveles distintos de expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* (Tablas 2 y 3). Concretamente, las diferencias entre genotipos durante la transición de flor a fruto, sugieren que la variación infraespecífica de *V. planifolia* tiene un efecto funcional sobre la fenología y el éxito reproductivo de cada genotipo.

6.2.1 Perfil de expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante la transición de flor a fruto en *V. planifolia*

Debido a que se quería describir un perfil de expresión conjunto de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante la transición de flor a fruto, se analizó de forma multivariada el efecto del genotipo y la fase del desarrollo sobre la expresión mediante un análisis de conglomerados de dos vías tipo *Heat map*.

En la figura 12, se observan tres perfiles de expresión: El perfil 1 integró un patrón de expresión bajo de *VpARF8* y alto de *VpIAA25-like* durante las fases de: Antesis sin polinizar, 10ddp y 25ddp. Con una disminución considerable del nivel de expresión de ambos genes en el genotipo CH-VI (Fig. 12).

El perfil 2 integró un patrón de expresión medio-bajo en *VpARF8*, sin diferencias entre genotipos y alto en *VpIAA25*, pero mayor para el genotipo CH-I, en las fases de: Antesis polinizada, 1ddp y 45ddp (Fig. 12).

El perfil 3 correspondió únicamente al nivel de expresión observado 1dap, que presentó los valores más altos para ambos genes en el genotipo CH-VI y niveles de expresión bajos de *VpARF8* y *VpIAA25-like* en el genotipo CH-I (Fig. 12).

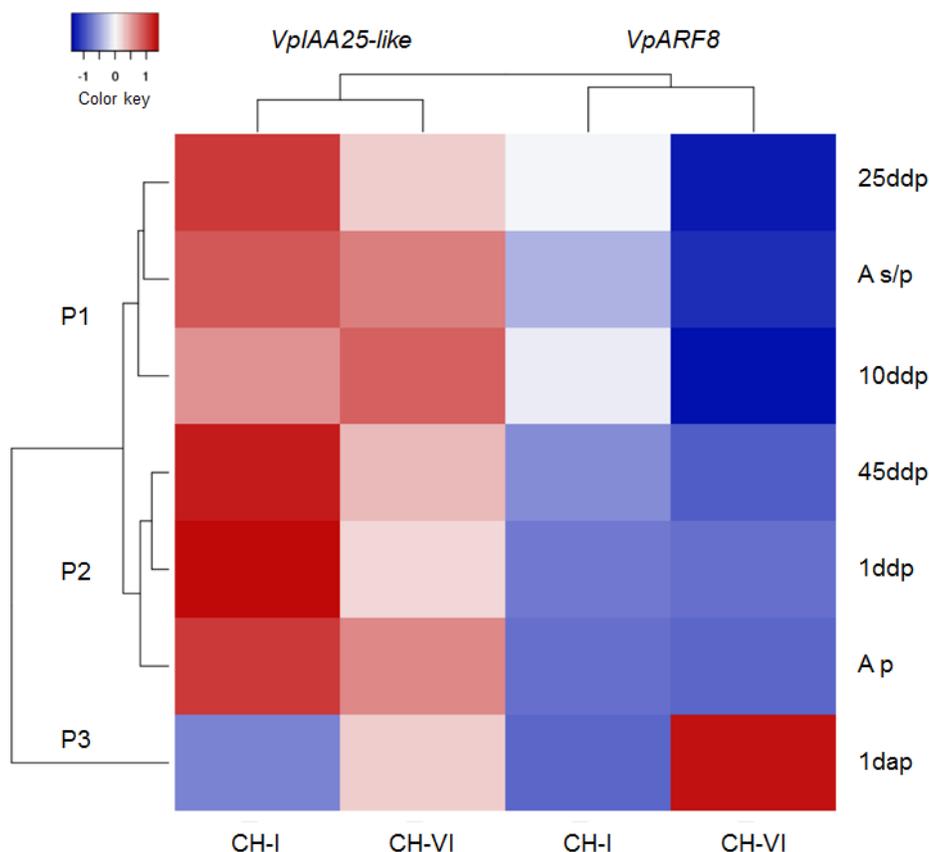


Figura 12. Heat map de los niveles ER de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante siete fases del desarrollo: Un día antes de la polinización (1dap), botón floral en anthesis sin polinizar, (A s/p), botón floral en anthesis después de ser polinizado (A p), un día después de la polinización (1ddp), diez días después de la polinización (10ddp), 25 días después de la polinización (25ddp) y 45 días después de la polinización (45ddp) del genotipo CH-I (tolerante) y CH-VI (susceptible) de *V. planifolia*. Donde se muestra el perfil 1 (P1), perfil 2 (P2) y perfil 3 (P3).

De manera que en *V. planifolia*, el perfil de expresión relativa de los dos genes analizados en los primeros momentos de la polinización (A p y 1ddp) coincide con el perfil de expresión durante el momento de la fertilización (45ddp).

De la misma forma el perfil de expresión relativa observado en el día de anthesis sin polinización (A s/p), presentó un patrón similar de expresión a los 10ddp y 25ddp. Es decir, se observa que el nivel de expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante los dos primeros días de vida de la flor (A s/p, A p y 1ddp) repite el patrón de expresión asociado con la fertilización, que ocurre durante los últimos días de la transición de flor a fruto (10ddp, 25ddp y 45ddp). Por tal razón se considera que el patrón de expresión de los

genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* que se observa durante dichas fases del desarrollo, podría utilizarse como estimador predictivo para evaluar la posibilidad de éxito reproductivo en flores de vainilla en el día 45 posterior a la polinización (Fig. 12).

