



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL DEL METABOLISMO DE AUXINAS EN OVARIOS, DURANTE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO EN DOS GENOTIPOS DE *Vanilla planifolia* Andrews (ORCHIDACEAE)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Olga Andrea Hernández Miranda

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Victor Manuel Salazar Rojas
FES Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
FES Iztacala, UNAM

Dra. Estela Sandoval Zapotitla
Instituto de Biología, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, Septiembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL DEL METABOLISMO DE AUXINAS EN
OVARIOS, DURANTE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO EN DOS GENOTIPOS DE
Vanilla planifolia Andrews (ORCHIDACEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Olga Andrea Hernández Miranda

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Victor Manual Salazar Rojas
FES Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
FES Iztacala, UNAM

Dra. Estela Sandoval Zapotitla
Instituto de Biología, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/860/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de junio de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de (**Biología Experimental**) de la estudiante **HERNÁNDEZ MIRANDA OLGA ANDREA** con número de cuenta 310066642 con la tesis titulada “**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL DEL METABOLISMO DE AUXINAS EN OVARIOS, DURANTE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO EN DOS GENOTIPOS DE *Vanilla planifolia* Andrews (ORCHIDACEAE)**”, realizada bajo la dirección del **DR. VICTOR MANUEL SALAZAR ROJAS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ACEVEDO
Vocal: DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA
Vocal: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Vocal: DR. ULISES YUNUÉN ROSAS LÓPEZ
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 6 de septiembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme realizar mis estudios de maestría y el apoyo al desarrollo de la presente investigación.
- ❖ A CONACYT por su apoyo a través de la beca de manutención (No. 1003013), recibida en el periodo 01/08/19 a 31/07/21.
- ❖ Esta investigación fue apoyada por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (SEP-CONACYT), Convocatoria de Investigación Científica Básica 2015, Proyecto 255952.
- ❖ A mi tutor el Dr. Victor Salazar por todo su apoyo, asesoría, tiempo, paciencia y por su amistad.

A los miembros de mi comité tutorial:

- ❖ Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por su asesoría, consejos y su gran apoyo para la elaboración de esta investigación.
- ❖ A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla por compartir sus conocimientos conmigo, por su tiempo, comprensión y apoyo en la elaboración de esta investigación.

AGADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a mis padres por su gran apoyo, por siempre motivarme a seguir mis sueños, por su cariño incondicional, porque siempre han estado presentes en mi vida y me han enseñado que nunca debo rendirme. Le doy las gracias a mi hermano por confiar en mí, por sus consejos, palabras de aliento y por ser mi mayor orgullo. A mis abuelitos por inculcarme el amor por la naturaleza y por enseñarme a trabajar duro.

Muchas gracias a Rubén por su apoyo, cariño, comprensión; porque siempre me ha acompañado cuando lo he necesitado, por los momentos tan auténticos y alegres que hemos compartido. A mis tías Carmen, Malena y Guadalupe por su cariño, cuidado y confianza.

Muchísimas gracias a mis amigos Yaira, Ricardo, Maya, Claudia y Nelly por su amistad y apoyo; por los consejos, charlas filosóficas y por tantos momentos felices. Un agradecimiento a Karla y Violeta por su apoyo, paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo. Muchas gracias a las familias Hernández y Miranda por su cariño y palabras de aliento.

Quisiera agradecer a todos los profesores que han contribuido a mi formación académica: al Dr. Victor Salazar por compartir conmigo sus conocimientos, entusiasmo y manera de pensar; muchas gracias por los consejos, la confianza y las oportunidades que me ha dado para crecer; a la Dra. Martha Martínez por su amistad y apoyo; por los consejos y por tantos momentos alegres. A la profesora Ma. Elena Leños por mostrarme el camino de la curiosidad y el amor por la biología.

Un agradecimiento a mis compañeros y profesores de los laboratorios de Bioquímica Molecular y Gestión del Conocimiento por su apoyo, consejos y por los gratos momentos.

Agradezco al jurado de este trabajo de investigación: a las doctoras Sandra Luz Gómez Acevedo y Sonia Vázquez Santana; a los doctores, Jorge Eduardo Campos Contreras, Hugo Virgilio Perales Vela y Ulises Yunuén Rosas López por su asesoría, tiempo y por su apoyo para la elaboración de esta investigación.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi segundo hogar y por mi formación académica; al Macroproyecto de investigación aplicada de Vainilla y a los productores: el Sr. Miguel Ángel Acosta, el Sr. Edilberto Gallegos (†) y a sus familias por permitirme desarrollar este trabajo.

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

“La fuerza no viene de la capacidad física, sino de una voluntad indomable”

Mahatma Gandhi

DEDICATORIA

A mi familia y seres queridos.

A los agricultores de vainilla de mi país.



“La primera y más respetable de las artes es la agricultura”

Jean Jacques Rousseau

Fotografías: Victor Manuel Salazar Rojas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO EN ANGIOSPERMAS.....	5
2.2 EL SÍNDROME POST-POLINIZACIÓN: UNA ADAPTACIÓN DE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO.....	9
2.3 TRANSCRIPTÓMICA DIFERENCIAL DE PROCESOS FISIOLÓGICOS Y DEL DESARROLLO EN PLANTAS.....	15
3. ANTECEDENTES.....	20
4. HIPÓTESIS.....	22
5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	22
6. OBJETIVOS.....	23
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
7. MÉTODO.....	23
7.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y EXTRACCIÓN DE RNA.....	23
7.2 GENERACIÓN DE BIBLIOTECAS DE CDNA Y SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN.....	24
7.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	24
7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
8.1 ENSAMBLE <i>DE NOVO</i> Y ANOTACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA.....	30
8.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL METABOLISMO DE AUXINAS.....	32
8.3 ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE REDES DE CO-EXPRESIÓN.....	36
8.4 IDENTIFICACIÓN DE MÓDULOS Y MOTIVOS FUNCIONALES.....	40
8.5 IDENTIFICACIÓN DE GENES <i>HUB</i> JERARQUIZADOS (GHJ).....	45
8.6 MODELO DE REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE AUXINAS DURANTE LA TFF DE <i>V. planifolia</i>	58
9. CONCLUSIONES.....	61
10. PRESPECTIVAS Y APLICACIONES.....	62
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Desarrollo del gametofito femenino durante la pre-polinización en <i>A. thaliana</i> .	6
Figura 2. Mecanismo de regulación de genes y proteínas del metabolismo de auxinas durante la TFF en angiospermas.	9
Figura 3. Modelo estructural de la transición de flor a fruto en el género <i>Phalaenopsis</i> .	11
Figura 4. Preparaciones histológicas de la cavidad estigmática. Germinación de polinios y tubos polínicos durante la polinización y post-polinización de los dos genotipos.	13
Figura 5. Niveles de expresión relativa para los genes <i>VpARF8</i> , <i>VpIAA25-like</i> y <i>VpTIR1</i> en los genotipos CH-I y CH-VI en siete fases del desarrollo.	13
Figura 6. Mecanismo de acción del complejo <i>pARF8-VpIAA25-like-VpTIR1</i> durante la TFF de <i>V. planifolia</i> .	14
Figura 7. Representación de una red de co-expresión.	16
Figura 8. Representación de la distribución de grado de nodo (Grado de nodo (K) vs. Número de nodos con K enlaces [P(K)]) de una red construida al azar.	17
Figura 9. Estructura jerárquica de redes celulares.	19
Figura 10. Diseño experimental con dos genotipos de vainilla (CH-I y CH-VI) y cuatro etapas de desarrollo del ovario (pre-polinización, polinización, post-polinización y fecundación).	27
Cuadro 1. Ensamble <i>de novo</i> del transcriptoma de TFF en <i>V. planifolia</i> .	30
Figura 11. Métricas del ensamble y anotación funcional del transcriptoma.	31
Cuadro 2. Genes del metabolismo de auxinas expresados diferencialmente entre genotipos.	33
Figura 12. Dendrograma <i>Heatmap</i> de la expresión genética del metabolismo de auxinas durante la TFF en <i>V. planifolia</i> .	35
Figura 13. Redes de co-expresión del metabolismo de auxinas durante la TFF.	36
Figura 14. Distribución exponencial negativa de las redes VNCH-I y VNCH-VI.	38
Cuadro 3. Valor estimado para la ordenada en el origen y la pendiente (β_0 y β_1), error estándar, valor de T y <i>p-value</i> de cada genotipo.	39
Figura 15. Número de módulos que explicar la estructura de las redes.	41
Figura 16. Módulos funcionales del metabolismo de auxinas en la estructura de las redes de co-expresión.	43
Figura 17. Genes <i>hub</i> jerarquizados de la red VNCH-I.	46
Figura 18. Genes <i>hub</i> jerarquizados de la red VNCH-VI.	47
Figura 19. <i>Diagrama de Venn</i> de los genes <i>hub</i> jerarquizados entre los genotipos CH-I y CH-VI durante la TFF de <i>V. planifolia</i> .	49
Cuadro 4. Genes <i>hub</i> jerarquizados del metabolismo de auxinas comunes a los genotipos CH-I y CH-VI de <i>V. planifolia</i> .	50

Cuadro 5. Genes <i>hub</i> jerarquizados del metabolismo de auxinas en el genotipo CH-I de <i>V. planifolia</i> .	52-53
Cuadro 6. Genes <i>hub</i> jerarquizados del metabolismo de auxinas en el genotipo CH-VI de <i>V. planifolia</i> .	54-56
Figura 20. Modelo sobre la variación intraespecífica en el núcleo regulador del metabolismo de auxinas durante la TFF de <i>V. planifolia</i> .	60
Cuadro 7. Primers específicos para <i>VpFBX14</i> , <i>VpRUS2</i> , <i>VpARF12</i> , <i>VpGH3.11</i> , <i>VpTAR1</i> y <i>VpMYB12</i> con características para qPCR.	61

RESUMEN

La transición de flor a fruto (TFF) en angiospermas es un proceso crítico, complejo y dinámico, que involucra la interacción de vías de señalización hormonal como auxinas (AIA), giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. Gran parte del proceso está coordinado a través de un sistema de redes de co-expresión relacionado con el metabolismo de auxinas. Sin embargo, en plantas con síndrome post-polinización (SPP) como la familia Orchidaceae, la ausencia de óvulos en el momento de antesis implica diferencias estructurales y funcionales que modifican la explicación general sobre el papel de las auxinas en la TFF de estos grupos vegetales.

En este sentido, la utilización de enfoques integrales como el análisis transcriptómico diferencial ha permitido desarrollar modelos para explicar el proceso de TFF en *Vanilla planifolia* Andrews y con ello desarrollar estrategias de intervención para atender la problemática conocida agrónomicamente como 'caída prematura de fruto', que afectan al cultivo de vainilla a nivel global. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es analizar el transcriptoma diferencial asociado con el metabolismo de auxinas, en ovarios durante la transición de flor a fruto, incluyendo las cuatro etapas de desarrollo (pre-polinización, polinización, post-polinización y fecundación) en dos genotipos de vainilla, CH-I (tolerante a caída prematura de ovario) y CH-VI (susceptible a caída prematura de ovario). Se realizó un ensamble de *novο* de los transcriptomas de cada etapa y genotipo, así como una anotación funcional para identificar genes asociados al metabolismo de auxinas.

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión diferencial global de la TFF a través de un análisis de conglomerados tipo *Heatmap* y se construyeron redes de co-expresión para la identificación de módulos funcionales y genes *hub* jerarquizados (GHJ) para distinguir el proceso de TFF entre genotipos. Los resultados muestran que seis genes se expresaron diferencialmente (*VpAVT6D*, *VpRUS2*, *VpPHT1*, *VpFBX14*, *VpAVT6C* y *VpARF12*) entre genotipos, con sobreexpresión en el genotipo CH-I. El análisis de conglomerados sugirió diferencias temporales en los perfiles de expresión entre genotipos. Se identificaron redes de co-expresión distintas en el número de módulos y motivos funcionales para cada genotipo, las cuales fueron definidas como VNCH-I y VNCH-VI. Dentro de cada red se identificaron 16 genes *hub* jerarquizados en la red VNCH-I (asociados a un programa genético del desarrollo) y 38 en NCH-VI (asociados con interacción ambiental) que participan en núcleos regulatorios del metabolismo de auxinas durante la TFF en *V. planifolia*. En este sentido, la regulación del genotipo CH-I está vinculada con niveles bajos de auxinas gracias a los genes *hub* *VpJAR4* y *VpGH3.11* (conjugación), mientras que el genotipo CH-VI presenta una regulación asociada a concentraciones altas de auxinas en el ovario a través de los genes *hub* *VpTAR1* y *VpNPY* (biosíntesis). Se concluyó que el transcriptoma del genotipo CH-VI presenta un perfil de expresión y núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas característico de ovarios en estado inmaduro que sugiere que la fecundación se encuentra incompleta hasta el día 60 después de la polinización.

Palabras clave: síndrome post-polinización, núcleos regulatorios, redes de co-expresión, variación funcional y caída de fruto.

ABSTRACT

The transition from flower to fruit (TFF) in angiosperms is a critical, complex and is a dynamic process that involves the interaction of different hormonal signaling pathways of auxins (IAA), such as gibberellins, cytokinins, ethylene and abscisic acid. Much of the process is coordinated through a system of co-expression networks related to auxin metabolism. However, in plants with post-pollination syndrome (PPS), such as the Orchidaceae family, the absence of ovules at the time of anthesis implies structural and functional differences that modify the general explanation about the role of auxins in the TFF of these plant groups.

In this regard, the use of comprehensive approaches such as differential transcriptomic analysis has made it possible to develop models to explain the TFF process in *Vanilla planifolia* Andrews and thereby develop intervention strategies to address the problem agronomically known as 'premature fruit drop', which affects the cultivation of vanilla globally. Therefore, the objective of this study is to analyze the differential transcriptome associated with auxin metabolism, in ovaries during the transition from flower to fruit, including four stages of development (pre-pollination, pollination, post-pollination, and fertilization) in two vanilla genotypes, CH-I (fruit fall-tolerant) and CH-VI (susceptible). *De novo* assembly of the transcriptomes of each stage and genotype was performed, as well as a functional annotation to identify genes associated with auxin metabolism.

Subsequently, global differential expression analysis of TFF was performed through a Heatmap-type cluster analysis, and co-expression networks were built to identify functional modules and authoritative *hub* genes (AHG) to distinguish the TFF process between genotypes. The results show that six genes were differentially expressed (*VpAVT6D*, *VpRUS2*, *VpPHT1*, *VpFBX14*, *VpAVT6C*, and *VpARF12*) between genotypes, with overexpression in the CH-I genotype. Cluster analysis suggested temporal differences in expression profiles between genotypes. Different co-expression networks were identified in the number of modules and functional motifs for each genotype, which were defined as VNCH-I and VNCH-VI. In this sense, the regulation of the CH-I genotype is linked with low levels of auxins through the *hub* genes *VpJAR4* and *VpGH3.11* (conjugation), while the CH-VI genotype presents a regulation associated with high auxin gradients through of the *hub* genes *VpTAR1* and *VpNPY* (biosynthesis). It was concluded that the CH-VI genotype transcriptome shows an expression profile and regulatory nucleus of auxin metabolism characteristic of immature ovaries, suggesting that fertilization is incomplete until day 60 after pollination.

Keywords: post-pollination syndrome, regulatory core, co-expression networks, functional variation and fruit fall.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

La transición de flor a fruto (TFF) es un proceso crítico en la evolución y desarrollo de las angiospermas. En la mayoría de las plantas dicha transición está definida por dos eventos que ocurren de manera consecutiva: (1) la polinización, que es el contacto del polen con el estigma de una flor y (2) la fecundación, que se define como la unión del gameto masculino y el femenino para la formación de un embrión (Lord & Russell, 2002). No obstante, algunos grupos del orden Asparagales en donde se encuentra la familia Orchidaceae, presentan un fenómeno denominado síndrome post-polinización (SPP), que se caracteriza porque en la flor, el desarrollo del gametofito femenino aún no ocurre o es incompleto antes de la polinización, siendo el contacto del polen con el estigma, la señal que activa el mecanismo hormonal que permite el desarrollo de los óvulos de manera sincrónica con el crecimiento del tubo polínico, hasta su llegada al saco embrionario donde ocurre la fecundación (O'Neill, 1997; Mayer et al., 2011). Esta modificación al proceso de fecundación es altamente sensible a diversos factores ambientales que pueden causar una desincronización hormonal y con ello interrumpir el proceso de TFF (O'Neill, 1997; Ruan et al., 2012).

A nivel fisiológico y molecular se sabe que la TFF en angiospermas es un proceso complejo que involucra un sistema dinámico que integra redes genéticas de co-expresión de múltiples vías hormonales (Tang et al., 2015; Shahan et al., 2018). Particularmente, la vía de auxinas (AIA) ha sido una de las rutas metabólicas más utilizadas para explicar el modelo de TFF; sin embargo, en la familia Orchidaceae y en general en plantas con SPP, la ausencia de óvulos en el momento de antesis, plantea diferencias estructurales y funcionales importantes que modifican la explicación general sobre el proceso de TFF (O'Neill, 1997; Sundberg & Østergaard, 2009; de Bruijn et al., 2012).

De manera que para estudiar la complejidad de la regulación genética asociada a la TFF en plantas con SPP, la utilización de enfoques como el análisis transcriptómico diferencial, representa una alternativa precisa para estudiar de manera comparativa los perfiles de expresión de cientos de genes involucrados en procesos biológicos, en diferentes condiciones experimentales y tejidos en distintas etapas de desarrollo (Marguerat & Bähler, 2010).

Dentro del enfoque de transcriptómica diferencial, el análisis de redes de co-expresión ha sido utilizado como una herramienta para reconstruir procesos biológicos complejos a partir del análisis de la estructura y función de las redes genéticas que generan módulos funcionales implicados en procesos concretos como la TFF (Aoki et al., 2007; Emamjomeh et al., 2017).

Particularmente la estrategia de análisis mediante redes de co-expresión ha sido utilizada en organismos modelo como *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) (tomate), *Fragaria vesca* L. (Rosaceae) (fresa), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) (uva) y *Cicer arietinum* L. (Fabaceae) (garbanzo) (Singh et al., 2017; Shahan et al., 2018). Y se ha enfocado en comparar distintas condiciones experimentales para un mismo genotipo (Shahan et al., 2018; Fajardo & Quecini, 2021). Sin embargo, la inclusión de varios genotipos al diseño experimental permite identificar con mayor precisión las diferencias topológicas en las redes de co-expresión asociadas con un proceso biológico en particular, así como reconocer la variación funcional entre las poblaciones de un linaje, lo cual es central para el diseño de estrategias de adaptación de las plantas a entornos cambiantes (Pattison et al., 2014; Mimura et al., 2016; Fajardo & Quecini, 2021).

En el caso del germoplasma de *Vanilla planifolia* Andrews cultivada (Orchidaceae) (vainilla), se ha descrito un fenómeno denominado como “caída prematura de ovario”, que afecta hasta en un 80% la producción nacional (Salazar-Rojas et al., 2016). Existe una respuesta diferencial entre los genotipos CH-I que presenta perfiles agronómicos de tolerancia a la interrupción de la TFF, mientras que en el genotipo CH-VI se han identificado perfiles de susceptibilidad a la caída prematura de ovario (Rocha-Flores et al., 2018). Adicionalmente, se han descrito cambios en la expresión de los genes *VpARF8* (*Vanilla planifolia* AUXIN RESPONSE FACTOR 8), *VpIAA25-like* (*Vanilla planifolia* INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 25-like) y *VpTIR1* (*Vanilla planifolia* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) entre genotipos, que se correlacionan con la interrupción de la TFF (Hernández-Miranda et al., 2020).

Hasta el momento, la explicación sobre la TFF en vainilla involucra sólo algunos genes, sin embargo, la regulación genética del metabolismo de auxinas es un proceso complejo, que requiere de enfoques integrales para su explicación, como la biología de sistemas y la utilización plataformas ómicas (Joldersma & Liu, 2018; Hernández-Miranda et al., 2020).

Dicho lo anterior, el objetivo del presente estudio es analizar el transcriptoma diferencial asociado con el metabolismo de auxinas, durante la transición de flor a fruto en ovarios de dos genotipos de *V. planifolia*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO EN ANGIOSPERMAS

De manera general en las angiospermas, se reconoce que una vez que finaliza el desarrollo del meristemo floral, inicia el proceso denominado como transición de flor a fruto (TFF) (Ruan et al, 2012). La TFF contempla tres eventos críticos: (1) pre-polinización que está integrada por la pre-antesis que establece el momento final del desarrollo estructural de la flor y la antesis que define el momento de mayor receptividad estigmática y apertura de la flor. (2) polinización-fecundación: dos eventos que ocurren de manera consecutivo y describen la transferencia de polen al estigma, el recorrido de los tubos polínicos en el gineceo y la unión de los gametos que dan origen al embrión y (3) el desarrollo del fruto que ocurre una vez que inician las semillas (Lord & Russell, 2002; Chevalier et al., 2011).

2.1.1 PRINCIPALES CAMBIOS ESTRUCTURALES DURANTE LA TFF

A partir de modelos basados en *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae), se ha descrito a nivel estructural que durante la etapa de pre-polinización, particularmente en pre-antesis, el tejido placentario comienza a proliferar, emergiendo los primordios de óvulos, de cuya nucela una célula subepidérmica se diferencia en célula madre de la megaspora (CMM) (Figura 1-A). En este momento ocurre la megasporogénesis, donde la CMM experimenta meiosis para formar una tétrada de megasporas haploides, tres de ellas degeneran, mientras que la restante se configura como megaspora funcional (MF) (Figura 1-B) (Chevalier et al., 2011).

Posteriormente, las cubiertas del óvulo denominadas tegumentos comienzan su crecimiento y rodean a la nucela, dejando solo una abertura llamada micrópilo (Figura 1-A). Ocurre la megagametogénesis, donde la megaspora funcional pasa por tres rondas de mitosis, sin citocinesis, para generar ocho núcleos que completan la diferenciación de un saco embrionario que tiene dos células sinérgidas (1n), una célula huevo (1n), una célula central binucleada y tres células antípodas (1n) en su extremo calazal, que degeneran para formar un saco embrionario maduro de cuatro células que está listo para ser fecundado durante la antesis de la flor (Figura 1-B) (Chevalier et al., 2011).

2.1.2 CAMBIOS FUNCIONALES

A nivel celular y tisular, se sabe que la TFF es un proceso sumamente complejo y dinámico, que involucra la interacción de distintas vías de señalización hormonal para auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. Sin embargo, a nivel molecular aún es escasa la información sobre los mecanismos que coordinan la interacción hormonal múltiple y las redes genéticas de co-expresión durante la TFF (Ruan et al., 2012; Joldersma & Liu, 2018).

No obstante, las hormonas vegetales auxinas, han sido utilizadas como referencia para modelar el proceso de TFF e integrar la información disponible sobre su interacción con otras redes genéticas y vías hormonales (Sundberg & Østergaard, 2009; Joldersma & Liu, 2018). Hasta el momento, se ha planteado un modelo general para explicar el sistema de redes de co-expresión relacionadas con la vía hormonal de auxinas en *A. thaliana* y *S. lycopersicum* desde el desarrollo floral (formación de óvulos) hasta el crecimiento del fruto (desarrollo de semillas).

Dicho modelo, reconoce cuatro mecanismos moleculares (biosíntesis, señalización, transporte y conjugación) en los que participan distintos genes (representados con letras itálicas) y proteínas durante tres momentos de la TFF que se describen en la Figura 2 (Pattison et al., 2014).

- 1) La primera etapa considerada es la pre-polinización, que está integrada por dos momentos:
 - A) Pre-antesis, durante este momento se conoce que las auxinas regulan la formación del gametofito femenino a través de un gradiente de concentración generado por la biosíntesis de auxinas desde la parte apical del primordio de óvulo (la punta de la nucela), donde se reconoce la expresión de genes *YUC* (*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE*) y del gen *PIN1* (*PIN-FORMED 1*) (Sundberg & Østergaard, 2009).
 - B) Antesis, que se caracteriza por un aumento en la concentración de auxinas en el extremo micropilar del saco embrionario, gracias a la expresión de activadores de la biosíntesis de auxinas como *STY1* (*STYLISH1*), genes de biosíntesis (*YUC*); y la expresión de genes de transporte de auxinas (*PIN1*) en la epidermis del óvulo y tegumentos (Sundberg & Østergaard, 2009; Chevalier et al., 2011). Mientras que dentro del saco embrionario se mantiene una baja concentración de auxinas, a través del incremento en la expresión de genes de señalización de auxinas como *AUXIN RESPONSE FACTOR 8* (*ARF8*), *AUXIN RESPONSE FACTOR 7* (*ARF7*) e *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 9* (*IAA9*) (Sundberg & Østergaard, 2009; Chevalier et al., 2011; Pattison et al., 2014; Hu et al., 2015).

2) Posteriormente ocurre la polinización-fecundación que abarca dos momentos del desarrollo:

A) Polinización, cuando el polen toca el estigma y se genera un aumento en la concentración de auxinas que son transportadas a larga distancia durante la germinación y crecimiento del tubo polínico. Justo en este momento dentro del estigma y tejido de transmisión se expresan los genes *ARF6* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 6*), *ARF8* y genes de transporte local de auxinas *PIN* (*PIN-FORMED*) *ABCB* (*ATP-BINDING CASSETTE*) para mantener un gradiente de auxinas en el tejido de transmisión que dirige la elongación de los tubos polínicos hacia el ovario (Sundberg & Østergaard, 2009).

B) La fecundación, que ocurre una vez que los tubos polínicos llegan al saco embrionario, posteriormente hay un aumento en la concentración de auxinas proveniente del endospermo y el embrión en desarrollo, a través de dos vías biosintéticas de auxinas dependientes de triptófano: (1) El triptófano se convierte en ácido indol 3-pirúvico por la enzima TAR2 (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE-RELATED PROTEIN 2) y luego en ácido indolacético (AIA) por las enzimas YUCCA1 (PROBABLE INDOLE-3-PYRUVATE MONOOXYGENASE YUCCA1) y YUCCA4 (PROBABLE INDOLE-3-PYRUVATE MONOOXYGENASE YUCCA4). (2) El triptófano pasa a 3-indol acetamida gracias a la acción de la enzima AMI1 (AMIDASE 1) que lo convierte en AIA (Garay-Arroyo et al., 2014; Pattison et al., 2014).

Además, este incremento en la concentración de auxinas dentro del embrión activa la participación del complejo ^{SCF}TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), ARF y Aux/IAA que modula la respuesta a auxinas. Por otro lado, el transporte polar mediante la acción de genes de eflujo *PIN*, *ABCB* y *AUCSIA* (*PYSGXSTLALVARXSA*) e influjo *LAX3* (*LIKE AUX1 3*) de auxinas, contribuyen para mantener este gradiente máximo de auxinas alrededor del embrión y evitar la caída prematura del fruto (Pattison et al., 2014).

3) Durante el crecimiento y desarrollo del fruto, disminuye la concentración de auxinas en el ovario a través de un proceso de conjugación del AIA catalizado por las proteínas GH3 (Glycoside Hydrolase 3). El transporte de auxinas disminuye durante este momento, particularmente por acción de los genes *PIN3* (*PIN-FORMED 3*), *PIN1*, *PIN4* (*PIN-FORMED 4*) *PIN8* (*PIN-FORMED 8*) y *LAX2* (*LIKE AUX1 2*) que se expresan en la placenta; y *ABCB1* (*ATP-BINDING CASSETTE 1*) y *ABCB19* (*ATP-BINDING CASSETTE 19*) que muestran alta expresión en el tejido del fruto (Pattison et al., 2014).

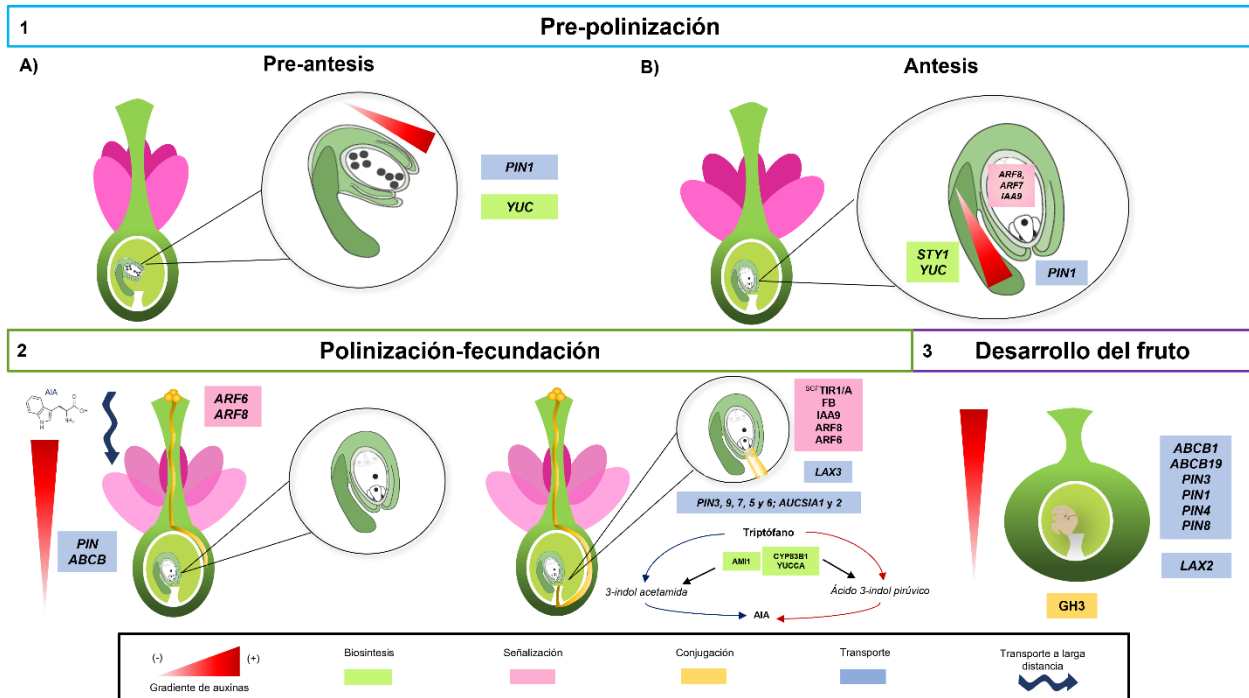


Figura 2. Mecanismo de regulación de genes y proteínas del metabolismo de auxinas durante la TFF en angiospermas. (1) Pre-polinización, (2) polinización-fecundación y (3) desarrollo del fruto. Los nombres de los genes están representados con letras *itálicas*. Adecuación de Sundberg & Østergaard (2009), Chevalier et al. (2011) y Pattison et al. (2014).

2.2 EL SÍNDROME POST-POLINIZACIÓN: UNA ADAPTACIÓN DE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO

Gran parte de las angiospermas evolutivamente recientes, invierten nutrientes para el desarrollo del gametofito femenino antes de la polinización, por tal motivo su polinización y fecundación ocurren simultáneamente (Leslie & Boyce, 2012). Sin embargo, existen otros grupos como la familia Orchidaceae, que presentan un fenómeno denominado síndrome post-polinización; en el cual se destina una mínima inversión de nutrientes para el desarrollo del gametofito femenino antes de la polinización y para ello los mecanismos de polinización y fecundación están desfasados temporalmente (O'Neill, 1997; Leslie & Boyce, 2012).

2.2.1 CAMBIOS ESTRUCTURALES IDENTIFICADOS EN EL SÍNDROME POST-POLINIZACIÓN

El síndrome post-polinización en orquídeas se caracteriza porque una vez que ocurre la polinización, se activa el programa de senescencia del perianto que genera cambios en la pigmentación de la flor (decoloración, intensificación de la pigmentación o pigmentación en manchas discretas) y permite la translocación de nutrientes de la corola hacia el ovario para el desarrollo del gametofito femenino (O'Neill, 1997).

En este sentido, en la familia Orchidaceae se han descrito tres estrategias reproductivas relacionadas con el estado ontogenético de los óvulos durante la antesis (O'Neill, 1997):

- (1) Los óvulos están completamente ausentes en los ovarios no polinizados y su desarrollo es inducido por la polinización (O'Neill, 1997).
- (2) Presentan primordios de óvulos durante la antesis, que no han progresado a la etapa de diferenciación de células arcosporiales y se plantea que la polinización induce el desarrollo y maduración de los óvulos hasta la fecundación (O'Neill, 1997).
- (3) Durante la antesis los primordios de óvulos están suspendidos en una etapa premeiótica y la polinización reactiva su desarrollo (O'Neill, 1997).

Se conoce poco sobre los cambios estructurales y funcionales de dichas estrategias reproductivas; sin embargo, en el género *Phalaenopsis* (Orchidaceae) se ha descrito el mecanismo de inducción y el desarrollo de óvulos a través de la polinización (O'Neill, 1997). Una vez que la flor ha llegado a la etapa de antesis y el estigma se encuentra receptivo, ocurre la polinización, que desencadena la proliferación celular de la cresta placentaria para formar primordios de óvulos, mientras ocurre la elongación de los tubos polínicos (Figura 3).

Posteriormente, 40 días después de la polinización (ddp), inicia el desarrollo del tegumento interno y comienza la formación de la CMM que después de la meiosis da lugar a una MF. Posteriormente divisiones mitóticas dan como resultado el desarrollo de un saco embrionario maduro 80 ddp, justo antes de que se lleve a cabo la fecundación (Figura 3) (O'Neill, 1997).

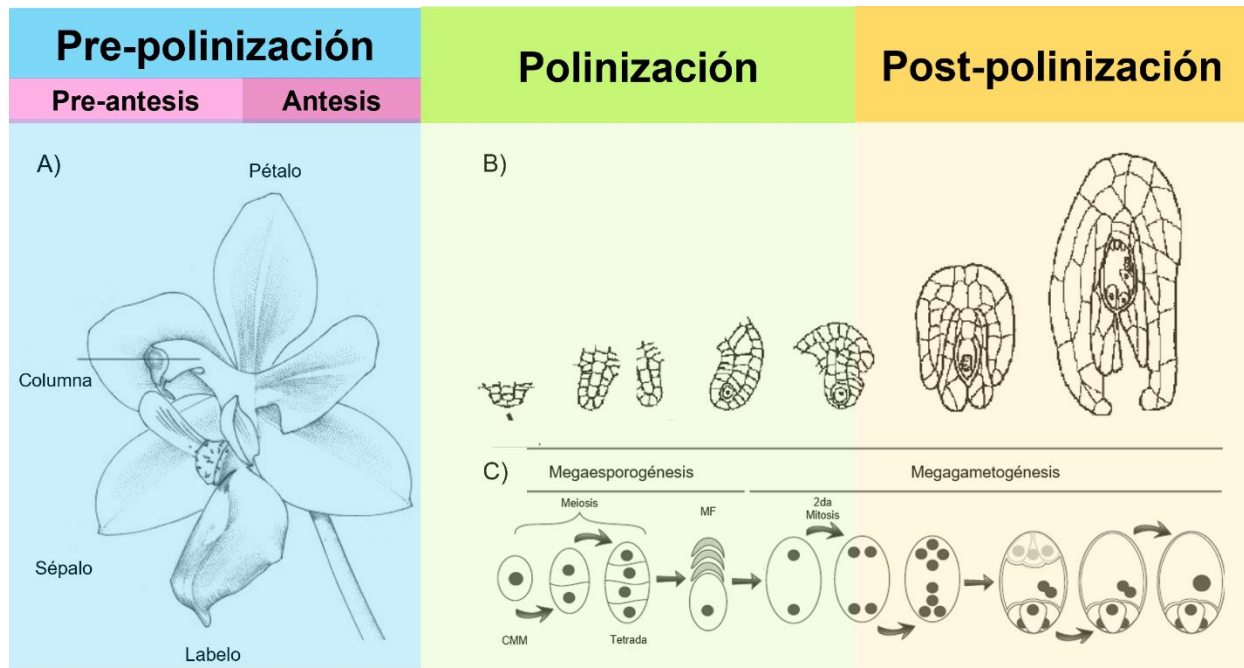


Figura 3. Modelo estructural de la transición de flor a fruto en el género *Phalaenopsis*. A) Esquema de la flor en antesis. B) Desarrollo del óvulo, C) Desarrollo del gametofito femenino. Célula madre de la megaspora (CMM), megaspora funcional (MF). Adecuación de O'Neill (1997).

2.2.2 CAMBIOS FUNCIONALES IDENTIFICADOS EN EL SÍNDROME POST-POLINIZACIÓN

En orquídeas, la mayor parte de la explicación sobre la regulación sincrónica de los óvulos después de la polinización se ha concentrado en el metabolismo de etileno (O'Neill, 1997). Sin embargo, recientemente se ha propuesto un modelo que utiliza datos de expresión de genes del metabolismo de auxinas (*VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1*), plantea mecanismos putativos en las proteínas (*VpARF8*, *VpIAA25-like*, *VpTIR1* y *RBX1*), así como algunas evidencias histológicas para explicar el proceso de TFF en *V. planifolia* durante cuatro etapas del desarrollo (Hernández-Miranda et al., 2020):

- (1) La pre-polinización se caracteriza por la presencia de proyecciones placentarias, altos niveles de expresión de *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* que sugieren la presencia de bajas concentraciones de auxinas en el botón floral; así como, la heterodimerización de la proteína *VpARF8* con *VpIAA25-like*, que evita la transcripción de genes de respuesta a auxinas y la inducción de óvulos (Figuras 5 y 6) (Hernández-Miranda et al., 2020).

- (2) Durante la polinización, se observa germinación de los polinios en el estigma, aumento en el número de proyecciones placentarias (Figura 4). Además, una disminución en los niveles de expresión de *VpARF8*, disminución de *VpIAA25-like* y *VpTIR1* que sugieren un aumento en la concentración de auxinas exógenas provenientes del polen y que *VpTIR1* recluta a la proteína *VpIAA25-like*, mientras que *RBX1* (E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE) ubiquitina a la proteína *VpIAA25-like* para su degradación vía proteosoma 26S, lo cual permite que la proteína *VpARF8* quede libre y active los genes de inducción de óvulos (Figuras 4, 5 y 6) (Hernández-Miranda et al., 2020).
- (3) En la post-polinización ocurre un desarrollo avanzado de tubos polínicos y tejido de transmisión en el estigma, así como la proliferación de las proyecciones placentarias (Figura 4). En este momento, disminuye la concentración de auxinas en el tejido de ovario, aumenta la expresión de *VpARF8*, mientras disminuye la expresión de *VpTIR1* y *VpIAA25-like* y ocurre la heterodimerización de las proteínas *VpARF8* con *VpIAA25-like* que impiden la transcripción de genes de inducción para el desarrollo de fruto (Figuras 4, 5 y 6) (Hernández-Miranda et al., 2020).
- (4) Finalmente, durante la fecundación las paredes internas del ovario se han diferenciado completamente (Figura 5). Ocurre una disminución en la expresión de *VpARF8* y *VpTIR1*, al mismo tiempo que se observó un incremento en la expresión de *VpIAA25-like* que sugiere un incremento en la concentración de auxinas endógenas y exógenas debido a la fecundación de los óvulos; por lo tanto, se asume que el complejo ^{SCF}TIR1/AFB recluta a la proteína *VpIAA25-like* uniéndose al receptor *VpTIR1*, mientras que *RBX1* ubiquitina a la proteína *VpIAA25-like* para su degradación vía proteosoma 26S, para que *VpARF8* quede libre y activa los genes de inducción de frutos (Figuras 5 y 6) (Hernández-Miranda et al., 2020).