En este sentido se sabe que en la mayoría de las plantas, el mecanismo de ubiquitinación que opera durante la polinización y en el cual intervienen las proteínas ARF8 e IAA25, funciona de manera similar sobre las mismas proteínas durante la fertilización (Goetz et al., 2007; Pandolfini et al., 2007). Concretamente, dado que en la familia Orchidaceae la polinización y la fertilización, son procesos temporalmente desfasados (O'Neill, 1997) y a que se pueden observar gráficamente dos patrones en la expresión relativa de *VpARF8* y *VpIAA25-like* (Fig. 12); se propone que en vainilla en condiciones de tolerancia a “caída de fruto” (Genotipo CH-I), es posible reconocer de manera general, cuatro etapas involucradas en la transición de flor a fruto: (1) Pre-polinización, (2) Polinización, (3) Pre-fertilización y (4) Fertilización.

(1) Pre-polinización (1dap - A s/p) se caracteriza por presentar altas concentraciones de transcritos de *VpARF8* y *VpIAA25-like* (Fig. 13). Esta información coincide con lo reportado por Pandolfini et al. (2007) y Wu et al. (2012) quienes mencionan que los niveles altos de transcritos de los genes *ARF8* e *IAA25* son característicos de la etapa de pre-polinización. Además, en ningún genotipo se observan óvulos formados ni otro tejido diferenciado durante esta fase de desarrollo floral (Fig. 13A).

(2) Polinización (A p - 1ddp): Presenta una disminución en los transcritos de *VpARF8* y *VpIAA25-like* en el momento en que el polen toca el estigma, seguido de un aumento de en la expresión de *VpARF8* y *VpIAA25-like* 1ddp (Fig. 13). Dicho patrón de expresión coincide con el comportamiento de los niveles de expresión de *ARF8* e *IAA25* registrados durante la etapa de polinización en *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *C. pepo* (Pandolfini et al., 2007; Pomares-Viciano et al., 2017 y Wu et al 2012).

(3) Pre-fertilización (10ddp – 25ddp) se distingue por un aumento en la expresión de *VpARF8* y una disminución de *VpIAA25-like* (10 ddp), seguido por un incremento en la expresión de ambos genes hasta el 25ddp (Fig. 13A). Además, durante esta etapa en el tejido de ovario se observó macroscópicamente la proliferación de placenta y el desarrollo de primordios de óvulos (Fig. 13A 3). Lo cual coincide con la descripción de Pandolfini et al. (2007) y Pomares-Viciano et al. (2017) respecto a los niveles altos de ER de *ARF8* antes de la formación del fruto.

(4) Fertilización (45ddp) Registró un decremento en la expresión de *VpARF8* y un incremento en la expresión de *VpIAA25-like* (Fig. 13A) Al respecto se ha descrito previamente en *C. pepo* (Pomares-Viciano et al., 2017) y *A. thaliana* que existe una disminución en la expresión de *ARF8* durante la fertilización y crecimiento de frutos (Pomares-Viciano et al., 2017).

Por otro lado, se observó que en el genotipo susceptible (CH-VI), las principales diferencias en el perfil de expresión se concentraron durante las fases de Polinización y Pre-fertilización.

En el genotipo CH-VI, los niveles de expresión de ambos genes se mantienen basales hasta los 45ddp (Fig. 13B), macroscópicamente se observa proliferación de placenta y primordios de óvulos en el ovario (Fig. 13B 3), pero genéticamente los bajos niveles de expresión de *VpARF8* y *VpIAA25-like* sugieren que el tejido se encuentra en la etapa de polinización hasta el día 45ddp (Fig. 13B) (Panadolfini et al., 2007; Pomares-Viciano et al., 2017). Por tal razón se considera que en el genotipo CH-VI no ocurre la fertilización y no hay transición de flor a fruto.