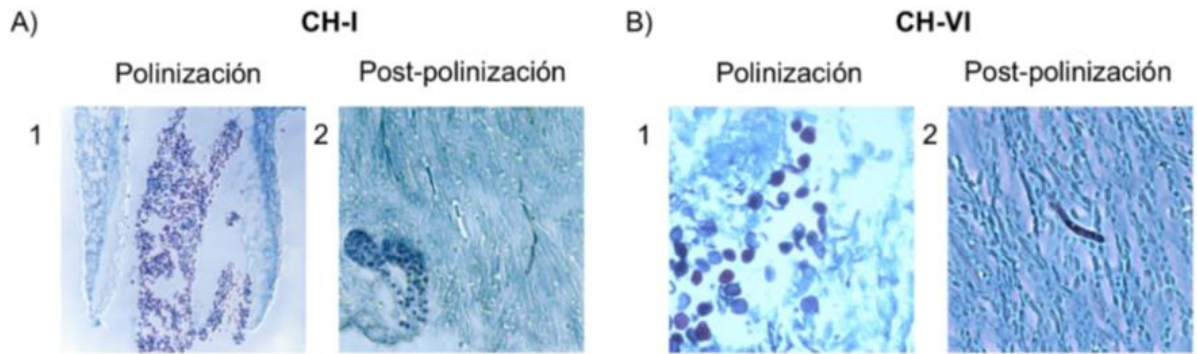


Figura 4. Preparaciones histológicas de la cavidad estigmática. Germinación de polinios y tubos polínicos durante la polinización y post-polinización de los dos genotipos. A) Genotipos CH-I en la etapa de polinización (1) y post-polinización (2). B) Genotipo CH-VI en la etapa de polinización (1) y post-polinización (2) (Hernández-Miranda et al., 2020).

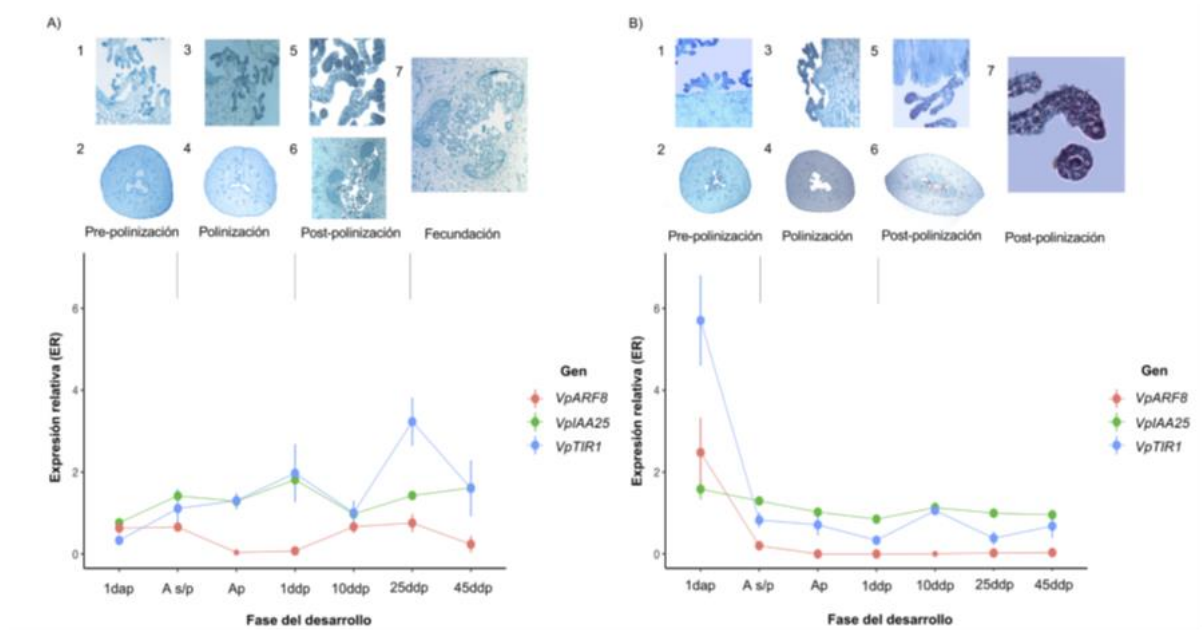


Figura 5. Niveles de expresión relativa para los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* en los genotipos CH-I y CH-VI en siete fases del desarrollo. Un día antes de la polinización (1dap), antesis sin polinizar (As/p), antesis una vez polinizada la flor (Ap), un día después de la polinización (1ddp), diez días después de la polinización (10ddp), 25 días después de la polinización (25ddp) y 45 días después de la polinización (45ddp). Cortes macroscópicos de ovario (2, 4 y 6), proyecciones placentarias (1 y 3), la célula madre de la megaspora (5 y B7) y estados iniciales de semilla (A7) (Hernández-Miranda et al., 2020).

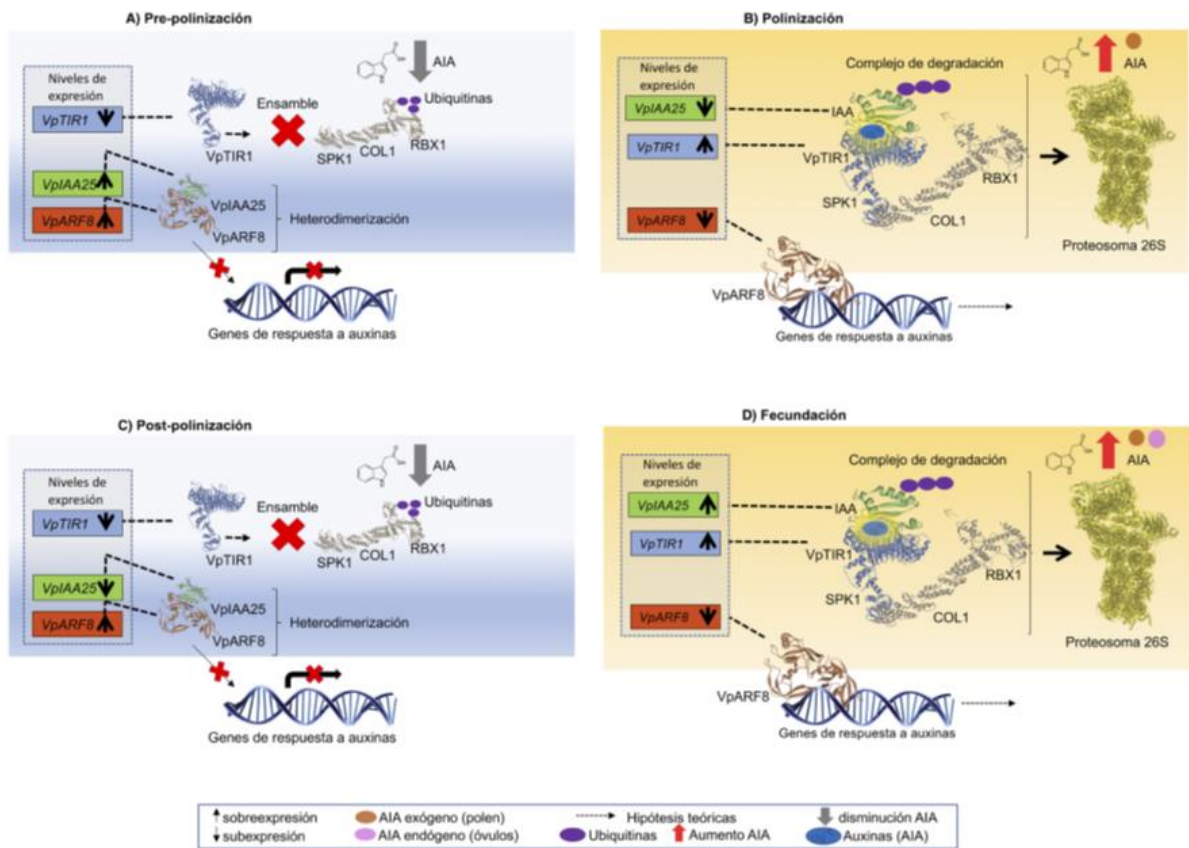


Figura 6. Mecanismo de acción del complejo *pARF8-VpIAA25-like-VpTIR1* durante la TFF de *V. planifolia*. A) Pre-polinización, B) polinización, C) post-polinización y D) fecundación. Los nombres de los genes están representados con letras itálicas (Hernández-Miranda et al., 2020).

2.3 TRANSCRIPTÓMICA DIFERENCIAL DE PROCESOS FISIOLÓGICOS Y DEL DESARROLLO EN PLANTAS

A pesar de que se conoce el papel central de las auxinas en la señalización la diferenciación del gametofito femenino y la fecundación en angiospermas, se conoce muy poco sobre su papel en plantas con síndrome post-polinización como *V. planifolia* (O'Neill, 1997; Sundberg & Østergaard, 2009; Pattison et al., 2014). Una alternativa para integrar la explicación sobre la regulación genética del metabolismo de auxinas durante la TFF, es el enfoque “transcriptómico diferencial” ya que permite analizar de manera comparativa, cambios en los perfiles de expresión de múltiples genes en distintos tejidos, durante diferentes etapas del desarrollo, genotipos y tratamientos específicos (Marguerat & Bähler, 2010; Fischer & Smith, 2012). Y con ello, es posible identificar empalmes alternativos, nuevos transcritos y procesos biológicos clave (Shahan et al., 2018).

Una de las herramientas derivada de este enfoque, que busca comprender la estructura y dinámica del comportamiento de los genes desde una perspectiva de sistemas complejos, es el análisis de redes de co-expresión, mediante el cual es posible identificar módulos de genes co-expresados en funciones desconocidas, así como identificar variación intraespecífica funcional y genes candidatos para estudios de genómica funcional (Aoki et al., 2007; Emamjomeh et al., 2017; Contreras-López et al., 2018).

2.3 1 ANÁLISIS DE REDES DE CO-EXPRESIÓN

Las redes genéticas de co-expresión (RGC) son una representación gráfica (Figura 7) de la similitud en los patrones de expresión entre genes (nodos) e ilustran vínculos funcionales (aristas) entre genes altamente conectados en una misma vía metabólica o un proceso biológico en común (Aoki et al., 2007; Fukushima et al., 2012; Emamjomeh et al., 2017; Shahan et al., 2018).

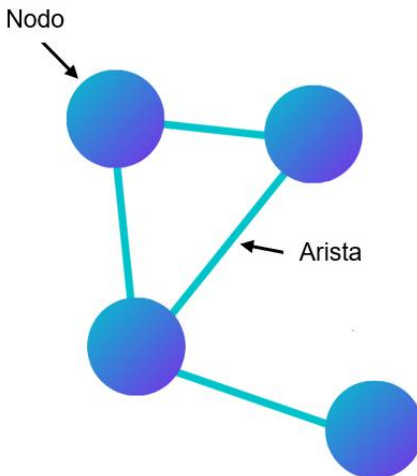


Figura 7. Representación de una red de co-expresión. Los nodos representan genes y las aristas de la red representan relaciones de co-expresión entre los genes.

Para explicar fenómenos biológicos, las RGC deben estar construidas a partir de patrones de co-expresión y no de manera aleatoria. Además, deben cumplir con cinco características topológicas universales a los sistemas biológicos complejos (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004; Aoki et al., 2007):

(1) Son de libre escala, ya que se caracterizan por la co-existencia de nodos con distinto número de enlaces por nodo (grado de nodo); es decir, al graficar el grado de nodo (K) contra el número de nodos con K enlaces [$P(K)$], las redes de libre escala presentan nodos con pocos enlaces y nodos con una gran cantidad de enlaces, por esta razón su distribución sigue una ley de potencias ($P(k) \sim k^{-\gamma}$) (Figura 8-A) (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004).

Mientras que las redes construidas al azar, la mayoría de los nodos tienen aproximadamente el mismo número de enlaces; por lo tanto, siguen una distribución de Poisson (Figura 8-B) (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004).

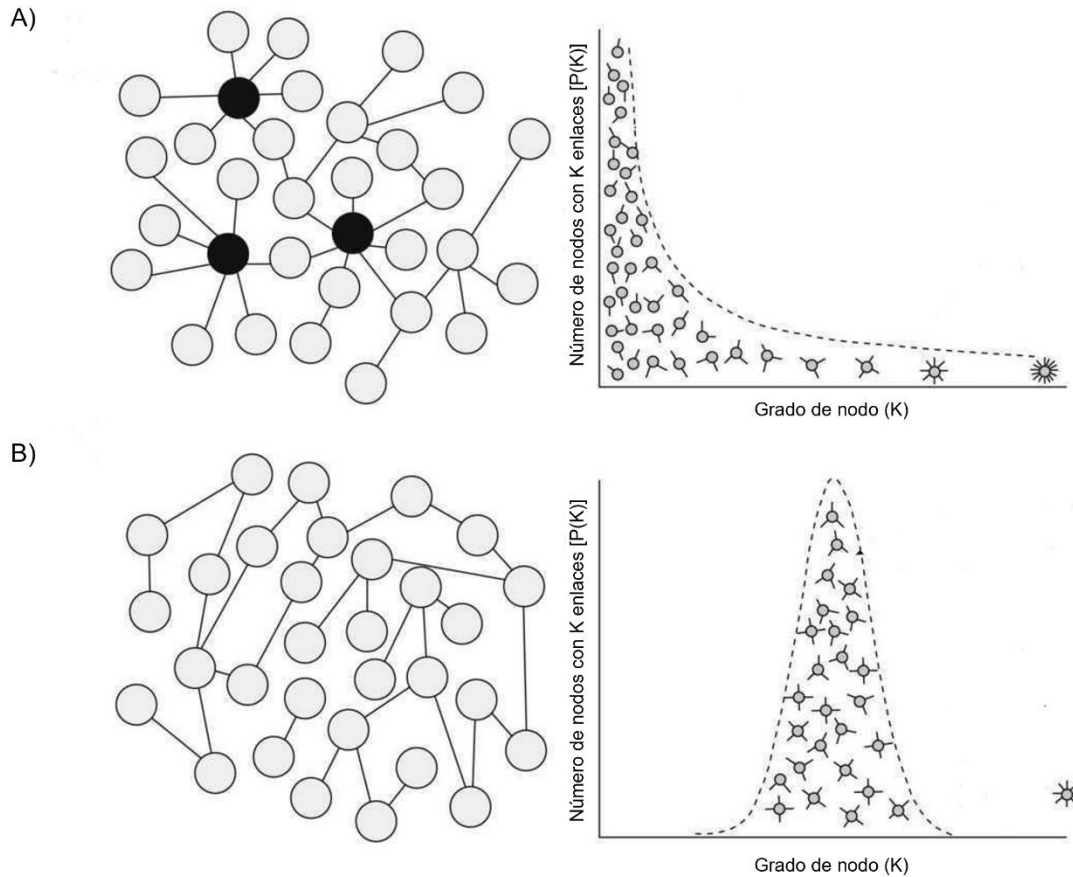


Figura 8. Representación de la distribución de grado de nodo (Grado de nodo (K) vs. Número de nodos con K enlaces [$P(K)$]) de una red construida al azar. (A) y una red de libre escala (B). Adaptación de Tordera (2009).

Se plantea que las redes de libre escala son comunes en los sistemas biológicos debido a que siguen un proceso denominado apego preferencial; mediante el cual los nodos que ya tienen una gran cantidad de enlaces, tienen una mayor probabilidad de conectarse a nodos. Por esta razón, conforme transcurre el tiempo, dichos nodos acumulan nuevos enlaces a mayor velocidad que los nodos con menos conexiones y de esta manera se convierten en *hub*. Desde esta explicación se sugiere que los genes y proteínas evolutivamente más antiguas, tienen más enlaces que los nodos más recientes (Barabasi & Oltvai, 2004).

(2) Son redes de mundo pequeño, porque una característica común de las redes complejas es que dos nodos tomados al azar están conectados a través de una ruta con un bajo número de enlaces; por lo tanto, es la manera más eficiente de estructurar la red y se ha conservado evolutivamente en los sistemas biológicos (Barabasi & Oltvai, 2004; Emamjomeh et al., 2017).

(3) Tienen coeficiente de agrupamiento alto, ya que una gran cantidad de nodos relacionados se concentran dentro de un módulo (Barabasi & Oltvai, 2004; Emamjomeh et al., 2017). En este sentido, las redes biológicas presentan un coeficiente de agrupamiento (C) significativamente mayor en comparación con lo que se espera en una red aleatoria con el mismo tamaño y distribución de grado (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004; Winterbach et al., 2013).

(4) Presentan robustez ya que al existir un bajo porcentaje de genes *hub* (5%) en las redes biológicas, si existiera alguna perturbación aleatoria, es muy poco probable que ocurra en un gen *hub*; por lo tanto, la red mantendrá una alta tolerancia a errores y es capaz de responder a cambios en las condiciones externas sin modificar su estructura esencial (Barabasi & Oltvai, 2004; Winterbach et al., 2013).

(5) Tienen una organización jerárquica, gracias a las propiedades de grado de nodo y coeficiente de agrupamiento, son capaces de generar niveles de complejidad dentro del genoma, lo que permite la organización de módulos y subestructuras llamadas motivos (Aoki et al., 2007).

Los módulos: Son grupos de moléculas relacionadas funcionalmente, tanto espacial como temporalmente y en conjunto determinan la estructura fundamental en las redes complejas (Figura 9) (Barabasi & Oltvai, 2004; Emamjomeh et al., 2017). La modularidad funcional es esencial en el estudio de la evolución adaptativa ya que permite cambios de una parte del organismo sin afectar otras características (Espinosa-Soto & Wagner, 2010). De esta manera se explica el surgimiento de nuevos módulos y el desarrollo de innovaciones funcionales y morfológicas en los organismos (Espinosa-Soto & Wagner, 2010).

Motivos o subgrafos: Se generan gracias con un alto coeficiente de agrupamiento en ciertas zonas de las redes biológicas; de esta manera, se generan grupos funcionales aislados, que presentan alta conectividad y sobre-regulación (Barabasi & Oltvai, 2004; Aoki et al., 2007).

Además, tienen la característica de que pueden interactuar con nodos fuera del motivo, para formar motivos más grandes (Figura 7) (Barabasi & Oltvai, 2004).

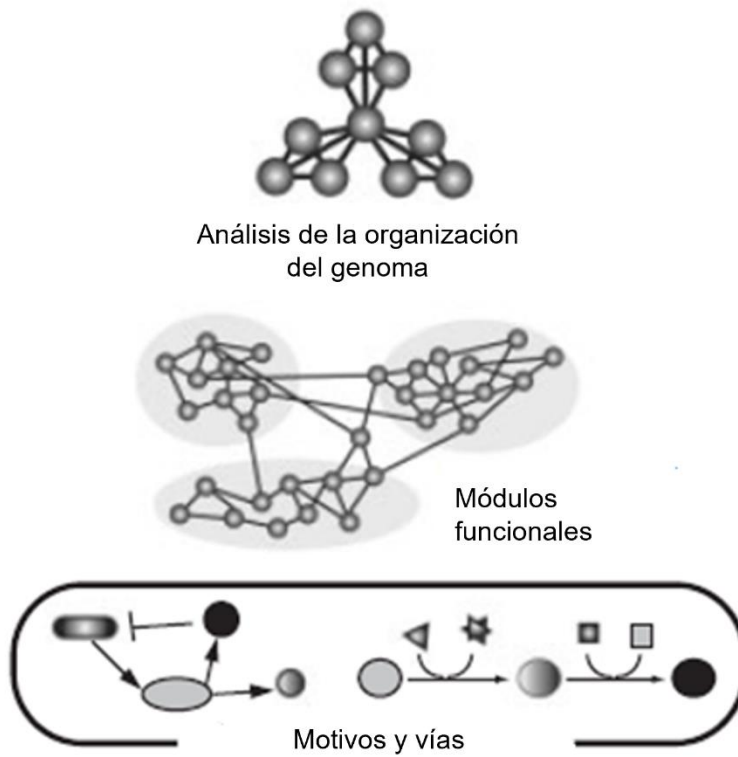


Figura 9. Estructura jerárquica de redes celulares. Adaptación de Emamjomeh et al. (2017).

Particularmente el análisis de redes de co-expresión, pone énfasis en identificar módulos y motivos topológicos, ya que las funciones biológicas se atribuyen a grupos de genes (Aoki et al., 2007). En el caso del estudio sobre el papel del metabolismo de auxinas en la regulación de la TFF en orquídeas, la identificación de módulos y motivos locales es altamente informativa para dilucidar los procesos regulatorios específicos (Aoki et al., 2007).

3. ANTECEDENTES

La mayor parte de los estudios sobre la TFF, que emplean un enfoque de transcriptómica diferencial con análisis de redes de co-expresión, se ha concentrado en organismos como *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) (tomate), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) (uva), *Cicer arietinum* L. (Fabaceae) (garbanzo) y *Fragaria vesca* L. (Rosaceae) (fresa) (Fukushima et al., 2012; Singh et al., 2017; Shahan et al., 2018; Fajardo & Quecini, 2021).

Dentro de ellos, una de las fuentes de variación más estudiadas es el efecto de la fenología del organismo sobre las redes de co-expresión; particularmente, se ha observado que existe un perfil de expresión específico para cada etapa de desarrollo, lo que permite modelar las posibles relaciones regulatorias durante la TFF (Singh et al., 2017; Shahan et al., 2018).

En *F. vesca*, se analizaron 46 transcriptomas de diferentes momentos del desarrollo de flor y fruto que sugirieron la existencia de tres módulos funcionales asociados a las etapas (1) pre-polinización, (2) polinización-fecundación y (3) desarrollo del fruto. En cada módulo se identificaron interacciones entre genes con redundancia funcional y factores de transcripción como genes *hub* en la red. Además, se describió que la biosíntesis de auxinas se lleva a cabo en el endospermo justo después de la fecundación; posteriormente hay transporte de hierro desde el receptáculo y endospermo, para inducir la biosíntesis de giberelinas (Shahan et al., 2018).

Por otro lado, en *C. arietinum* se analizaron 17 transcriptomas de raíz, meristemo apical del brote, tallo y hoja, asociados a distintas etapas del desarrollo, de las cuales destacan pre-polinización (conformada por pre-antesis y antesis), polinización-fecundación, flor senescente y desarrollo del fruto. Se identificaron módulos de genes de la familia *ARF* asociados a tejidos y etapas del desarrollo que permiten inferir sus relaciones regulatorias; particularmente, *ARF*, *Aux/IAA* y *GH3* regulan genes de respuesta a auxinas relacionados con ciclo celular y desarrollo (Singh et al., 2017).

En *S. lycopersicum*, se emplearon 320 microarreglos para analizar los patrones de expresión de hoja, tallo y raíz. Se identificaron módulos funcionales y genes *hub* que permitieron inferir una regulación transcripcional tejido-específica, conformada por isoformas de genes de señalización y respuesta a auxinas (Fukushima et al., 2012).

Por otro lado, el análisis del efecto de la variación funcional de distintos genotipos, sobre el perfil de expresión y la estructura de las redes de co-expresión, ha sido poco estudiado (Grimplet et

al., 2017; Fajardo & Quecini, 2021). Particularmente en el estudio realizado por Grimplet et al. (2017) se compararon los transcriptomas de cuatro genotipos de *V. vinifera* durante la antesis y fecundación para identificar redes de co-expresión relacionadas con variación fenotípica. Se documentó la existencia de variación en la topología de las redes de co-expresión del metabolismo de auxinas en cada genotipo, así como una alta correlación con el tamaño y número de frutos (Grimplet et al., 2017).

Específicamente, se observó que la sobreexpresión de genes de transporte polar (*PIN3* y *LAX1*), así como de señalización (*ARF6* y *ARF4*) generan una concentración alta de auxinas en el ovario después de la polinización que contribuye al desarrollo del embrión y evita la caída prematura de fruto en el genotipo con mayor número de bayas (Grimplet et al., 2017).

Finalmente, Fajardo & Quecini (2021), analizaron los transcriptomas de diez genotipos tanto silvestres como cultivados de *V. vinifera* en los tejidos de hojas y tallos para evaluar los cambios fenológicos y respuestas ambientales entre genotipos cultivados y silvestres a través de un análisis de expresión diferencial y de redes de co-expresión.

En este sentido, identificaron expresión diferencial y cambios en la topología de las redes entre genotipos, un mayor número de módulos funcionales en los genotipos cultivados que estaban relacionados con modificaciones fenológicas asociadas a los metabolismos de auxinas y etileno, mientras que en los genotipos silvestres había menor cantidad de módulos, los cuales se relacionaban con respuestas al estrés abiótico; por lo tanto, se identificó variación funcional asociada a distintos procesos biológicos entre genotipos (Fajardo & Quecini, 2021).

En el germoplasma de *Vanilla planifolia* (vainilla), se ha identificado que el genotipo CH-VI presenta perfiles de mayor rendimiento que se correlacionan con mayor susceptibilidad a la caída prematura de ovario (Rocha-Flores et al., 2018). Mientras que el genotipo CH-I presenta perfiles de menor rendimiento correlacionados con mayor tolerancia a la caída prematura de ovario (Rocha-Flores et al., 2018).

Asimismo, en dicho genotipo se han descrito cambios en la expresión de los genes *VpARF8* y *VpTIR1* durante cuatro etapas de la TFF. Adicionalmente, se ha planteado que existe una respuesta genotipo dependiente en la expresión genética de *VpIAA25-like* que probablemente modifica la TFF entre los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia* (Hernández-Miranda et al., 2020).

Hasta el momento se cuenta con poca información a nivel molecular sobre del síndrome post-polinización de *V. planifolia* y su relación con la problemática de caída prematura de ovarios

(O'Neil 1997; Hernández-Miranda et al., 2020). Aunado a que no se conoce una explicación adecuada sobre la regulación del metabolismo de auxinas durante la TFF en *V. planifolia*. Se plantea que es importante integrar el papel de la variación funcional durante la TFF, para desarrollar estrategias de intervención en la problemática de caída prematura y conservación de su germoplasma (Mimura et al., 2016; Hernández-Miranda et al., 2020; Fajardo & Quecini, 2021).

4. HIPÓTESIS

- Si existe variación funcional asociada al metabolismo de auxinas durante la TFF, entre los genotipos CH-I (tolerante a la caída prematura de ovario) y CH-VI (susceptible a la caída prematura de ovario), entonces, existen patrones de expresión diferencial durante las etapas del desarrollo (pre-polinización, polinización, post-polinización y fecundación); así como diferencias en las redes de co-expresión, entre genotipos.

5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las diferencias en los perfiles de expresión del metabolismo de auxinas entre las etapas del desarrollo pre-polinización, polinización, post-polinización y fecundación?

¿Cuáles son las diferencias en la topología de las redes de co-expresión del metabolismo de auxinas entre los genotipos CH-I (tolerante a la caída prematura de ovario) y CH-VI (susceptible a la caída prematura de ovario)?

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar el transcriptoma diferencial asociado con el metabolismo de auxinas, en ovarios durante la transición de flor a fruto de los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia* Andrews.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar perfiles de expresión relacionados con el metabolismo de auxinas durante cuatro etapas de la transición de flor a fruto (pre-polinización, polinización, post-polinización y fecundación) en los genotipos CH-I (tolerante a la caída prematura de ovario) y CH-VI (susceptible a la caída prematura de ovario) de *V. planifolia*.
- Modelar y analizar las redes de co-expresión del metabolismo de auxinas para los genotipos CH-I y CH-VI.
- Identificar módulos funcionales y genes clave a partir de las redes de co-expresión del metabolismo de auxinas, durante la transición de flor a fruto en los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia*.

7. MÉTODO

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y EXTRACCIÓN DE RNA

Se colectaron flores de cuatro etapas del desarrollo en dos genotipos de *Vanilla planifolia*: el genotipo tolerante a caída prematura de ovario (CH-I) fue colectado en el municipio de Pantepec, perteneciente al estado de Puebla y el genotipo susceptible a caída prematura de ovario (CH-VI), se colectó en el Municipio de San Rafael en estado de Veracruz (Salazar-Rojas et al., 2016). El material se almacenó en la solución de preservación RNA $later$ [®] (SIGMA) y/o en N₂ líquido. El gineceo se separó y se trituró con N₂ líquido.

Posteriormente se realizó la extracción de RNA_{Total} con el *kit Direct-zol RNA Miniprep plus*[®] siguiendo las instrucciones del fabricante, se verificó la integridad del RNA_{Total} mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se calculó la concentración de RNA de las muestras, mediante el espectrofotómetro *NanoDrop One* (Thermo Scientific).

La integridad y pureza del ARN, se evaluó a través de un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA); se utilizaron las muestras de RNA con valores de RIN > 6 para la síntesis de cDNA y secuenciación masiva.

7.2 GENERACIÓN DE BIBLIOTECAS DE cDNA Y SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN

Las bibliotecas de cDNA de cada muestra se generaron a partir de RNA_{Total} y de la utilización del *kit TruSeq RNA Sample Prep Kits v2* (Illumina, Inc., San Diego, CA). Se obtuvieron un total de ocho bibliotecas que posteriormente fueron indexadas y agrupadas.

La secuenciación de bibliotecas de cDNA, se llevó a cabo en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UUSMB IBT-UNAM) a través de la plataforma *Illumina Nextseq 500*, con una configuración para lecturas de extremo emparejado y una longitud de 76pb.

7.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Después de la secuenciación se obtuvieron datos de lecturas crudas en formato *fastq*, los cuales fueron procesados a través de un flujo de trabajo de cuatro pasos:

- (1) Análisis de calidad, recorte y filtrado de secuencias.
- (2) Ensamble de *novo*.
- (3) Cuantificación de transcritos y análisis de expresión diferencial.
- (4) Anotación funcional.

El flujo de trabajo se realizó mediante programas informáticos nativos del sistema operativo *Linux/Ubuntu*, y bajo los lenguajes de programación *Perl* y *R versión 4.0.4* (material disponible

en: <https://github.com/Andrea-H-M/MetodoTesis>) con distintas paqueterías, bases de datos y programas disponibles en internet que se mencionarán en cada sección.

7.3.1 ANÁLISIS DE CALIDAD, RECORTE Y FILTRADO DE SECUENCIAS

El análisis de calidad de las secuencias del transcriptoma se realizó en el programa *FastQC versión 0.11.9*. Se verificó el *valor Phred* de cada nucleótido, longitud de las secuencias, porcentaje de GC, secuencias duplicadas y adaptadores (Andrews, 2010).

Con esta información se realizó un recorte y filtrado en el programa *Trimmomatic versión 0.39* para eliminar adaptadores a partir de un rango de error de 2 bases por cada 30 y *valor de Phred* mínimo de 15 para obtener secuencias con longitudes mínimas de 30 bases (Bolger et al., 2014).

7.3.2 ENSAMBLE DE NOVO

Se realizó un ensamble de *novo* del transcriptoma de la TFF de *V. planifolia* en el programa *Trinity versión 2.4* para obtener *contigs* (Región consenso resultante del pseudoalineamiento de secuencias cortas de DNA. La evaluación de la calidad del ensamble se realizó a partir de la métrica del número total de *contigs*, total de bases ensambladas, longitud media de *contig* y se realizó el estadístico ExN50 para obtener el valor E95N50 (Haas et al., 2013).

Posteriormente se realizó un análisis en el programa *BUSCO v4* para explorar la integridad de las secuencias de ortólogos conservados, a partir de la base de datos *Liliopsida odb10**, siguiendo los parámetros predeterminados en el programa (Seppey et al., 2019).

7.3.3 CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Se realizó un mapeo basado en pseudoalineación de las lecturas contra el transcriptoma ensamblado, para cuantificar la expresión de los transcritos en *TPM (Transcripts Per Million)* a través de los programas *Salmon v0.8.0* y *Trinity 2.4* (Patro et al., 2017). Posteriormente se realizó el cálculo de expresión diferencial entre los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia* con la biblioteca *DESeq2* del lenguaje de programación *R 4.0.4* (Love et al., 2014). La determinación de significancia en la expresión diferencial entre genotipos, se estableció a partir del criterio de $\text{Log}_2 \text{Fold change} \geq 2$ y $p\text{-value} \leq 0.05$ (Singh et al., 2017).

7.3.4 ANOTACIÓN FUNCIONAL

Se obtuvieron secuencias en aminoácidos a partir de una búsqueda de los marcos abiertos de lectura con el programa *TransDecoder* (Solano-De La Cruz et al., 2019). Posteriormente se realizó la anotación de los transcritos con el programa *Trinotate* a través de tres estrategias de anotación y sus respectivas bases de datos (Bryant et al., 2017):

- (1) Búsqueda de homología de secuencias a partir de alineamientos con la base de datos de *UniProt* mediante las herramientas *Blastp* y *Blastx* (UniProt Consortium, 2015).
- (2) Identificación de dominios de proteínas a partir del modelo de *cadena de markov* y la base de datos de dominios *PFAM* (Bateman et al., 2004).
- (3) Asignación de términos *GO* (*Gene Ontology*) de identificación a través de la base de datos de anotación *Pannzer* (Koskinen et al., 2015).

Posteriormente para filtrar los genes con términos *GO*, relacionados con el metabolismo de auxinas, se programó un código de comandos en el lenguaje de programación *R*. Finalmente, se validó la presencia de los dominios de proteínas a través de una revisión con intervención manual de 70 secuencias del metabolismo de auxinas, presentes en *V. planifolia* que se tomaron al azar.

7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se analizaron como fuentes de variación, cuatro etapas de desarrollo del fruto y dos genotipos de *V. planifolia* (Figura 10). Las etapas del desarrollo se determinaron a partir de los patrones de expresión relativa de genes del metabolismo de auxinas durante la TFF de *V. planifolia* propuestas por Hernández-Miranda, et al. (2020). Las etapas consideradas fueron: (1) pre-polinización (el botón floral previo a la antesis), (2) Polinización (flor en antesis con el polen depositado en el estigma), (3) post-polinización (ovario 25 días después de su polinización. Y fecundación (ovario con óvulos fecundados 60 días después de su polinización).

Etapas del desarrollo









Genotipos	Pre-polinización	Polinización	Post-Polinización	Fecundación
CH-I (Tolerante)				
CH-VI (Susceptible)				

Figura 10. Diseño experimental con dos genotipos de vainilla (CH-I y CH-VI) y cuatro etapas de desarrollo del ovario (pre-polinización, polinización, post-polinización y fecundación). Adecuación de Hernández-Miranda, et al. (2020).

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A continuación, se describen los análisis estadísticos realizados bajo el lenguaje de programación *R 4.0.4* con distintas paqueterías y bases de datos:

7.5.1 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS *HEAT MAP*

Se realizó un análisis de conglomerados tipo *Heat map* para conocer el perfil global de expresión de los genes del metabolismo de auxinas, en las cuatro etapas del desarrollo de los genotipos CH-I y CH-VI. En este sentido, los datos de expresión se normalizaron a partir de una transformación logarítmica (*Log2*) y posteriormente el análisis de conglomerados se realizó en la biblioteca *gplots* con un método de *medición de distancias euclidianas* clásica como medida de distancia y método de *agrupamiento de enlace promedio* que generan agrupaciones de la expresión génica por niveles de expresión (Liu et al., 2016; Solano-De La Cruz et al., 2019).

7.5.2 CONSTRUCCIÓN DE REDES DE CO-EXPRESIÓN

Para modelar e inferir los vínculos funcionales entre genes del metabolismo de auxinas durante la TFF de los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia*, se construyeron redes de co-expresión con un umbral absoluto de *correlación de Pearson de 0.99* para considerar que dos genes se co-expresan significativamente (Romero-Campero et al., 2016).

Se calculó el grado de nodo, conectividad promedio, propiedad de escalamiento libre y frecuencia de grados a partir de la biblioteca *igraph* para identificar la red de co-expresión óptima para cada genotipo (Contreras-López et al., 2018).

7.5.3 ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE LAS REDES DE CO-EXPRESIÓN

Para determinar si las redes de co-expresión que se construyeron eran de libre escala, se calculó el *Log10* del grado de nodo (K) y *Log10* del número de nodos con K enlaces [$P(K)$] para realizar una regresión lineal, saber si existe relación lineal entre las variables y si la distribución de grado de nodo sigue una ley de potencias negativa ($P(k) \sim k^{-\gamma}$) (Barabási & Oltvai, 2004; Romero-Campero et al., 2016).

Para comprobar si el coeficiente de agrupamiento medio es suficientemente alto y la longitud del camino mínimo entre nodos es lo suficientemente corta como para considerarla de mundo pequeño, se construyeron 10,000 redes aleatorias con el mismo número de nodos y aristas a partir del modelo de *gráfico aleatorio de libre escala Barabasi* y la biblioteca *igraph* (Barabási & Oltvai, 2004; Romero-Campero et al., 2016; Contreras-López et al., 2018).

La representación gráfica de la red se realizó en el programa *Cytoscape 3.8.2* con el método *organic layout* ya que tiene el efecto de exponer la estructura de agrupación de la red a través de generar que los nodos produzcan fuerzas repulsivas y las aristas fuerzas de atracción (Shannon et al., 2003; Romero-Campero et al., 2016).

7.5.4 IDENTIFICACIÓN DE MÓDULOS FUNCIONALES

La identificación de módulos funcionales entre los genes del metabolismo de auxinas se realizó mediante la técnica de *clustering* que mide la similitud entre grupos utilizando la correlación entre los perfiles de expresión. A partir de dicho parámetro, se distinguieron grupos disjuntos o agrupaciones de genes con alto nivel de co-expresión dentro del grupo (similitud intra-cluster)

así como grupos con bajo nivel de co-expresión entre genes de diferentes grupos (similitud-inter-grupo) (Romero-Campero et al., 2016; Contreras-López et al., 2018).

Para seleccionar el algoritmo de *clustering* y el número de clusteres más explicativos sobre la estructura de las redes de co-expresión, se utilizó el *criterio de silueta* debido a que combina la minimización de similitud inter-cluster con la maximización de la similitud intra-cluster (Romero-Campero et al., 2016). Se comparó el rendimiento de los dos algoritmos de *clustering*: (1) *agrupamiento jerárquico (HCLUST)* y (2) *partición alrededor de los medoides (PAM)* para diferentes números de grupos que van del 1 a 10 clusteres a través de la biblioteca *clValid* (Romero-Campero et al., 2016). Una vez identificado el número de clusteres que describe la estructura subyacente de cada red de co-expresión, se graficaron los módulos funcionales en el programa *Cytoscape 3.8.2* (Shannon et al., 2003; Romero-Campero et al., 2016).

7.5.5 IDENTIFICACIÓN DE GENES *HUB* JERARQUIZADOS

Adicionalmente, se utilizó el concepto de gen *hub* jerarquizados (GHJ) para definir aquellos genes con mayor número de enlaces en la red, que determinan su dinámica y que además se co-expresa con otros genes *hub* jerarquizados para formar un núcleo regulatorio que dirige un proceso biológico (Romero-Campero et al., 2016).

La identificación de GHA, se realizó a partir del cálculo de *hub score* basado en los *algoritmos de Kleinberg* a través de la biblioteca *igraph* para asignar un valor entre 0 y 1 a cada nodo de la red (Kleinberg et al., 2011). Se consideraron como genes *hub* jerarquizados en la red, aquellos que presentaran un valor de *hub score* mayor a 0.8 (Romero-Campero et al., 2016). Finalmente, los genes *hub* jerarquizados se representaron gráficamente en las redes de co-expresión, a través del programa *Cytoscape 3.8.2* (Romero-Campero et al., 2016).

7.4.6 DIAGRAMA DE VENN

Para representar de manera gráfica las coincidencias y diferencias en el número de genes *hub* jerarquizados entre genotipos, se elaboró un *diagrama de Venn* en la plataforma *Multiple List Comparator* (Molbiotools, 2021).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ENSAMBLE *DE NOVO* Y ANOTACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA

Se secuenciaron ocho bibliotecas de cDNA, que corresponden a cuatro etapas del desarrollo del fruto de dos genotipos de *V. planifolia*. Se obtuvo un total de 147,343,104 lecturas secuenciadas y un promedio de 18,417,888 lecturas por muestra (Cuadro 1). Posteriormente, se realizó un recorte y filtrado de secuencias para obtener 66,009,079 lecturas de extremo emparejado y 332,927 lecturas no pareadas (Cuadro 1).

Dichas lecturas de extremo emparejado se emplearon para realizar el ensamble *de novo*, del cual se obtuvieron 47,843 genes y 97,782 *contigs* con una longitud promedio de 417 pb (Cuadro 1).