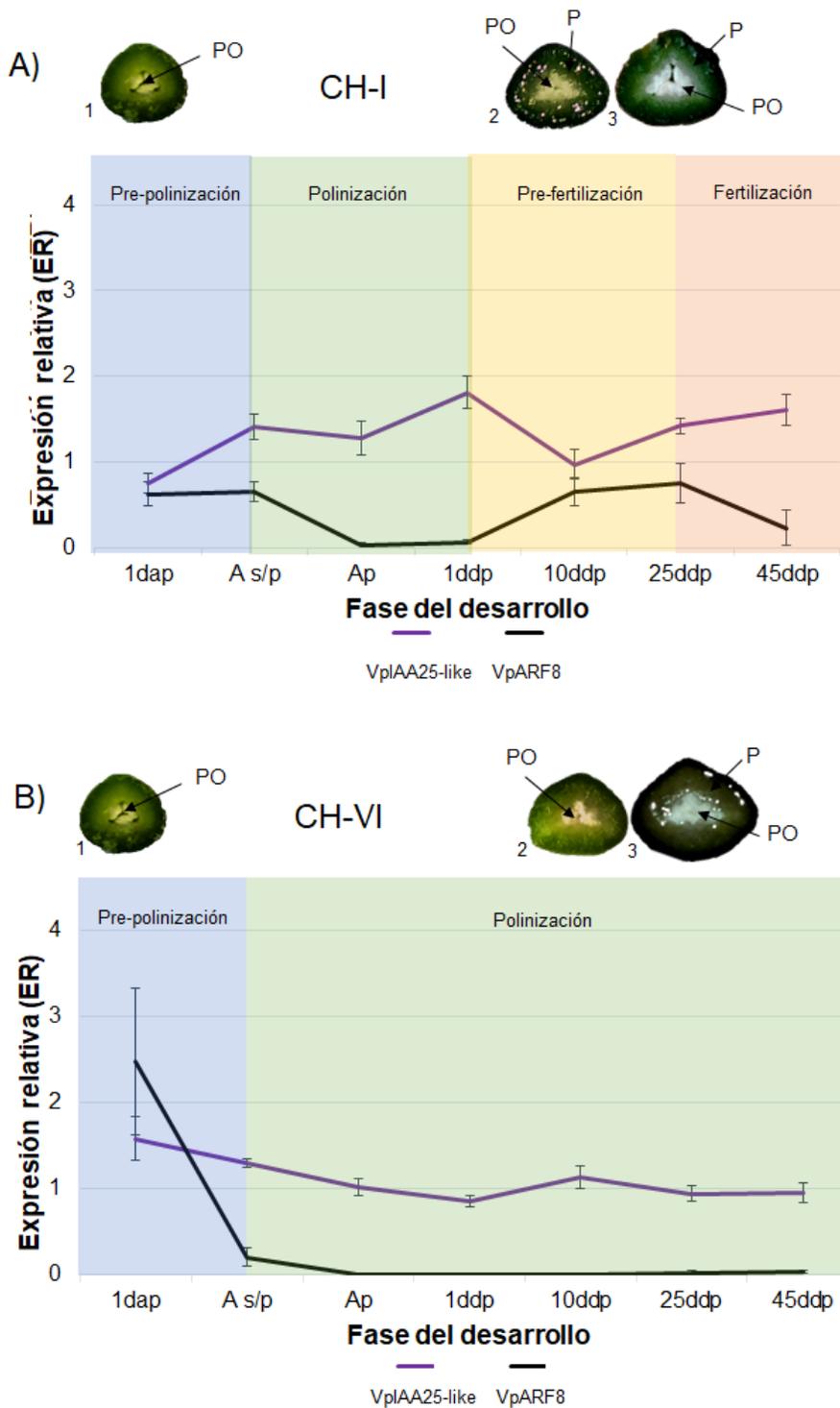


Figura 13. Gráfica comparativa de los niveles de expresión relativa (ER) de los genes *VpARF8* y *VpAA25-like* en los genotipos CH-I y CH-VI en diferentes tiempos y etapas involucrados en la transición de flor a fruto: Un día antes de la polinización (1dap), en la antesis sin polinizar (A s/p), la antesis una vez polinizada la flor (A p), un día después de la polinización (1ddp), diez días después de la polinización (10ddp), 25 días después de la polinización (25ddp) y 45 días después de la

polinización (45ddp). A) Cortes macroscópicos de ovarios del genotipo CH-I: 1) un día antes de la polinización (1dap), 2) diez días después de la polinización (10ddp), 3) 25 días después de la polinización (25ddp). B) Cortes macroscópicos de ovarios del genotipo CH-VI: 1) Un día antes de la polinización (1dap), 2) diez días después de la polinización (10ddp) y 3) 25 días después de la polinización (25ddp). Donde se observan primordios de óvulos (PO) y placenta (P) Sandoval et al. (Comunicación directa).

6.2.2 Modelo de expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante la transición de flor a fruto en *V. planifolia*

A partir de la integración de los resultados observados en cada genotipo sobre la fluctuación en la expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante 45 días posteriores a la polinización. Y considerando las conclusiones de Goetz et al. (2007) y Pandolfini et al. (2007) que indican en un modelo basado en *A. thaliana* que la disminución en la expresión de *ARF8* desencadena un complejo de señales que inducen la formación del fruto en especies con óvulos formados en el momento de antesis; Se plantea la siguiente propuesta para explicar el proceso de transición de flor a fruto en *V. planifolia*:

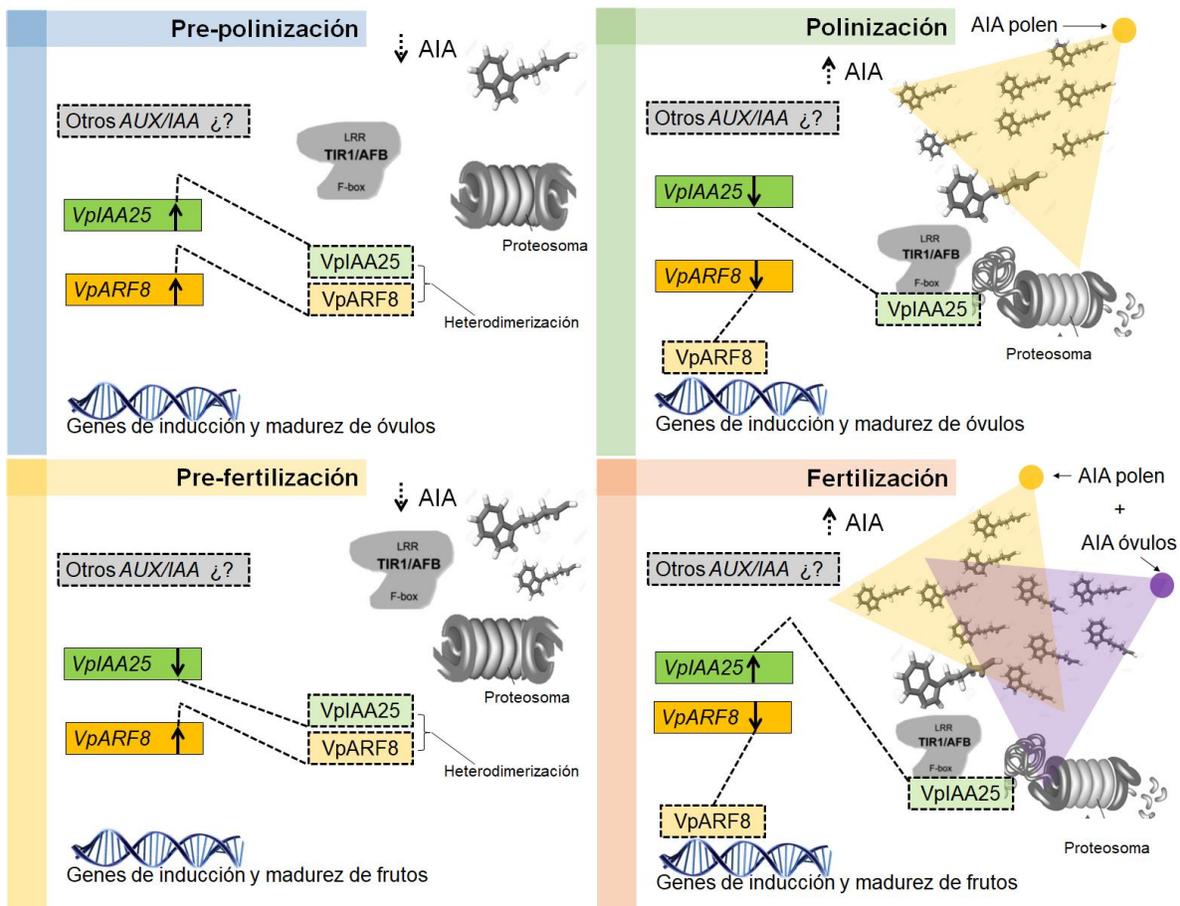


Figura 14. Modelo de transición de flor a fruto en *V. planifolia*. Donde las flechas con líneas sólidas (→) indican datos de expresión relativa (ER) comprobados en el presente estudio y las figuras con líneas punteadas indican (···▶) una hipótesis propuesta a partir del modelo descrito por Goetz et al. (2007) y Pandolfini et al. (2007): Los niveles altos de ER del gen *VpARF8* sugieren la retención de la proteína *VpARF8* por heterodimerización, la cual evita el encendido de genes de inducción de óvulos y frutos. Por otro lado, Los niveles bajos de ER del gen *VpARF8* sugieren la liberación de la proteína *VpARF8* y el encendido de genes de inducción de óvulos y frutos.

La primera etapa corresponde a pre-polinización (1dap - A s/p), donde las altas concentraciones de *VpARF8* y *VpIAA25-like*, sugieren la presencia de bajas concentraciones de auxinas en el botón floral; y la heterodimerización de la proteína *VpARF8* con *VpIAA25-like*, que impiden la transcripción de genes de inducción de óvulos por lo que en esta etapa no existen óvulos en el ovario (Fig. 14) (Pandolfini et al., 2007; Pomares-Viciano et al., 2017; Wu et al., 2012).

Cuando ocurre la polinización, aumenta la concentración de auxinas provenientes de polen (O'Neill, 199), lo cual disminuye la expresión de transcritos de *VpARF8* y *VpIAA25-like*. Durante antesis y el día posterior a la polinización se rompe el heterodímero por la ubiquitinación de IAA25-like, lo cual permite que la proteína VpARF8 active los genes de inducción, desarrollo y maduración de óvulos (Fig. 14) (Pandolfini et al. 2007).

Posteriormente durante la etapa de pre-fertilización disminuye la concentración de auxinas en el tejido, aumenta en la expresión de *VpARF8* (Fig. 13) y la heterodimerización de las proteínas VpARF8 con VpIAA25-like impiden la transcripción de genes de inducción de y desarrollo de fruto (Fig. 14) (Goetz et al., 2006 y 2007; Pandolfini et al., 2007). Durante esta etapa la placenta comienza a proliferar y los óvulos maduran (Mayer et al., 2011).

Finalmente durante la etapa de fertilización, se incrementa la concentración de auxinas endógenas (por biosíntesis en óvulos maduros) y exógenas (provenientes del polen) (Mayer et al., 2011; Pattison et al., 2014; Sundberg & Østergaard, 2009). Se fertilizan los óvulos y con ello disminuye la expresión de *VpARF8* hacia los 45ddp (Fig. 13), se rompe el heterodímero por la ubiquitinación de IAA25-like, lo cual permite que la proteína VpARF8 encienda los genes de inducción de fruto (Fig. 14) (Goetz et al., 2007; Pandolfini 2007).

7. Conclusiones

7.1 Conclusión general

Se identificaron secuencias ortólogas de los genes *ARF8* e *IAA25-like* en *V. planifolia* y se diseñaron primers específicos para el análisis de expresión diferencial de dichos genes.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0001$) en los niveles de expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* entre fases de desarrollo, genotipos y la interacción entre ambos factores.