Se realizó el estadístico ExN50 y se graficó el porcentaje expresado (Ex) vs. la longitud del *contig* ExN50. Se identificó el punto de saturación del ensamblaje en el 95% de la expresión total, donde se reporta un E95N50 de 1555pb y un conteo de 14537 *contigs* (Figura 11-A y Cuadro 1).

Cuadro 1. Ensamble *de novo* del transcriptoma de TFF en *V. planifolia*.

Secuenciación y procesamiento		Ensamble <i>de novo</i>		Características de los <i>contigs</i>	
Total de lecturas secuenciadas	147,343,104	Total de genes	47,843	Longitud media del <i>contig</i> (pb)	417
Lecturas de extremo emparejado	66,009,079	Total de <i>contigs</i>	97,782	Promedio de los <i>contig</i>	838.94
Lecturas no pareadas	332,927	Porcentaje de GC (%)	43.91	Total de bases ensambladas	40,137,513
		E95N50 (pb)	1,555		
		<i>Contigs</i> E95	14,537		

Los *contigs* se mapearon con la base de datos *Liliopsida odb10** para conocer la integridad de secuencias de ortólogos conservados.

Se identificó que el 84% de los *contigs* son ortólogos completos, el 8% están fragmentados y el 7% son secuencias faltantes (Figura 11-A).

Posteriormente se buscaron marcos abiertos de lectura y se realizó la anotación funcional de secuencias de aminoácidos en las bases de datos *UniProt*, *PFAM* y *Pannzer* para la asignación de términos GO.

Se anotaron 30,762 genes a través de las tres bases de datos y se identificó que 2% de estos genes pertenecen al metabolismo de auxinas (Figura 11).

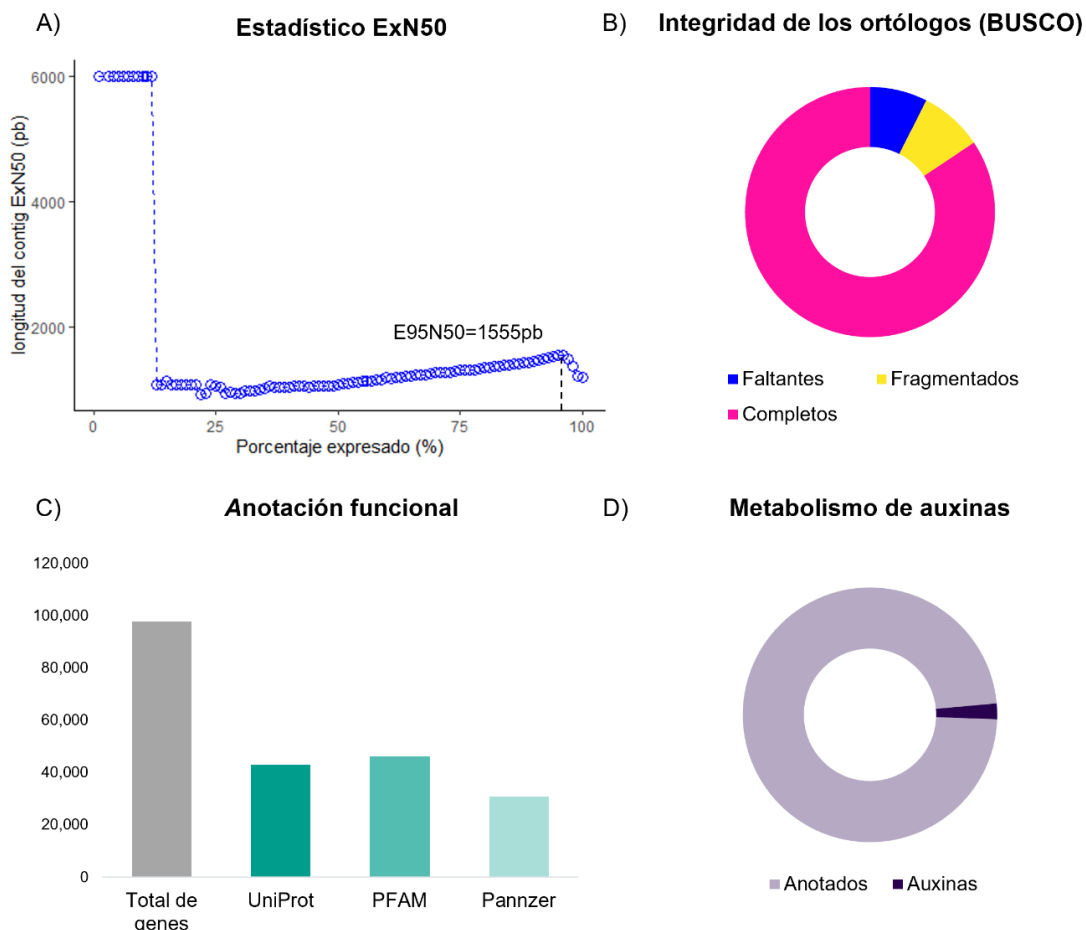


Figura 11. Métricas del ensamblaje y anotación funcional del transcriptoma. A) Porcentaje de expresión vs. la longitud del *contig* ExN50. B) Integridad de los ortólogos conservados que se

mapearon en la base de datos *Liliopsida odb10**. C) Genes con anotación funcional en las bases de datos *UniProt*, *PFAM* y *Pannzer*. D) Porcentaje de genes del metabolismo de auxinas presentes en el transcriptoma.

La utilización de la estrategia de análisis descrita por Solano-De la Cruz et al. (2019) para el transcriptoma de raíz de vainilla, permitió obtener un alto porcentaje de ortólogos conservados y genes anotados funcionalmente, en el presente estudio sobre el transcriptoma de ovario de *V. planifolia* (Figura 11).

8.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL METABOLISMO DE AUXINAS

Se identificaron un total de 625 genes relacionados con el metabolismo de auxinas durante la TFF de *Vanilla planifolia*, de los cuales seis presentaron expresión diferencial significativa ($\text{Log}_2 \text{Fold change} \geq 2$ y $p\text{-value} \leq 0.05$), con sobreexpresión en el genotipo CH-I (Cuadro 2).

De acuerdo con la anotación funcional en la base de datos de *Gene Ontology*, la mayoría de estos genes están relacionados con procesos biológicos como la homeostasis de auxinas, vía de señalización activada por auxinas, transporte polar de auxinas, acetilación de histona, proceso biosintético de lignina, transporte de aminoácidos, ubiquitinación de proteínas y regulación de la transcripción (Cuadro 2).

A nivel molecular, la mayoría de las secuencias registraron como principal función: actividad transferasa, actividad transportadora de aminoácidos, sitios de unión a DNA, auxinas y unión a ATP (Cuadro 2).

Mientras que a nivel celular, los genes se relacionaron con funciones en el citosol, membranas, núcleo, componente interno de la membrana, envoltura del cloroplasto y mitocondrias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Genes del metabolismo de auxinas expresados diferencialmente entre genotipos. Se muestra el nombre de acuerdo con la nomenclatura *Uniprot*, términos *GO* en las categorías de proceso biológico, función molecular y componente celular.

Gen	Proceso biológico	Función molecular	Componente celular
VpAVT6D	Transporte de aminoácidos y vía de señalización activada por auxinas.	Actividad transportadora de aminoácido y actividad simportadora.	Componente interno de la membrana.
VpRUS2	Transporte polar de auxina, respuesta a UV-B y acetilación de histona.		Envoltura del cloroplasto y mitocondrias.
VpPHT1	Regulación positiva del proceso biosintético de flavonoides, homeostasis de las auxinas y proceso biosintético de la lignina.	Actividad transferasa.	Citosol y membrana.
VpFBX14	Ubiquitinación de proteínas, proceso catabólico de proteínas dependiente de ubiquitina proteasoma dependiente de SCF y vía de señalización activada por auxina.	Unión de hexakisfosfato de inositol, unión de auxina y unión de proteínas.	Núcleo.
VpAVT6C	Transporte de aminoácidos, vía de señalización activada por auxinas y transporte transmembrana de ácido carboxílico.	Actividad transportadora transmembrana de aminoácidos y actividad simportadora	Componente interno de la membrana.
VpARF12	Vía de señalización activada por auxinas y regulación de la transcripción.	Unión de ADN, unión de polisacáridos, actividad de proteína quinasa y unión de ATP.	Núcleo y componente interno de la membrana.

En estudios sobre la regulación genética del metabolismo de auxinas en *Vitis vinifera*, se encontró una respuesta similar a la registrada en el genotipo CH-I de vainilla, donde un genotipo en particular de *V. vinifera*, presentó un patrón de sobreexpresión de genes de señalización (*ARF6* y *ARF4*) y transporte (*PIN3* y *AUX1*) que se asocia con una concentración baja de auxinas en el ovario después de la polinización, que estimula la producción y retención de frutos (Grimplet et al., 2017). Particularmente, en estudios previos en *Vanilla planifolia*, se identificó que el gen *VpIAA25-like*, de señalización de auxinas, presenta un proceso de sobreexpresión en el genotipo CH-I que se correlaciona con la tolerancia a la caída prematura de ovario (Hernández-Miranda et al., 2020).

En este sentido se ha descrito que en las angiospermas, el metabolismo de auxinas media las respuestas a estímulos externos e internos, a través de cambios en la concentración de auxinas en los tejidos, a través la regulación de la expresión genética de las vías de señalización,

transporte y conjugación de auxinas (Delker et al., 2010; Habets & Offringa, 2014). Sin embargo, es necesario analizar los patrones de cambio en la expresión del metabolismo de auxinas durante las diferentes etapas de TFF, para conocer las diferencias temporales en los perfiles de expresión entre genotipos.

8.2.1 PERFIL DE EXPRESIÓN GLOBAL DURANTE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO

A través de un análisis *Heatmap*, se evaluó gráfica y cuantitativamente, el nivel de expresión de cada gen del metabolismo de auxinas, durante las cuatro etapas en la transición de flor a fruto en los dos genotipos de *V. planifolia* (Figura 12).

De manera general se observó que la mayoría de los genes del metabolismo de auxinas presentaron subexpresión durante la TFF y se distinguieron tres perfiles de expresión genética que se representan con color azul, verde y rosa en el dendrograma del lado izquierdo (Figura 12):

- 1) Perfil azul integra un patrón de expresión registrado únicamente en la etapa de fecundación del genotipo CH-I.
- 2) Perfil verde muestra similitud en el patrón de expresión de las etapas de post-polinización del genotipo CH-I y fecundación del genotipo CH-VI. Es decir, a pesar de que la polinización se realizó al mismo tiempo en ambos genotipos, el perfil de expresión que se observa en el tejido en etapa de fecundación del genotipo CH-VI, indica que el tejido realmente se encuentra en etapas inmaduras de la TFF, similares a la etapa de post-polinización del genotipo CH-I (Hernández-Miranda et al., 2020).
- 3) Perfil rosa indica un patrón de expresión común en el resto de las etapas del desarrollo y los dos genotipos; sin embargo, existe un patrón de expresión compartido entre las etapas Pre-polinización del genotipo CH-VI y la Polinización del genotipo CH-I.

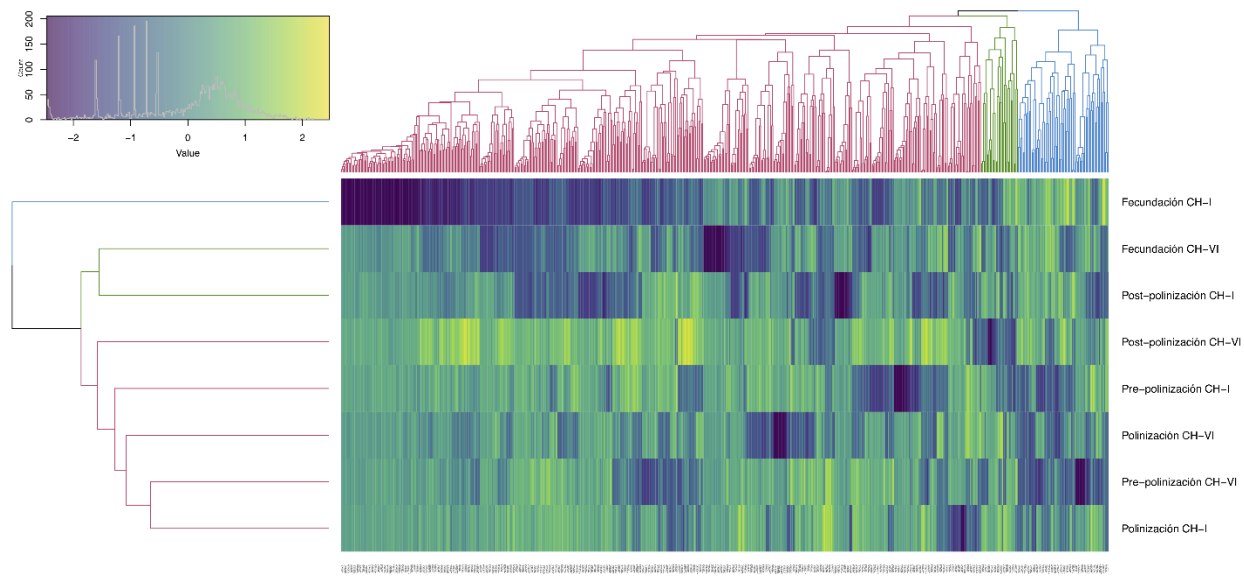


Figura 12. Dendrograma *Heatmap* de la expresión genética del metabolismo de auxinas durante la TFF en *V. planifolia*. Etapas del desarrollo: pre-polinización, polinización, post-polinización y fecundación en los genotipos CH-I (tolerante a caída de ovario) y CH-VI (susceptible a caída de ovario) de *V. planifolia*. El color morado representa niveles bajos de expresión, el color verde niveles intermedios y el color amarillo niveles altos de expresión.

De manera global, se observa que los genotipos tienen perfiles de expresión distintos en cada etapa del desarrollo, lo cual había sido identificado en estudios anteriores en *V. planifolia* a través de perfiles de expresión de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* y la expresión diferencial significativa que presenta el gen *VpIAA25-like* durante la TFF de los genotipos CH-I y CH-VI (Hernández-Miranda et al., 2020).

Sin embargo, se ha planteado que los cambios en la expresión genética, están altamente correlacionados con la configuración de redes genéticas específicas que controlan respuestas fisiológicas y del desarrollo (Fajardo & Quecini, 2021).

En este sentido, el análisis de expresión diferencial y del perfil de expresión global, se complementó con un análisis de redes de co-expresión, para poder identificar los módulos funcionales del metabolismo de auxinas, que reflejan los cambios de expresión genética del metabolismo de auxinas durante la TFF.

8.3 ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE REDES DE CO-EXPRESIÓN

Se construyeron dos redes de co-expresión para explicar los vínculos funcionales del metabolismo de auxinas durante la TFF, una para el genotipo CH-I definida como VNCH-I y otra para el genotipo CH-VI denominada como VNCH-VI (Figura 13).

VNCH-I está constituida por 615 nodos o genes que exhiben un total de 3077 relaciones de co-expresión o aristas que integran una red principal y 17 motivos con más de tres nodos (Figura 13-A). Mientras que VNCH-VI está integrada por 619 nodos o genes que exhiben un total de 5998 relaciones de co-expresión o aristas que constituyen una red principal y 14 motivos con más de tres nodos (Figura 13-B).

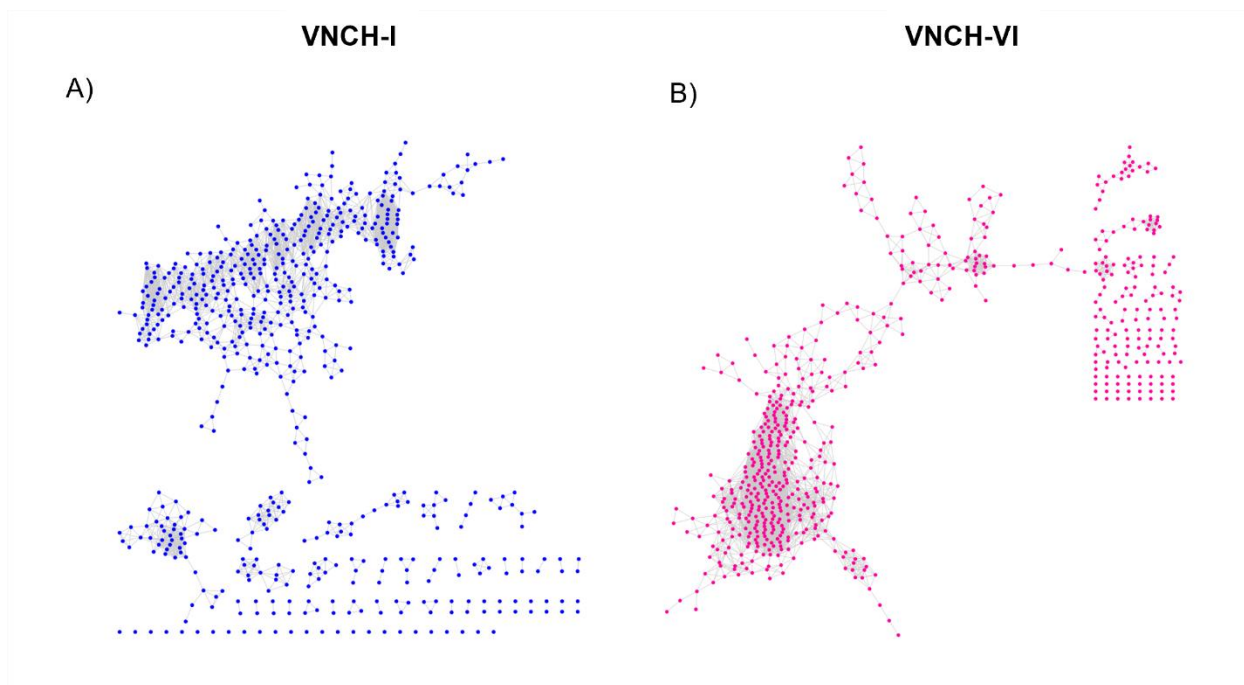


Figura 13. Redes de co-expresión del metabolismo de auxinas durante la TFF. A) Genotipo CH-I y B) Genotipo CH-VI.

Con la intención de conocer si las redes de co-expresión representan los vínculos funcionales entre genes del metabolismo de auxinas durante la TFF, se identificaron tres características topológicas universales de sistemas complejos, presentes en redes que explican fenómenos

biológicos: libre escala, coeficiente de agrupamiento medio y camino mínimo promedio (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004; Aoki et al., 2007):

8.3.1 LIBRE ESCALA

Las redes de libre escala presentan nodos con distintos números de enlaces por nodo (grado de nodo); es decir, tienen nodos con una gran cantidad de enlaces (*hub*) y nodos con uno o dos enlaces (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004).

En este sentido, cuando se grafica el grado de nodo (K) contra el número de nodos con K enlaces $[P(K)]$ se obtiene una distribución que sigue una ley de potencias negativa ($P(k) \sim k^{-\gamma}$); a diferencia de las redes aleatorias, que la mayoría de los nodos tienen el mismo número de enlaces y su distribución de grado de nodo sigue una distribución de Poisson (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004).

Por esta razón, se graficó el grado de nodo (K) contra el número de nodos con K enlaces $[P(K)]$ de las redes de co-expresión VNCH-I y VNCH-VI, donde se puede observar que la distribución de grado de nodo de ambos genotipos sigue una ley de potencias negativa (Figuras 14-A y 14-B).

La validación estadística se realizó a partir de una regresión lineal que consideró el cálculo del Log_{10} del grado de nodo (K) y Log_{10} del número de nodos con K enlaces $[P(K)]$ (Figuras 14-C y 14-D).

Derivado de esta prueba se identificó que la red VNCH-I presentó un ajuste del 70% a una distribución exponencial negativa, mientras que la red VNCH-VI presentó un ajuste del 90% a una distribución exponencial negativa (Figuras 14-C y 14-D).

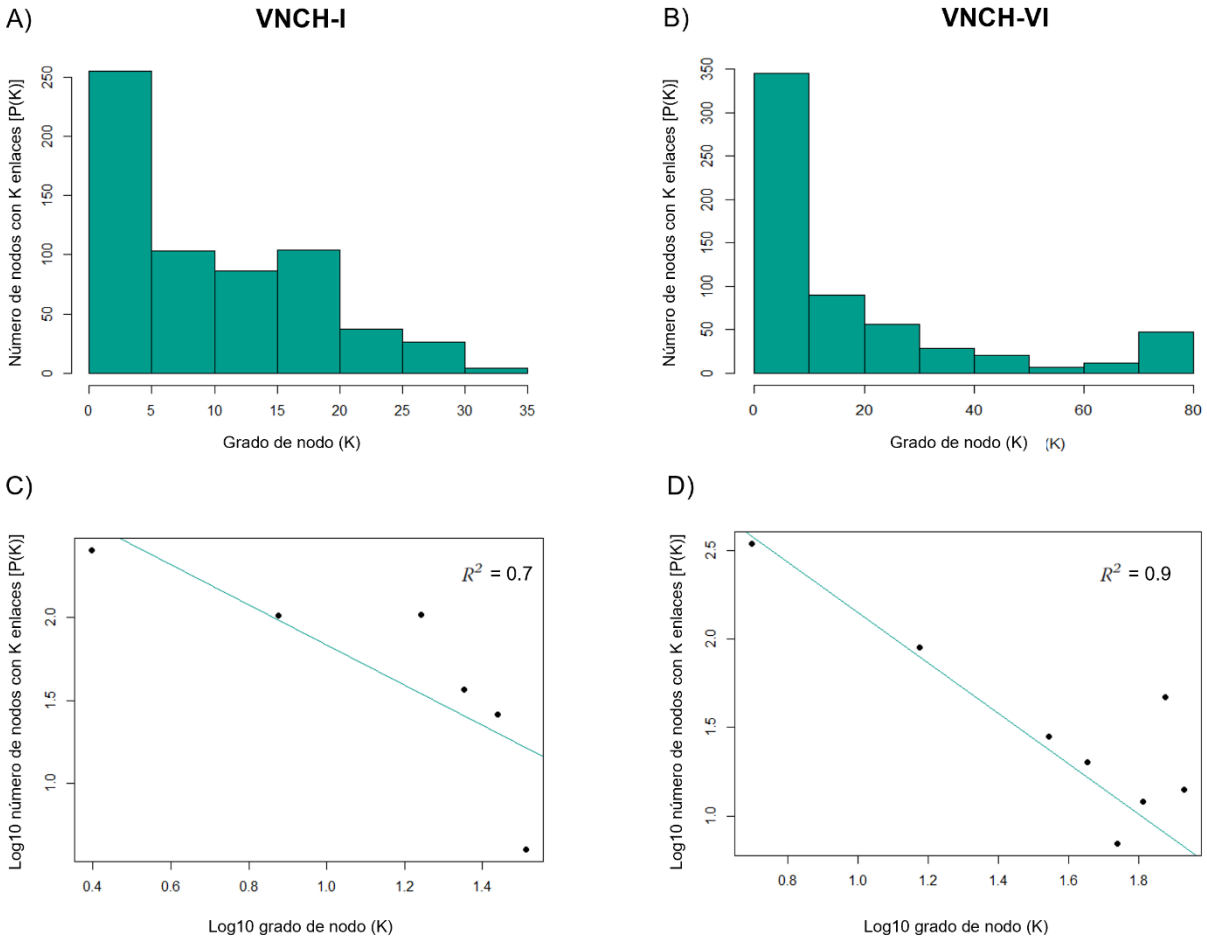


Figura 14. Distribución exponencial negativa de las redes VNCH-I y VNCH-VI. A) Gráfico del grado de nodo (K) vs. Número de nodos con K enlaces [P(K)] correspondiente al genotipo CH-I. B) Gráfico del grado de nodo (K) vs. Número de nodos con K enlaces [P(K)] correspondiente al genotipo CH-VI. C) Gráfico del Log10 del grado de nodo (K) vs. Log10 del número de nodos con K enlaces [P(K)] correspondiente al genotipo CH-I. D) Gráfico del Log10 del grado de nodo (K) vs. Log10 del número de nodos con K enlaces [P(K)] correspondiente al genotipo CH-VI.

Como las ordenadas al origen y las pendientes de VNVH-I y VNCH-VI resultaron estadísticamente significativas; se identificó relación lineal entre el *Log10* del grado de nodo y *Log10* del número de nodos con K enlaces de ambas redes (Cuadro 3). De esta manera se comprobó que la distribución de grado de nodo de las redes VNCH-I y VNCH-VI, sigue una ley de potencias negativa con valores de significancia estadística superior al 0.01, que indican que la red cubre el criterio de libre escala (Figura 14 y Cuadro 3).

Cuadro 3. Valor estimado para la ordenada en el origen y la pendiente (β_0 y β_1), error estándar, valor de T y *p-value* de cada genotipo.

VNCH-I	Valor estimado	Error estándar	Valor de T	<i>p-value</i> > T
Pendiente (β_0)	3.0487	0.5155	5.914	0.00409 **
Ordenada al origen (β_1)	-1.2128	0.4992	-2.826	0.04755 *
VNCH-VI	Valor estimado	Error estándar	Valor de T	<i>p-value</i> > T
Pendiente (β_0)	3.5783	0.2307	15.51	0.000101 ***
Ordenada al origen (β_1)	-1.4266	0.1549	-9.21	0.000772 ***

Códigos de significancia estadística: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

8.3.2 VALOR ALTO DE COEFICIENTE DE AGRUPAMIENTO MEDIO

El coeficiente de agrupamiento medio determina la densidad de aristas o relaciones de co-expresión alrededor de los genes y se conoce que las redes biológicas presentan un coeficiente de agrupamiento medio significativamente mayor en comparación con lo que se espera obtener en una red aleatoria con el mismo tamaño y distribución de grado (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004; Winterbach et al., 2013).

En este sentido, los coeficientes de agrupamiento medio para las redes VNCH-I y VNCH-VI fueron de 0.724 y 0.719 respectivamente que resultaron ser más altos en comparación con los obtenidos en 10,000 redes aleatorias construidas al azar.

Por lo tanto, se concluye que VNCH-I y VNCH-VI son redes de libre de escala no aleatorias con un alto coeficiente de agrupamiento que permite la formación de módulos funcionales (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004; Winterbach et al., 2013).

8.3.3 CAMINO MÍNIMO PROMEDIO

Generalmente las redes complejas, presentan rutas cortas entre dos enlaces tomados al azar debido a que es la manera más eficiente para estructurar una red (Barabási & Oltvai, 2004; Emamjomeh et al., 2017). En los sistemas biológicos, la longitud promedio del camino más corto

es una de las tres medidas que permiten conocer la robustez de las redes, junto con el coeficiente de agrupamiento y la distribución de grado.

En el caso de las redes VNCH-I y VNCH-VI, el valor del camino mínimo promedio entre genes fue 8.192 y 8.669 respectivamente; es decir, se puede alcanzar cualquier gen en las redes a través de aproximadamente 8 relaciones de co-expresión (Figura 9).

Con esta información se validó que las redes de co-expresión identificadas para los genotipos CH-I y CH-VI de vainilla, son de libre escala, no aleatorias y de mundo pequeño; por lo tanto, cumplen los parámetros para explicar vínculos funcionales entre genes del metabolismo de auxinas durante la TFF.

8.4 IDENTIFICACIÓN DE MÓDULOS Y MOTIVOS FUNCIONALES

Gracias a las características topológicas mencionadas anteriormente (Libre escala, coeficiente de agrupamiento medio y camino mínimo promedio), las redes biológicas presentan una organización jerárquica que permite que la expresión de los genes de todo el genoma se organice mediante módulos funcionales y subestructuras llamadas motivos (Aoki et al., 2007).

En este sentido, se identificaron y analizaron los módulos funcionales y motivos de las redes VNCH-I y VNCH-VI para conocer si existen cambios en la regulación genética del metabolismo de auxinas entre genotipos.

8.4.1 MÓDULOS FUNCIONALES

Los módulos son estructuras que surgen debido a la capacidad de las redes para formar grupos de moléculas relacionadas funcionalmente, tanto espacial como temporalmente (Barabasi & Oltvai, 2004; Emamjomeh et al., 2017).

En el caso de las redes de co-expresión VNCH-I y VNCH-VI se identificó la integración de grupos de genes a partir de matrices de distancias (Figuras 15-C y 15-D). y el número de clusteres que explican la estructura de cada red de co-expresión, mediante los algoritmos *PAM* y *HCLUST* a través del criterio de la silueta, con el fin de conocer el valor de ancho de silueta más alto (Figura 15).

En la red VNCH-I se observaron diferencias en el número de clusteres identificados por cada algoritmo. De manera que se utilizó el promedio del valor del ancho de la silueta entre los dos

algoritmos, con un valor de 0.54 que sugiere la configuración de 5 módulos funcionales (Figura 15-A). Mientras que en la red VNCH-VI, ambos algoritmos coincidieron en la identificación de 4 módulos funcionales, con un valor promedio de ancho de silueta de 0.66 entre los dos algoritmos (Figura 15-B).

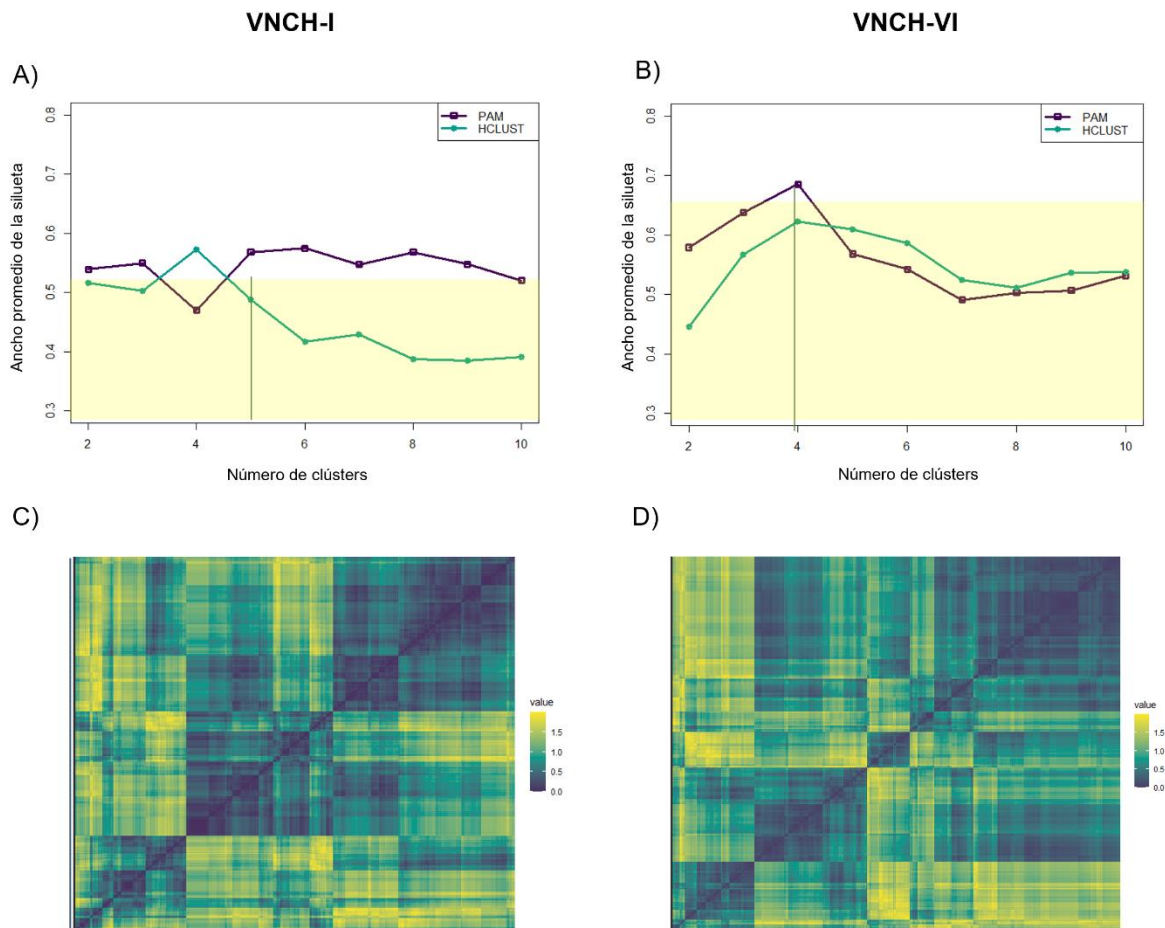


Figura 15. Número de módulos que explicar la estructura de las redes. A) Gráfico que determina el número de clusters presentes en la red del genotipo CH-I, de acuerdo con los algoritmos *PAM* (color morado) y *HCLUST* (color verde). B) Gráfico que determina el número de clusters presentes en la red del genotipo CH-VI, de acuerdo con los algoritmos *PAM* (color morado) y *HCLUST* (color verde). C) Matriz de distancias correspondiente a la red VNCH-I. D) Matriz de distancias correspondiente a la red VNCH-VI. Los vértices adyacentes presentan una distancia de 0 que se representa con color morado; mientras que los vértices que están separados tienen una distancia máxima de 2 y se representan con color amarillo.

8.4.2 MOTIVOS FUNCIONALES

Adicional a la estructura de módulos, las redes complejas tienden a generar nódulos funcionales aislados que presentan alta conectividad, sobre-regulación y pueden interactuar con nodos fuera del motivo, para formar motivos más grandes (Barabasi & Oltvai, 2004; Aoki et al., 2007).

En este sentido, la red VNCH-I presenta 17 motivos que interactúan con nodos fuera del motivo pertenecientes a distintos módulos (Figura 16). Mientras que la red VNCH-VI presenta 14 motivos que interactúan de la misma manera con módulos distintos fuera de los motivos (Figura 16). Sin embargo, cabe resaltar que existen diferencias en cuanto al número y estructura de los motivos y módulos; lo cual contribuye a generar combinaciones regulatorias distintas y sugiere una regulación diferencial muy marcada entre genotipos, en todos los niveles de jerarquía analizados en las redes de co-expresión del metabolismo de auxinas (Figura 16).

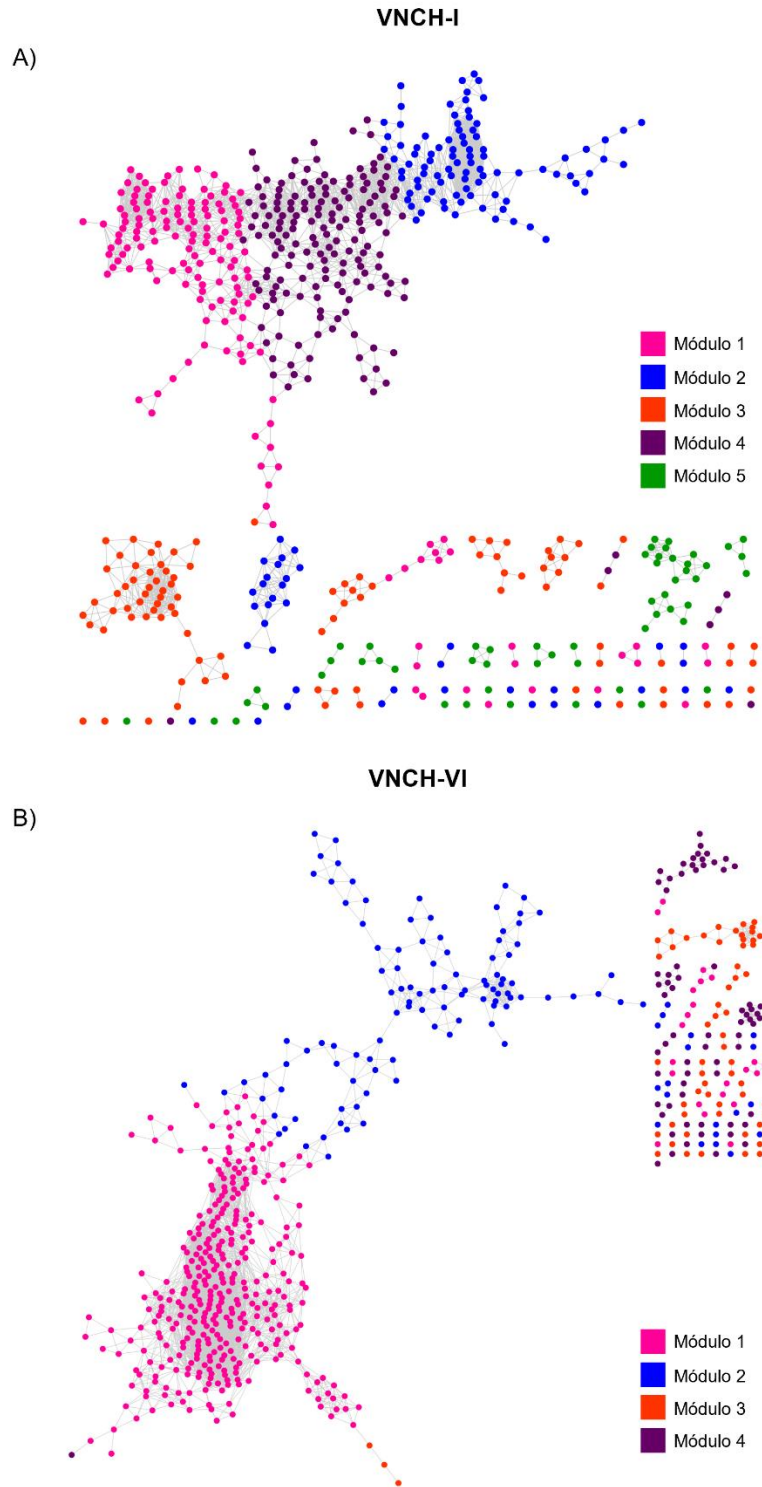


Figura 16. Módulos funcionales del metabolismo de auxinas en la estructura de las redes de co-expresión. A) Red correspondiente al genotipo CH-I) y B) Red correspondiente al genotipo CH-VI.

En este sentido, en *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* y *Solanum lycopersicum*, se describió que la variación en la estructura de las redes y el número de módulos entre redes, está relacionada con los mecanismos que controlan respuestas fisiológicas y de desarrollo en cada genotipo; por lo tanto, la variación en el número de módulos funcionales, puede considerarse como indicador de variación intraespecífica funcional (Delker et al., 2010; Grimplet et al., 2017; Sauvage et al., 2017; Fajardo & Quecini, 2021).

Por tal motivo, la identificación de variación en el número de módulos funcionales y motivos en las redes que explican el metabolismo de auxinas de los genotipos CH-I (tolerante a caída prematura de ovario) y CH-VI (susceptible a caída prematura de ovario) pueden considerarse variación intraespecífica funcional ya que, sugieren diferencias en la regulación genética de la vía de auxinas durante la TFF de *Vanilla planifolia* (Delker et al., 2010; Hernández-Miranda et al., 2020; Fajardo & Quecini, 2021).

Por otro lado, se plantea que la variación en los módulos funcionales de una red biológica, puede tener implicaciones evolutivas a nivel de linaje o incluso en procesos de domesticación, a través de la configuración de nuevos módulos o nuevas funciones habilitadas en las redes (Espinosa-Soto & Wagner, 2010).

En el caso del germoplasma cultivado de *V. planifolia* se han diferenciado cinco genotipos relacionados con variación en la composición del aroma en los frutos, que se plantea provienen de un proceso muy reciente de selección-domesticación o domesticación incipiente (Herrera-Cabrera et al., 2012; Salazar-Rojas et al., 2012).

En este sentido, en estudios sobre procesos de domesticación incipiente en plantas, se ha descrito que los principales rasgos de domesticación, son resultado de cambios en la organización y estructura de redes de co-expresión y no necesariamente por modificaciones en el genoma (Sauvage et al., 2017).

Esto coincide con lo observado en las redes VNCH-I y VNCH-VI de vainilla, que muestran cambios tanto estructurales en la topología de la red, como cambios en la organización y jerarquía de las redes (Figura 16); por lo tanto, se sugiere la existencia de cambios regulatorios asociados a la domesticación.

8.5 IDENTIFICACIÓN DE GENES *HUB* JERARQUIZADOS (GHJ)

Las redes de libre escala se caracterizan por la existencia de genes o nodos con un alto número de enlaces (*hub*) que determinan la dinámica y estructura de la red (Ravasz et al., 2002; Barabási & Oltvai, 2004).