Se identificaron tres perfiles de expresión relativa de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* en los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia*, durante los primeros 45 días de la transición de flor a fruto:

Perfil 1: integro un patrón de expresión similar en antesis sin polinizar, 10ddp y 25ddp.



El perfil 2: reunió en un patrón los niveles de expresión del ovario en antesis polinizada, 1ddp y 45ddp.

El perfil 3: representó el patrón de expresión más diferente y correspondió al tejido de ovario 1dap.

El aumento en la expresión de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like* durante antesis sin polinizar (A s/p) es característico de la fase de pre-polinización; mientras que el decremento en la expresión de ambos genes durante antesis polinizada (A p) es diagnóstico de la fase de polinización.

El incremento en la expresión de *VpARF8* durante los 25ddp es diagnóstico de la fase de pre-fertilización y el decremento de dicho gen durante los 45ddp es característico de la fase de fertilización.

A los 45 dpp, en el genotipo susceptible (CH-VI) de *V. planifolia* no se registró la etapa de fertilización, por lo cual el evento reconocido como “caída prematura de fruto” en *V. planifolia* en realidad corresponde biológicamente con la abscisión de flores no fertilizadas.

7.2 Perspectivas y aplicaciones

La información sobre los niveles de expresión de *ARF8* e *IAA25* es escasa en orquídeas, por lo que la propuesta de revisar los niveles de expresión de genes asociados con el metabolismo de auxinas durante las cuatro etapas de la transición de flor a fruto resulta importante para comprender el mecanismo de fertilización en otras especies de la familia Orchidaceae.

La información obtenida sobre el papel de *VpARF8* en la regulación del metabolismo de auxinas durante la transición de flor a fruto en vainilla, puede abrir una línea de investigación aplicada para el desarrollo a mediano plazo de estrategias de intervención, que eviten la interrupción de la fertilización en las flores y su abscisión en el genotipo CH-VI, posiblemente a través del silenciamiento o supresión los genes *VpARF8* o *VpIAA25-like* en el germoplasma de vainilla.

Los datos descritos sobre el gen *VpIAA25* durante la etapa de fertilización, sugieren que la señalización de este gen es altamente específica a la concentración de auxinas endógena o exógena (Winkler et al. 2017), por lo cual, se considera que es necesario

estudiar el nivel de afinidad de *VpIAA25-like* por alguna concentración específica de AIA para generar un modelo más explicativo sobre el funcionamiento de la maquinaria molecular regulada por auxinas en el desarrollo del fruto.

Dado que existe un efecto de la variación infraespecífica sobre la regulación de los genes *VpARF8* y *VpIAA25-like*; es importante revisar el perfil de expresión en poblaciones silvestres y otros genotipos cultivados, con el fin de identificar variación infraespecífica funcional que sirva como base para el establecimiento de un programa de mejoramiento genético asistido por marcadores (Marker-assisted selection, MAS por sus siglas en inglés).

Finalmente, debido a que se conoce poco sobre la función de genes de las familias *ARF* y *Aux/IAA* en orquídeas; se propone que las estrategias de análisis de transcriptoma, mirnoma y proteoma pueden ayudar a llenar estos huecos de información a mediano plazo para comprender aspectos de su funcionamiento y evolución en orquídeas; solucionar problemas de caída de fruto, contribuir a la conservación y adaptación al cambio climático de estos grupos susceptibles.

8. Literatura citada

- Audran-Delalande, C., Bassa, C., Mila, I., Regad, F., Zouine, M., & Bouzayen, M. (2012). Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of the Aux/IAA Gene family in Tomato. *Plant and Cell Physiology*, *53*(4), 659–672. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcs022pcs02>
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, *44*(1), 147–153. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
- Bassa, C., Mila, I., Bouzayen, M., & Audran-Delalande, C. (2012a). Phenotypes Associated with Down-Regulation of SI-IAA27 Support Functional Diversity Among Aux / IAA Family Members in Tomato. *Plant Cell Physiol*, *53*(9), 1583–1595. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcs101>
- Bassa, C. (2012b). *Caractérisation de la famille multigénique des Aux/IAA, analyse fonctionnelle du gène SI-IAA27* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT).
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2008). GenBank. *Nucleic acids research*, *36*, 25-30.
- Chao, Y. T., Yen, S. H., Yeh, J. H., Chen, W. C., & Shih, M. C. (2017). Orchidstra 2.0 a transcriptomics resource for the orchid family. *Plant and Cell Physiology*, *58*(1), 9-13.
- Chen, J. C., & Fang, S. C. (2016). The long pollen tube journey and in vitro pollen germination of Phalaenopsis orchids. *Plant Reproduction*, *29*(1–2), 179–188. <http://doi.org/10.1007/s00497-016-0280-z>
- De Smet, I., Voß, U., Lau, S., Wilson, M., Shao, N., Timme, R. E., ... & Bennett, M. (2011). Unraveling the evolution of auxin signaling. *Plant physiology*, *155*(1), 209-221. <http://doi.org/10.1104/pp.110.168161>
- Des Roches, S., Post, D. M., Turley, N. E., Bailey, J. K., Hendry, A. P., Kinnison, M. T., ... Palkovacs, E. P. (2017). The ecological importance of intraspecific variation. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(1), 57-67. <http://doi.org/10.1038/s41559-017-0402-5>
- Domingos, S., Fino, J., Paulo, O. S., Oliveira, C. M., & Goulao, L. F. (2016). Molecular candidates for early-stage flower-to-fruit transition in stenospermocarpic table grape (*Vitis vinifera* L.) inflorescences ascribed by differential transcriptome and metabolome profiles. *Plant Science*, *244*, 40–56. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.12.009>
- Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C. P., & Marlétaz, F. (2012). Evolution of the ARF gene family in land plants: Old domains, new tricks. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(1), 45–56. <http://doi.org/10.1093/molbev/mss220>
- Garay-Arroyo, A., Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E.R., & G. C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia. *REB*, *33*(1), 13–22.
- Goetz, M., Hooper, L. C., Johnson, S. D., Rodrigues, J. C. M., Vivian-Smith, A., & Koltunow, A. M. (2007). Expression of Aberrant Forms of auxin response factor 8 Stimulates Parthenocarpy in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *145*(2), 351–366. <http://doi.org/10.1104/pp.107.104174>



- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S. D., & Koltunow, A. M. (2006). Auxin response factor 8 Is a Negative Regulator of Fruit Initiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(8), 1873–1886. <http://doi.org/10.1105/tpc.105.037192>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., ... & Rokhsar, D. S. (2011). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, 40(1), 1178-1186.
- Hagen, G., & Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: gene, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.*, 49(3–4), 373–385. <http://doi.org/10.1023/A:1015207114117>
- Hu, W., Zuo, J., Hou, X., Yan, Y., Wei, Y., Liu, J., ... Jin, Z. (2015). The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 6, 742. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00742>
- Jain, M., Kaur, N., Garg, R., Thakur, J. K., Tyagi, A. K., & Khurana, J. P. (2006). Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Functional & Integrative Genomics*, 6(1), 47–59. <http://doi.org/10.1007/s10142-005-0005-0>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Kang, C., Darwish, O., Geretz, A., Shahan, R., Alkharouf, N., & Liu, Z. (2013). Genome-Scale Transcriptomic Insights into Early-Stage Fruit Development in Woodland Strawberry *Fragaria vesca*. *The Plant Cell*, 25(6), 1960–1978. <http://doi.org/10.1105/tpc.113.111732>
- Kumar, R., Khurana, A., & Sharma, A. K. (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4561–4575. <http://doi.org/10.1093/jxb/eru277>
- Leyser, O. (2018). Auxin Signaling. *Plant Physiology*, 176(1), 465–579. <http://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., & Zhang, J. Z. (2016). A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(47), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>
- Littell, R. C., Stroup, W. W., & Freund, R. J. (2002). *SAS for linear models*. SAS institute.
- Liu, H., Feng, C. L., Luo, Y. B., Chen, B. S., Wang, Z. S., & Gu, H. Y. (2010). Potential challenges of climate change to orchid conservation in a Wild Orchid Hotspot in Southwestern China. *Botanical Review*, 76(2), 174–192. <http://doi.org/10.1007/s12229-010-9044-x>
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943–950. <http://doi.org/10.1242/dev.086363>
- Mayer, J. L. S., Carmello-Guerreiro, S. M., & Appezzato-da-Glória, B. (2011). Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (ORCHIDACEAE). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(6), 601–609. <http://doi.org/10.1016/j.flora.2011.01.009>
- Mimura, M., Yahara, T., Faith, D. P., Vázquez-Domínguez, E., Colautti, R. I., Araki, H., ... Hendry, A. P. (2016). Understanding and monitoring the consequences of human

- impacts on intraspecific variation. *Evolutionary Applications*, 10(2), 121–139. <http://doi.org/10.1111/eva.12436>
- Mutte, S. K., Kato, H., Rothfels, C., Melkonian, M., Wong, G. K., & Weijers, D. (2018). Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *eLife*, 7, 1–25. <http://doi.org/10.7554/eLife.33399>
- O'Neill, S. D. (1997). Pollination Regulation of Flower Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 547–574. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.547>
- O'Neill, S. D., Nadeau, J. A., Zhang, X. S., Bui, A. Q., & Halevy, A. H. (1993). Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *The Plant Cell*, 5(4), 419–432. <http://doi.org/10.1105/tpc.5.4.419>
- Owczarzy, R., Tatauroy, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., ... & Sailor, C. A. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research* 36, 163-169.
- Ozga, J. A., & Reinecke, D. M. (2003). Hormonal Interactions in Fruit Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(1), 73–81. <http://doi.org/10.1007/s00344-003-0024-9>
- Pandolfini, T., Molesini, B., & Spena, A. (2007). Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science*, 12(8), 327–329. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.011>
- Pattison, R. J., Csukasi, F., & Catalá, C. (2014). Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiologia Plantarum*, 151(1), 62–72. <http://doi.org/10.1111/ppl.12142>
- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence and Series. *Current Protocols in Bioinformatics*, 3(1), 1–9. <http://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42.An>
- Pérez, Q. J. N., Calderon, C. C. S., Nomura, H. J. M. (1998). La caída de flores y frutos en mango (*Mangifera indica* L .) cv Ataulfo y su impacto económico. *Quehacer Científico En Chiapas*, 1(2), 16–24.
- Pfaffl, M. (2004). Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl. *A-Z of Quantitative PCR*, 87–112. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s10551-011-0963-1>
- Pomares-Viciana, T., Die, J., Del Río-Celestino, M., Román, B., & Gómez, P. (2017). Auxin signalling regulation during induced and parthenocarpic fruit set in zucchini. *Molecular Breeding*, 37(4), 2–14. <http://doi.org/10.1007/s11032-017-0661-5>
- Reed, J. W. (2001). Roles and activities of Aux / IAA proteins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 6(9), 420–425. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02042-8](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02042-8)
- Remington, D. L., Vision, T. J., Guilfoyle, T. J., & Reed, J. W. (2004). Contrasting Modes of Diversification in the Aux / IAA and ARF Gene Families. *Plant Physiology*, 135(3), 1738–1752. <http://doi.org/10.1104/pp.104.039669.both>
- Salazar-Rojas, V. M., Sandoval-Zapotitla, E., Granados-Herrera, C. V., Cruz-Ruiz, Y., Herrera-Cabrera, B. E., & Campos-Contreras, J. E. (2016). Descripción estructural y funcional de caída premature de frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *AP Agroproductividad*, 9(0188–7394), 17–18.