Sin embargo, bajo la definición tradicional de gen *hub*, estos se distribuyen en toda la red biológica y esto sugiere que no se conectan con otros genes *hub*; por lo tanto, no regulan un proceso biológico común (Romero-Campero et al., 2016). En este sentido, Romero-Campero et al. (2016) plantean el concepto de *gen hub* jerarquizado (GHJ) a través del cálculo de *hub score* (puntuación de 0-1) que determina la centralidad y co-expresión de todos los genes *hub* que en conjunto configuran un núcleo regulatorio.

Con el objetivo de identificar GHJ y núcleos regulatorios se calculó el *hub score* para cada nodo de las redes VNCH-I y VNCH-VI (Figuras 17 y 18).

En la red de co-expresión VNCH-I se identificaron 29 GHJ con más de 26 enlaces y un valor de *hub score* de 1; por lo tanto, el núcleo regulatorio está muy bien definido en la topología de la red (Figura 17). Gráficamente se observa que el núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas del genotipo CH-I, se concentra en el módulo funcional 2 (Figura 17-A).

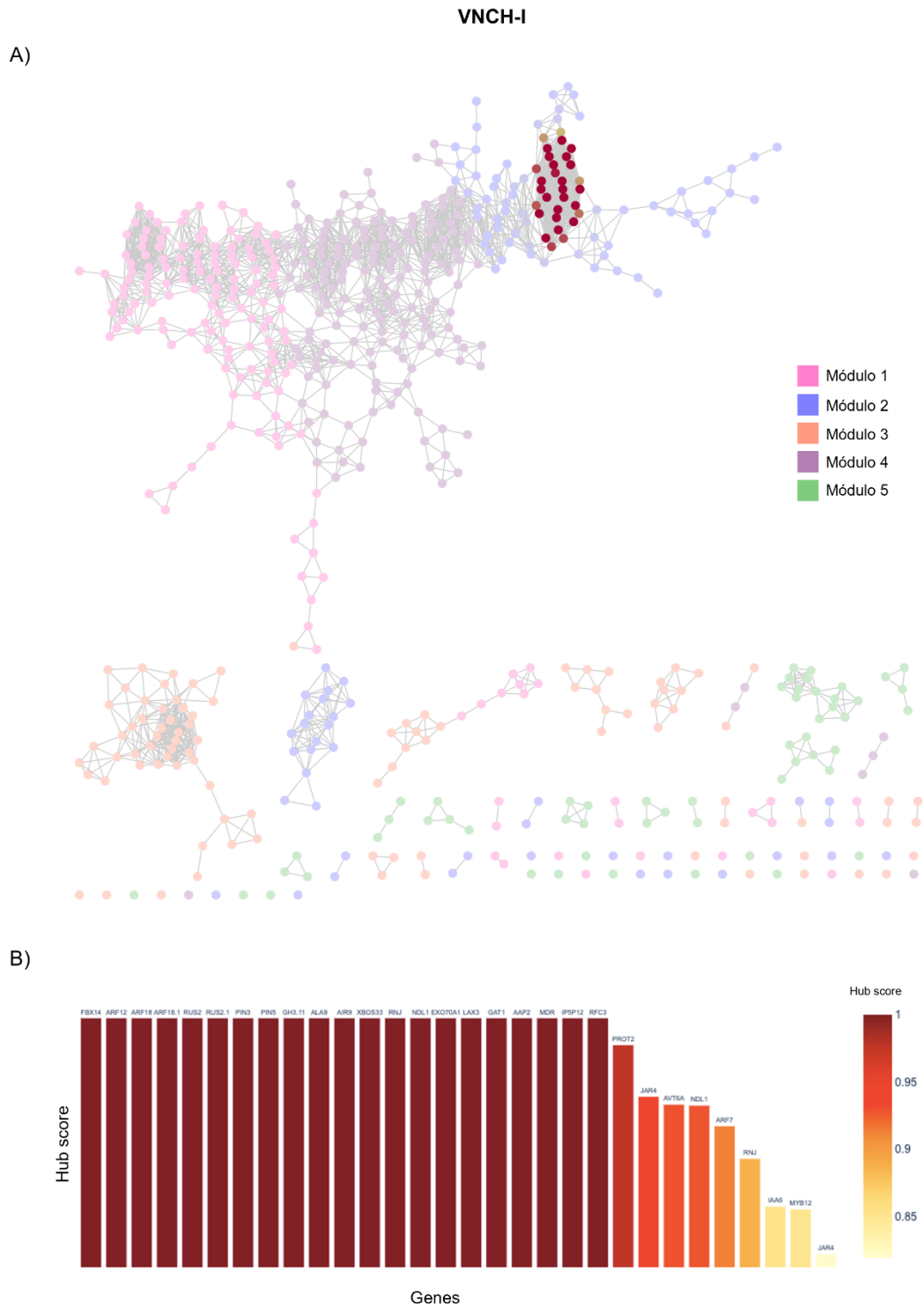


Figura 17. Genes *hub* jerarquizados de la red VNCH-I. A) Localización del núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas. B) Histograma de la puntuación de *hub score* con valores del 0.8 al 1.

En la red de co-expresión VNCH-VI se identificaron 55 GHJ con más de 71 enlaces y más de la mitad de los genes presentaron valores de *hub score* superiores a 0.9 (Figura 18). Gráficamente se observa que el núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas del genotipo CH-VI, se concentra en el módulo funcional 1 (Figura 18-A)

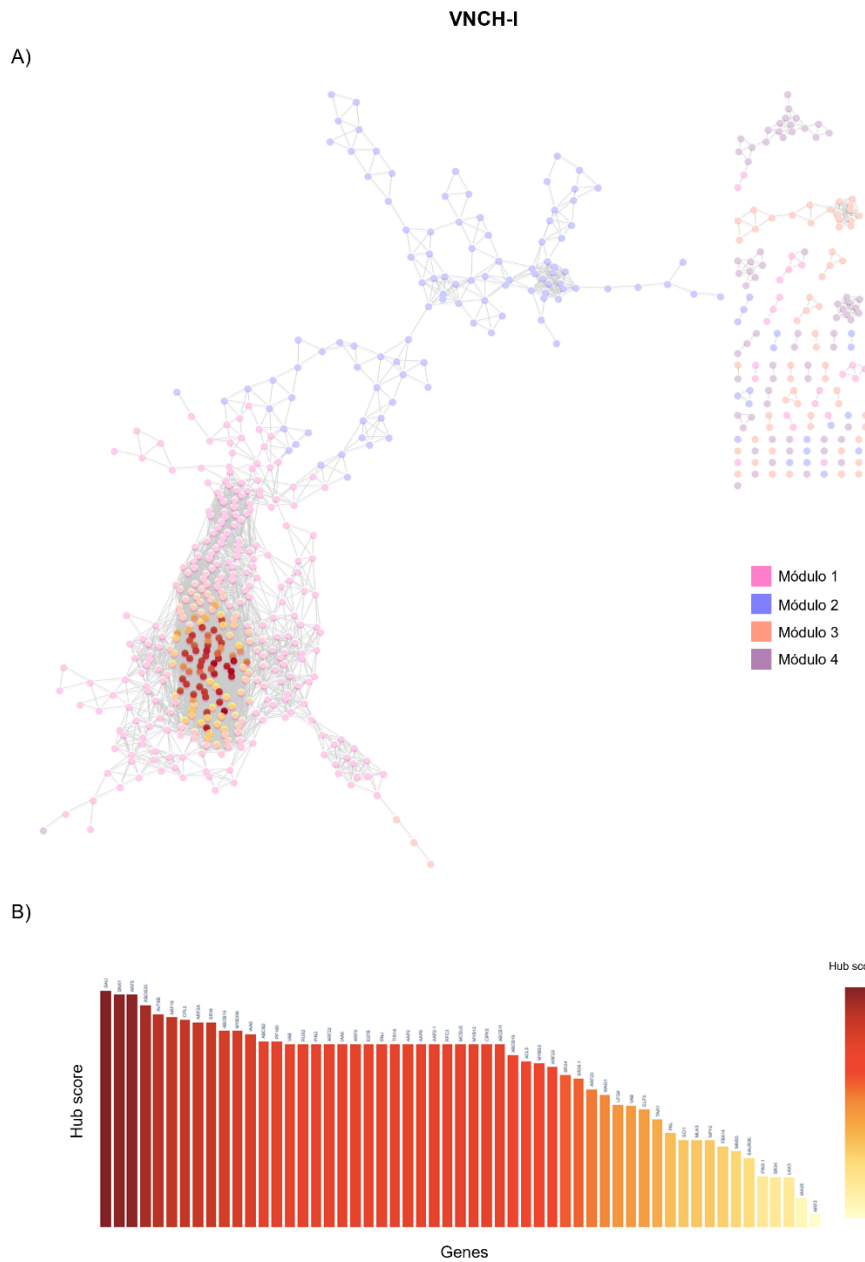


Figura 18. Genes *hub* jerarquizados de la red VNCH-VI. A) Localización del núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas. B) Histograma de la puntuación de *hub score* con valores del 0.8 al 1.

En este sentido, el surgimiento de dichos núcleos en las redes complejas es un reflejo de las características topológicas de las redes (libre escala, coeficiente de agrupamiento y camino mínimo promedio).

Concretamente, en el caso de las redes de co-expresión, estos núcleos regulatorios y genes *hub* jerarquizados surgen a través de un proceso de apego preferencial cuando se generan duplicaciones de genes, estos tienden a conectarse a genes con un alto número de conexiones regulatorias; por lo tanto, se construyen nuevos enlaces a diferente velocidad y en estos términos se plantea que los genes y proteínas con mayor número de enlaces son más ancestrales evolutivamente (Barabási & Oltvai, 2004).

En el caso de vainilla, la red VNCH-VI registró el mayor número de GHJ con un rango entre 71 y 87 enlaces, en comparación con VNCH-I que presentó genes *hub* jerarquizados con entre 26 y 29 enlaces (Figuras 17 y 18). Lo que sugiere que el proceso de apego preferencial de los genes *hub* jerarquizados del metabolismo de auxinas es más antiguo en la red del genotipo CH-VI, que corresponde al germoplasma más sensible a la interrupción en la TFF (Barabási & Oltvai, 2004).

Dado que el porcentaje de GHJ se mantiene dentro de un 5% de los genes que integran la red (Barabási & Oltvai, 2004; Romero-Campero et al., 2016), se asume que las redes VNVH-I y VNCH-VI, muestran tolerancia a errores y robustez ante mutaciones aleatorias en el metabolismo de auxinas en vainilla (Figuras 17 y 18). Por lo que los genes *hub* jerarquizados identificados, desempeñan funciones críticas en la estructura que dirige el proceso de TFF de *V. planifolia* y se proponen como candidatos altamente informativos para estudios de genómica funcional (Barabási & Oltvai, 2004; Romero-Campero et al., 2016).

8.5.1 COMPARACIÓN DE GENES *HUB* JERARQUIZADOS ENTRE GENOTIPOS

Con el fin de mostrar las diferencias y similitudes que presentan los genotipos CH-I y CH-VI respecto a los núcleos regulatorios del metabolismo de auxinas que coordinan la TFF, se realizó un *diagrama de Venn* con los GHJ (Figura 19) y una anotación funcional para asignar claves GO sobre la función de cada gen (Cuadros 4, 5 y 6).

En la figura 19 se observa que se comparten 11 GHJ entre genotipos, hay 16 GHJ exclusivos para el genotipo CH-I y 38 para el genotipo CH-VI.

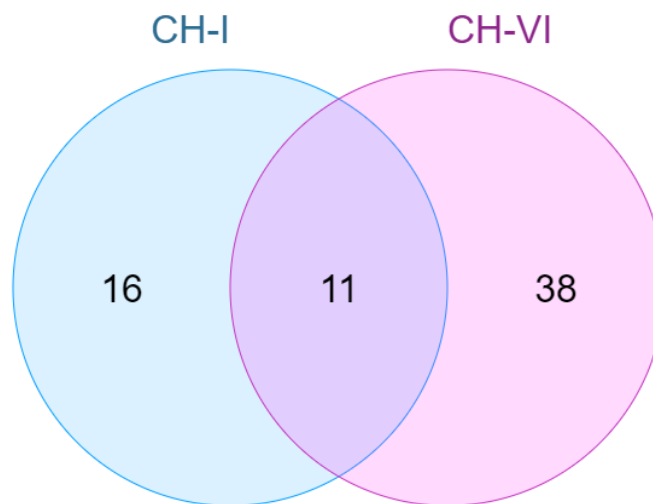


Figura 19. Diagrama de Venn de los genes *hub* jerarquizados entre los genotipos CH-I y CH-VI durante la TFF de *V. planifolia*.

De acuerdo con las categorías funcionales GO, los 11 GHJ que se comparten entre genotipos participan en procesos biológicos como: señalización activada por auxinas, respuesta de defensa, regulación de la transcripción, ubiquitinación de proteínas, transporte polar de auxinas, transporte de eflujo de auxinas, proceso biosintético del triptófano, respuesta de defensa de bacterias y respuesta a estímulo lumínico (Cuadro 4). Además, presentan funciones moleculares de activación de transportadores, actividad catalítica y como sitios de unión a DNA, proteínas, miRNA y auxinas (Cuadro 4).

En este sentido, a pesar de que las redes de co-expresión VNCH-I y VNCH-VI comparten 11 GHJ, es particularmente relevante que la mayoría de sus genes *hub* que forman parte del núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas, no se comparte y es exclusivo para cada genotipo de *V. planifolia* (Figura 19). Esto reafirma la idea de que existe variación intraespecífica funcional en el metabolismo de auxinas entre genotipos y sugiere que el núcleo regulatorio podría regular procesos distintos durante la transición de flor a fruto de cada genotipo (Delker et al., 2010; Grimplet et al., 2017; Sauvage et al., 2017; Fajardo & Quecini, 2021).

Particularmente la presencia de los genes *VpPIN3* (*Vanilla planifolia* PIN-FORMED 3) y *VpLAX3* (*Vanilla planifolia* LIKE AUX1 3) de transporte de auxinas y *VpRUS2* (*Vanilla planifolia* ROOT UV-B SENSITIVE 2), como genes *hub* en ambas redes, confirma que la base de la red de co-expresión que regula el metabolismo de auxinas en vainilla, coincide con el modelo propuesto

por Pattison et al. (2014) y Yokawa & Baluška (2015), quienes describen que el gen *RUS2* codifica una proteína sensible a la radiación UV-B, que a su vez regula la actividad de las proteínas de transporte polar de auxinas PIN3 (eflujo) y LAX3 (influjo), que se encargan de mantener activo el flujo de auxinas durante la TFF en las periferias del óvulo y el embrión en desarrollo.

Otro grupo relevante de GHJ que está presente en las redes de ambos genotipos, es el que integran *VpARF18* (*Vanilla planifolia auxin response factor 18*), *VpIAA6* (*Vanilla planifolia INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 6*) y *VpFBX14* (*Vanilla planifolia F-BOX RECEPTOR 14*). Los cuales se encargan de la detección de fluctuaciones en los niveles de auxinas, la ubiquitinación de proteínas Aux/IAA y liberación de los factores de transcripción ARF, que activan genes de respuesta a auxinas (Pandolfini et al., 2007; Calderon-Villalobos et al., 2010; Gleason et al., 2011).

Adicionalmente, en otros estudios se ha mencionado que TIR1 o FBX14 son requeridas para la activación de MYB12 (MYB DOMAIN PROTEIN 12) en respuesta a auxinas para la biosíntesis de flavonoides (Yuan et al., 2013; Tan et al., 2019). Además, el gen *RNJ* (*RIBONUCLEASE J*) puede estar involucrado en vías mediadas por auxinas durante la embriogénesis y la formación del patrón apical-basal mediante la regulación del desarrollo del cloroplasto (Chen et al., 2015). Esto coincide con los resultados ya que en ambos genotipos los transcritos de dichas proteínas forman parte del núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Genes *hub* jerarquizados del metabolismo de auxinas comunes a los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia*. Se presenta el nombre del gen de acuerdo con la nomenclatura de la base de datos *Uniprot* y los términos *GO* en las categorías de proceso biológico, función molecular y componente celular.

Gen	Proceso biológico	Función molecular	Componente celular
VpAAP2	Transporte de aminoácidos, vía de señalización activada por auxinas, transporte transmembrana y respuesta de defensa.	Actividad del transportador.	Componente integral de la membrana y membrana plasmática.
VpARF18	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, desarrollo del sépalo, regulación del proceso biosintético de antocianinas, desarrollo de pétalos, proceso de especificación de patrones, desarrollo de hojas, vía de señalización activada por ácido abscísico, desarrollo de frutos, respuesta a carbohidratos, crecimiento y división celular.	Unión a ADN y actividad hidrolasa.	Núcleo y componente integral de la membrana.
VpFBX14	Ubiquitinación de proteínas, vía de señalización activada por auxina y proceso catabólico de proteínas dependientes de ubiquitina proteasomal dependiente de SCF.	Unión a auxina y unión aaproteínas.	Complejo SCF ubiquitina ligasa y núcleo.

VpIAA6	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, vía de señalización activada por citoquinina y sistema de transducción de señales fosforiladas.	Actividad ligasa.	Núcleo, citosol y componente integral de la membrana.
VpLAX3	Transporte de aminoácidos, respuesta a la auxina, vía de señalización mediada por hormonas, transporte transmembrana y transporte polar de auxina.	Actividad del simportador y actividad del transportador transmembrana de influjo de auxinas.	Componente integral de la membrana y membrana plasmática.
VpMYB12	Respuesta a UV-B, respuesta al etileno, respuesta al estrés salino, respuesta a la auxina, regulación positiva de la transcripción y adhesión celular.	Unión a proteínas, actividad del factor de transcripción de unión al ADN y unión al ADN.	Núcleo y membrana plasmática.
VpPIN3	Vía de señalización activada por auxinas, transporte transmembrana, transporte polar de auxinas, eflujo de auxinas, homeostasis de auxinas y respuesta al estímulo lumínico.	Actividad del transportador transmembrana de eflujo de auxina.	Retículo endoplásmico, componente integral de la membrana, complejo portador de eflujo de auxina, superficie celular, membrana vesicular y mitocondria.
VpRFC3	Proceso biosintético de triptófano, proceso biosintético de auxina, replicación del ADN y reparación del ADN.	Actividad triptófano sintasa, actividad indol-3-glicerol-fosfato liasa, unión de ADN y unión a ATP.	Citosol, cloroplasto y núcleo.
VpRNJ	Hidrólisis del enlace fosfodiéster del ácido nucleico, especificación del eje longitudinal, transporte de auxinas, organización del cloroplasto y respuesta al estímulo lumínico.	Actividad de exonucleasa, unión a ARN, actividad de exonucleasa y unión de ADN.	Núcleo, componente integral de la membrana, orgánulo delimitado por la membrana intracelular y citoplasma.
VpRUS2	Transporte polar de auxinas, respuesta a UV-B y acetilación de histonas.		Envoltura de cloroplasto, mitocondria y complejo de histona.
VpXBOS33	Ubiquitinación de proteínas, regulación negativa del proceso biosintético de etileno, respuesta a auxina, proceso catabólico de proteínas dependientes de ubiquitina y regulación de la transcripción por ARN polimerasa II.	Actividad de ubiquitina-proteína transferasa, actividad del factor de transcripción de unión al ADN específico de ARN polimerasa II y unión de iones metálicos.	Núcleo y componente integral de la membrana.

En el caso del genotipo CH-I, los 16 GHJ exclusivos participan en procesos biológicos asociados con el desarrollo: vía de señalización activada por auxinas, desarrollo floral, proceso de especificación de patrones, desarrollo de fruto, regulación de la transcripción, acetilación de histonas, respuesta a la radiación UV-B, transporte de auxinas, respuesta al estímulo luminoso, transporte de lípidos, ciclo y división celular; transporte de proteínas, germinación del polen, respuesta a la luz azul y biogénesis de la pared celular (Cuadro 5). Asimismo, predominan funciones moleculares de transporte transmembranal de eflujo de auxinas y sitios de unión a DNA, proteínas, miRNA y auxinas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Genes *hub* jerarquizados del metabolismo de auxinas en el genotipo CH-I de *V. planifolia*. Se muestra su nombre de *Uniprot*, términos *GO* en las categorías de proceso biológico, función molecular y componente celular.