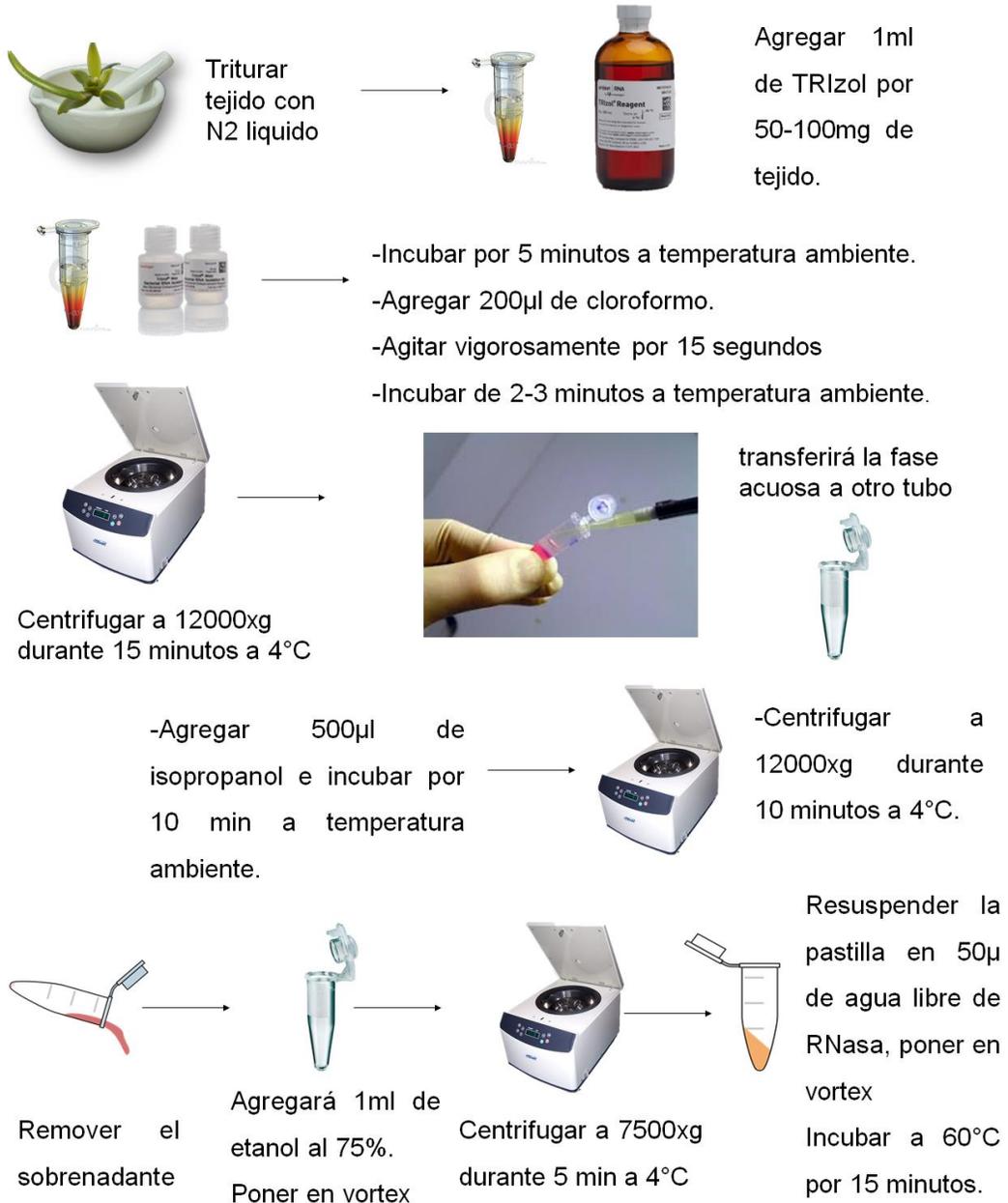


- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2013). Manejo del encauzamiento de la vainilla, como un factor para mejorar la vida productiva. Consultado 28-08-16 en http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/24/2013/anales/an_1704-6-2014-05-1.pdf
- Soto-Arenas, M. A. (2006). La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *CONABIO. Biodiversitas*, 66(2), 1–9. <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv66art1.pdf>
- Sundberg, E., & Østergaard, L. (2009). Distinct and Dynamic Auxin Activities During Reproductive Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), 1–14.
- Tiwari, S. B., Hagen, G., & Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell*, 15(2), 533–43. <http://doi.org/10.1105/tpc.008417.All>
- UniProt Consortium. (2014). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*, 43(1), 204-212.
- Winkler, M., Niemeyer, M., Hellmuth, A., Janitza, P., Christ, G., Samodelov, S. L., ... Caldero, L. I. A. (2017). Variation in auxin sensing guides AUX/IAA transcriptional repressor ubiquitylation and destruction. *Nature Communications*, 8(15706), 1–13. <http://doi.org/10.1038/ncomms15706>
- Wu, J., Peng, Z., Liu, S., He, Y., Cheng, L., Kong, F., ... Lu, G. (2012). Genome-wide analysis of Aux/IAA gene family in Solanaceae species using tomato as a model. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(4), 295–311. <http://doi.org/10.1007/s00438-012-0675-y>
- Wu, W., Liu, Y., Wang, Y., Li, H., Liu, J., Tan, J., ... Ma, H. (2017). Evolution analysis of the Aux/IAA gene family in plants shows dual origins and variable nuclear localization signals. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 1-18. <http://doi.org/10.3390/ijms18102107>
- Zhang, X. S., & O'Neill, S. D. (1993). Ovary and Gametophyte Development Are Coordinately Regulated by Auxin and Ethylene following Pollination. *The Plant Cell*, 5(4), 403–418. <http://doi.org/10.1105/tpc.5.4.403>



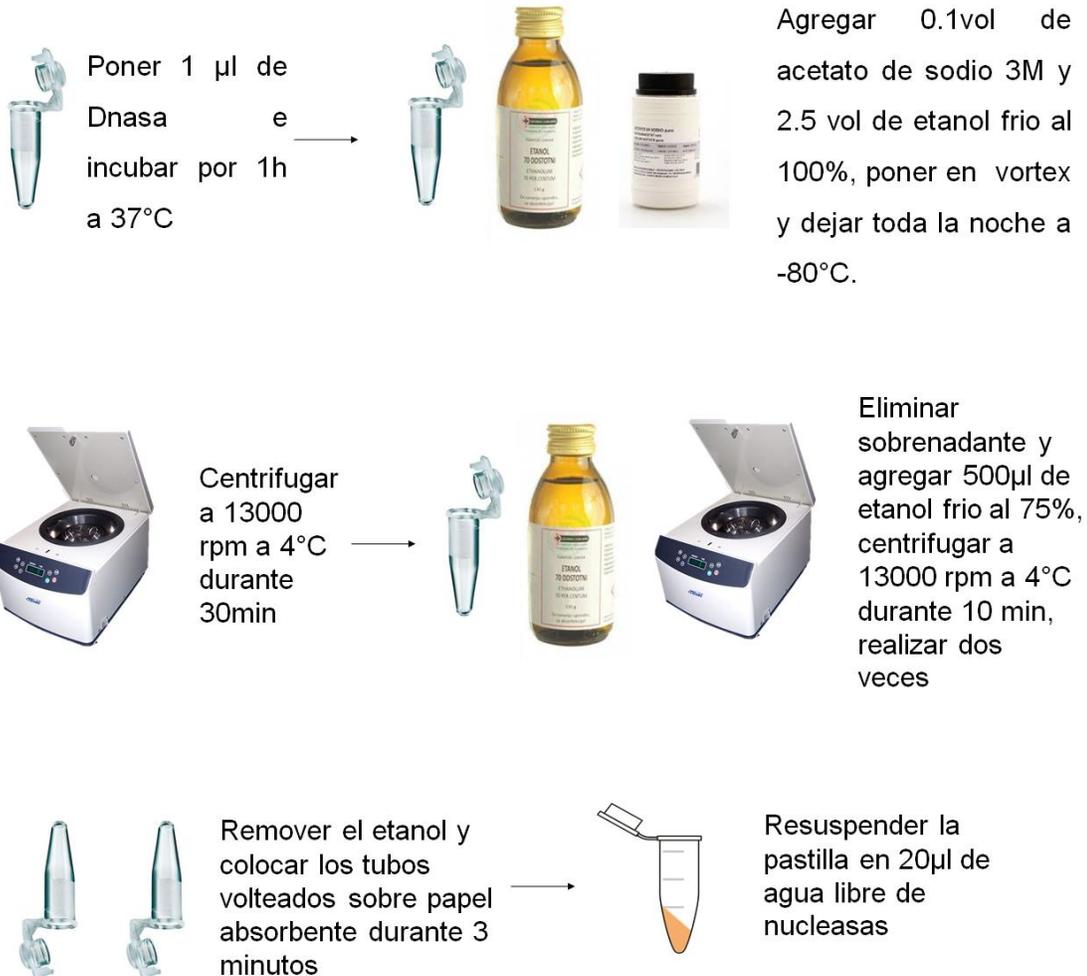
Anexos 1. Diagrama de flujo del procedimiento de extracción de RNA

Extracción de RNA con Trizol



Anexos 2. Diagrama de flujo del procedimiento de precipitación de RNA

Precipitación de RNA



Anexos 3. Diagrama de flujo del procedimiento de síntesis de cDNA

Síntesis de cDNA



RNA

Las muestras de RNA se mantendrán en hielo



Kit thermo científico® ajustado a 20µl

Reactivo	Volumen
RNA	1µl
Oligo dT	1µl
Buffer	4µl
Transcriptasa reversa	1µl
Agua libre de nucleasas	11µl
dNTP	2µl

Las mezclas se incubarán con el siguiente programa

Temperatura	Tiempo
42° C	60min
70° C	10min
-4°C	∞