Gen	Proceso biológico	Función molecular	Componente celular
VpARF12	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, desarrollo de flores y fosforilación de proteínas.	Unión a ADN, unión de polisacáridos, actividad de proteína quinasa y unión a ATP.	Núcleo y componente integral de la membrana.
VpARF18.1	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, desarrollo del sépalo, regulación del proceso biosintético de antocianinas, desarrollo de pétalos, proceso de especificación de patrones, desarrollo de hojas, vía de señalización activada por ácido abscísico, desarrollo de frutos, respuesta a carbohidratos, crecimiento y división celular.	Unión a ADN y actividad hidrolasa.	Núcleo y componente integral de la membrana.
VpRUS2.1	Transporte polar de auxinas, respuesta a UV-B y acetilación de histonas.		Envoltura de cloroplasto, mitocondria y complejo de histona.
VpPIN5	Vía de señalización activada por auxinas, eflujo de auxinas, transporte polar de auxinas, homeostasis de auxinas, transporte transmembrana, respuesta a la glucosa, respuesta al etileno y respuesta a la hipoxia.	Actividad transportadora transmembrana de eflujo de auxina y unión a proteínas.	Retículo endoplásmico, componente integral de la membrana, complejo portador de eflujo de auxina, membrana plasmática basal y vacuola.
VpGH3.11	Respuesta a la auxina y respuesta al estímulo luminoso.	Actividad ligasa ácido-aminoácido.	Citoplasma, envoltura de orgánulos y orgánulo delimitado por membrana intracelular.
VpALA9	Translocación de lípidos, transporte de fosfolípidos, localización de proteínas implicadas en el transporte polar de auxinas.	Actividad transportadora de lípidos intramembrana acoplada a ATPasa, unión de iones de magnesio y unión a ATP.	Componente integral de la membrana, membrana plasmática y envoltura del cloroplasto.
VpAIR9	Respuesta a la auxina, ciclo y división celular.	Unión a proteínas	Plasmodesmos, microtúbulos corticales y membrana plasmática.
VpNDL1	Regulación del transporte polar de auxina, respuesta al ácido jasmónico, respuesta al ácido abscísico y respuesta al frío.		Componente integral de la membrana.
VpEXO70A1	Exocitosis, transporte de proteínas, crecimiento de células monopolares, localización de proteínas implicadas en el transporte polar de auxinas, proceso biosintético del mucílago implicado en el desarrollo de la cubierta de la semilla, ensamblaje de la placa celular y biogénesis de la pared celular de tipo vegetal.	Actividad de ribonucleasa híbrida ARN-ADN, unión a proteínas y unión a ácidos nucleicos.	Exoquiste, ápice del tubo polínico, placa celular, plasmodesmos, citosol, núcleo, membrana plasmática y componente integral de la membrana.
VpGAT1	Transporte de aminoácidos, vía de señalización activada por auxinas,	Actividad simportadora.	Componente integral de la membrana y

	transporte transmembrana y transporte de ácido carboxílico.		membrana plasmática.
VpMDR	Transporte transmembrana	Unión de ATP.	Componente integral de la membrana y componente intrínseco de la membrana plasmática.
VpIP5P12	Germinación de polen, homeostasis de auxina, vía de señalización mediada por azúcar, gravitropismo, respuesta a nutrientes, respuesta a luz azul, respuesta al ácido abscísico, respuesta a heridas y metilación.	Unión de S-adenosilmetionina dependiente de metaltransferasa.	Componente integral de la membrana y núcleo.
VpPROT2	Transporte de aminoácidos, vía de señalización activada por auxinas y transporte transmembrana.	Actividad del simportador.	Componente integral de la membrana y membrana plasmática.
VpJAR4		Actividad ácido-aminoácido ligasa, actividad jasmonoil-valina sintetasa, actividad jasmonoil-leucina sintetasa.	Citoplasma.
VpAVT6A	Transporte de aminoácidos, vía de señalización activada por auxinas y transporte transmembrana de ácido carboxílico.	Actividad simportadora y actividad transportadora transmembrana de aminoácidos.	Componente integral de la membrana y membrana plasmática.
VpARF7	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, senescencia de la hoja, intercambio de histonas, regulación negativa de la transcripción, regulación negativa del proceso biosintético de macromoléculas celulares.	Unión al ADN.	Núcleo y componente integral de la membrana.

En el genotipo CH-VI la mayoría de los GHJ participan en procesos biológicos asociados con la interacción ambiental: respuesta a auxinas, regulación de la transcripción, respuesta al estrés osmótico, transporte polar, respuesta a la luz ultravioleta, roja lejana y azul, respuesta a hipoxia, respuesta a bacterias, regulación del ciclo celular, ubiquitinación de proteínas, respuesta de defensa, transporte de aminoácidos, movimiento estomático, respuesta al frío, respuesta al estrés salino, metilación de histonas, respuesta al etileno, división celular, proceso biosintético de auxinas y respuesta a desajustes (Cuadro 6). Mientras que molecularmente el núcleo regulatorio tiene una función activa como sitio de unión a proteínas, ADN, ARN y ATP; así como actividad simportadora, y transporte transmembranal de eflujo de auxinas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Genes *hub* jerarquizados del metabolismo de auxinas en el genotipo CH-VI de *V. planifolia*. Se muestra su nombre de *Uniprot*, términos *GO* en las categorías de proceso biológico, función molecular y componente celular.

Gen	Proceso biológico	Función molecular	Componente celular
VpSAUR50	Terminación de la transcripción con plantilla de ADN, regulación de la transcripción, proceso de desarrollo y respuesta a la auxina.	Unión a ADN de doble hebra.	Cloroplasto.
VpSNX1	Gravitropismo positivo, homeostasis de auxina, orientación de proteínas a vacuola, transporte de endosoma a lisosoma y fosforilación de proteínas.	Unión a fosfatidilinositol, actividad de la proteína treonina quinasa, actividad de la proteína serina quinasa y unión a proteínas.	Endosoma, citosol, orgánulo delimitado por la membrana intracelular y membrana plasmática.
VpARF5	Vía de señalización activada por auxina y regulación de la transcripción.	Unión al ADN.	Núcleo.
VpAVT6B	Transporte de aminoácidos y vía de señalización activada por auxinas.	Actividad transportadora transmembrana de aminoácidos y actividad simportadora.	Componente integral de la membrana, membrana plasmática y membrana vacuolar.
VpCPL2	Respuesta al estrés osmótico, crecimiento del desarrollo y respuesta a la auxina.	Unión de ARN.	Núcleo y componente integral de la membrana.
VpARF2A	Vía de señalización activada por auxina y regulación de la transcripción.	Unión al ADN.	Núcleo.
VpSR34	Regulación del empalme alternativo de ARNm a través del espliceosoma, empalme cis de ARNm a través del espliceosoma, vía de señalización activada por auxina y transporte transmembrana.	Unión de ARN	Citosol y componente integral de la membrana.
VpABCB19	Transporte transmembrana, acumulación de antocianinas en los tejidos en respuesta a la luz ultravioleta, formación del límite de los órganos vegetales, transporte de auxinas basípetas, respuesta a la luz roja lejana, gravitropismo positivo, fotomorfogénesis, eflujo de auxinas, desarrollo del estambre, respuesta a la luz azul, regulación del tamaño celular y respuesta a la auxina.	Actividad transportadora transmembrana acoplada a ATPasa, unión a ATP y actividad transportadora transmembrana de eflujo de auxina.	Componente integral de la membrana y membrana plasmática.
VpMYB306	Respuesta hipersensible de tipo vegetal, proceso biosintético de ácidos grasos de cadena muy larga, respuesta a la hipoxia, respuesta a la auxina, respuesta a la bacteria y regulación de la transcripción.	Unión a proteínas, actividad del factor de transcripción de unión al ADN y unión al ADN.	Núcleo.
VpABCB2	Transporte transmembrana.	Actividad transportadora transmembrana acoplada a ATPasa y unión de ATP.	Componente integral de la membrana.
VpPP160	Vía de señalización activada por auxinas, metilación, transporte de aminoácidos y transporte transmembrana.	Unión de grupo de hierro-azufre actividad de simportador, unión de iones metálicos, unión a ATP y unión de ARNm.	Mitocondria y componente integral de la membrana.
VpVAB	Formación de patrón de tejido vascular de la hoja y vía de señalización activada por auxina.		Componente integral de la membrana.
VpARF22	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, proceso de especificación de patrones, división	Unión de ADN, unión de miARN, unión de proteínas, actividad del factor de transcripción de unión a ADN.	Núcleo y componente integral de la membrana.

	celular, desarrollo del sépalo, regulación del proceso biosintético de antocianinas, desarrollo de pétalos, desarrollo de hojas, vía de señalización activada por ácido abscísico, desarrollo de frutos, respuesta a los carbohidratos y crecimiento.		
VpIAA6	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, vía de señalización activada por citoquinina, sistema de transducción de señales fosforiladas.	Actividad ligasa.	Núcleo, citosol y componente integral de la membrana.
VpE2FB	Ciclo celular, regulación de la transcripción, regulación positiva del ciclo celular meiótico, regulación positiva de la proliferación de la población celular, regulación de la división celular y respuesta a la auxina.	Unión de ácidos nucleicos, actividad de dimerización de proteínas, actividad del factor de transcripción de unión a ADN, unión de ADN y unión de ácidos nucleicos de la región reguladora.	Cloroplasto, componente integral de la membrana, núcleo y complejo regulador de la transcripción.
VpTIR1A	Vía de señalización activada por auxina, ubiquitinación de proteínas, proceso catabólico de proteínas dependientes de SCF, maduración del polen, desarrollo de estambres, vía de señalización activada por etileno, respuesta celular a la falta de fosfato, respuesta de defensa y ciclo celular.	Unión de auxina, actividad del receptor de auxina, actividad de ubiquitina-proteína transferasa y unión de proteínas.	Complejo ligasa de ubiquitina SCF y núcleo.
VpAAP6	Transporte de aminoácidos, vía de señalización activada por auxinas, transporte transmembrana, transporte de lípidos, transporte de cationes, respuesta a iones metálicos y fosforilación de proteínas.	Actividad simportadora, actividad transportadora transmembrana de aminoácidos ácidos y unión de iones metálicos.	Membrana plasmática y componente integral de la membrana.
VpAAP2.1	Transporte de aminoácidos, vía de señalización activada por auxinas, transporte transmembrana y respuesta de defensa.	Actividad del simportador.	Componente integral de la membrana y membrana plasmática.
VpMCSU3	Movimiento estomático, proceso metabólico del ácido abscísico, importación de proteínas en el estroma del cloroplasto, vía de señalización mediada por azúcar, proceso biosintético de la glucosa, respuesta al estrés salino, respuesta al frío, vía de señalización activada por auxinas, respuesta de defensa a la bacteria y proceso metabólico de un carbono.	Unión de iones de molibdeno, actividad liasa, actividad transaminasa y unión a ADN.	Componente integral de la membrana.
VpCIPK5	Metilación de lisina de histonas, fosforilación de proteínas, transducción de señales, respuesta al ácido abscísico, transporte de auxinas basípetas, respuesta de salinidad hiperosmótica, respuesta a la privación de agua y desarrollo de organismos multicelulares.	Actividad proteína treonina quinasa, actividad proteína serina quinasa, unión de ATP y unión de proteínas.	Componente integral de la membrana y retículo endoplásmico.
VpABC11	Transporte transmembrana, influjo de auxinas y eflujo de auxinas.	Actividad transportadora transmembrana acoplada a ATPasa, unión ATP, actividad transportadora transmembrana de influjo de auxina, actividad transportadora transmembrana de eflujo de auxina, actividad de dimerización de proteínas, unión de ADN y unión de iones metálicos.	Componente integral de la membrana, componente intrínseco de la membrana plasmática, membrana vacuolar, citosol y núcleo.

VpACL5	Proceso biosintético de poliaminas y transporte polar de auxinas.	Actividad de la termospermina sintasa, actividad de la espermina sintasa y actividad de la espermidina sintasa.	Citoplasma, componente integral de la membrana.
VpMYBS3	Respuesta al etileno, respuesta a la giberelina, respuesta a la auxina, regulación negativa de la actividad de la peroxidasa, respuesta a la ausencia de luz, homeostasis de auxina, morfogénesis de órganos vegetales, senescencia foliar, regulación positiva del crecimiento celular, respuesta ácido abscísico y respuesta a la sacarosa.	Unión de ADN, unión de iones de zinc, unión de ácido nucleico de la región reguladora y actividad del factor de transcripción de unión a ADN.	Núcleo.
VpARF23	Vía de señalización activada por auxina y regulación de la transcripción.	Unión al ADN.	Núcleo.
VpSR34.1	Regulación del empalme alternativo de ARNm a través del espliceosoma, empalme cis de ARNm a través del espliceosoma, vía de señalización activada por auxina y transporte transmembrana.	Unión de ARN	Citosol y componente integral de la membrana.
VpWAG1	Fosforilación de proteínas, desarrollo de cotiledones, transporte polar de auxinas, gravitropismo, vía de señalización activada por auxinas y regulación del crecimiento.	Actividad de proteína quinasa, unión de ATP.	Citosol, núcleo, membrana plasmática y componente integral de la membrana.
VpLFG4	Vía de señalización activada por auxina.		Componente integral de la membrana y componente integral de la membrana.
VpELP3	Especificación de la polaridad del eje del órgano vegetal, regulación de la vía de señalización mediada por auxina, crecimiento de órganos, transformación mediada por ADN, división celular y vía de señalización activada por auxina.	Unión de ARNt, unión de iones metálicos.	Complejo alargador de holoenzimas, eucromatina, núcleo, citosol y componente integral de la membrana.
VpTAR1	Proceso biosintético de auxinas.	Actividad liasa de carbono-azufre y actividad transaminasa.	Componente integral de la membrana.
VpPKL	Organización de los cromosomas, regulación negativa de la vía de señalización activada por ácido abscísico, vía de señalización activada por citoquinina, respuesta a la giberelina, respuesta a la auxina, regulación negativa de la transcripción y división celular.	Unión de ATP, unión de iones metálicos, actividad de helicasa y unión de ADN.	Núcleo.
VpSC11	Desarrollo del estigma, desarrollo del estilo, regulación de la vía de señalización mediada por auxinas, regulación negativa de la división celular, vía de señalización activada por auxinas, ciclo y división celular.	.	Núcleo.
VpMLH3	Reparación de desajustes, recombinación homóloga recíproca, meiosis, vía de señalización activada por auxina y transporte transmembrana.	Unión de ADN no coincidente, actividad de ATPasa y unión de ATP.	Complejo de reparación de desajustes, cromosoma, núcleo, y componente integral de la membrana.
VpNPY2	Ubiquitinación de proteínas, gravitropismo positivo, transporte de auxinas y desarrollo de órganos vegetales.	Unión de ubiquitina proteína ligasa y actividad ubiquitina-proteína transferasa.	Complejo cullin-RING ubiquitin ligasa.

VpMNS5	Proceso metabólico de carbohidratos, homeostasis de auxinas eflujo de auxinas, transporte polar de auxinas, reparación de escisión de bases y vía de señalización mediada por ácido giberélico.	Unión a iones calcio, actividad transportadora transmembrana de eflujo de auxina y unión a ácidos nucleicos.	Membrana, retículo endoplásmico, periferia celular y región extracelular.
VpSAUR36	Respuesta a la auxina		
VpPIN3.1	Vía de señalización activada por auxinas, transporte transmembrana, transporte polar de auxinas, eflujo de auxinas, homeostasis de auxinas, gravitropismo positivo y respuesta al estímulo luminoso.	Actividad del transportador transmembrana de eflujo de auxina.	Retículo endoplásmico, componente integral de la membrana, complejo portador de eflujo de auxina, membrana plasmática lateral, superficie celular, membrana vesicular y mitocondria.
VpIAA25	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, vía de señalización activada por citoquinina y sistema de transducción de señal fosforilada.	Actividad de ribonucleasa híbrida ARN-ADN, unión de ácido nucleico.	Núcleo, citosol y componente integral de la membrana.
VpARF3	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la transcripción, cambio de fase vegetativa, especificación del destino de las células abaxiales, determinación del meristemo floral, regulación positiva de la respuesta a la privación de agua, respuesta de defensa y respuesta al estímulo biótico.	Unión de ADN, unión de ácidos nucleicos de la región reguladora, actividad del factor de transcripción de unión a ADN y unión de proteínas.	Núcleo y componente integral de la membrana.

Como se puede notar, las redes de co-expresión de los genotipos CH-I y C-VI de vainilla presentan una gran cantidad de genes *hub* jerarquizados que coinciden con términos GO e incluso pueden ser parálogos; por lo que es probable que a pesar de las diferencias en la topología de las redes de co-expresión, exista redundancia funcional entre genotipos.

En este sentido se conoce que los genes parálogos e isoformas, se originan de una secuencia ancestral y suelen desarrollar funciones similares en las redes biológicas (Barabási & Oltvai, 2004; Marsit et al., 2017). Por lo tanto, la diversidad de parálogos e isoformas puede ser un indicador de plasticidad, que opera a través del nivel de abundancia de transcripciones y redundancia funcional (Marsit et al., 2017).

Respecto a los GHJ que son exclusivos para cada genotipo, se observó que a pesar de que son genes diferentes, hay redundancia funcional.

Por ejemplo, en la señalización de auxinas, el gen *VpFBX14* codifica un receptor de auxinas en los dos genotipos; sin embargo, en el genotipo CH-VI participa también el gen *VpTIR1A* que codifica otro receptor de auxinas redundante funcionalmente y que se encargan de la degradación de Aux/IAA para la activación de los factores de transcripción ARF (Cuadro 5 y Cuadro 6) (Pandolfini et al., 2007; Calderon-Villalobos et al., 2010; Gleason et al., 2011).

Finalmente, una diferencia sustancial es la presencia de funciones biológicas muy específicas en la red de cada genotipo (Cuadro 5 y Cuadro 6). Solo en el genotipo CH-I, que corresponde al germoplasma tolerante a la interrupción de la TFF, se observó la participación de genes relacionados con la conjugación y homeostasis de auxinas *VpGH3.11* y *VpJAR4* (*JASMONATE-RESISTANT4*), característicos de la maduración del fruto (Cuadro 5 y Cuadro 6) (Pattison et al., 2014). Mientras que en el genotipo CH-VI, que presenta susceptibilidad a la interrupción de la TFF, se identificaron genes *VpNPY2* (*NPY/ENP/MAB4*) y *VpTAR1* (*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED1*) relacionados con la biosíntesis y el mantenimiento de concentración elevadas de auxinas que son característicos del desarrollo floral (Cuadro 5 y Cuadro 6) (Cheng et al., 2008; Stepanova et al., 2008).

8.6 MODELO DE REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE AUXINAS DURANTE LA TFF DE *V. planifolia*

A partir de la integración de los resultados sobre los perfiles de expresión, las redes de co-expresión VNCH-I y VNCH-VI, la identificación del núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas y la consulta de literatura sobre la función de los genes *hub* identificados; se propone el siguiente modelo que integra la función putativa de las proteínas codificadas por los genes *hub* (representados con letras itálicas) durante la TFF en los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia* (Figura 20):

En el genotipo CH-I, en la etapa de pre-polinización; la radiación UV-B activa las proteínas *VpRUS2* y *VpRUS2.1* que inducen el transporte polar de auxinas (*VpPIN5*, *VpPIN3* y *VpLAX3*) en conjunto con *VpNDL1* (*Vanilla planifolia* MYC DOWNREGULATED-LIKE 1) y *VpEXO70A1* (*Vanilla planifolia* EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A1) durante el desarrollo floral (Figura 20-A) (Mudgil et al., 2013; Yokawa & Baluška, 2015; Vukašinović et al., 2017).

Justo después de su polinización, las auxinas del polen se transportan a larga distancia, a través de los tubos polínicos, hasta llegar al ovario, donde *VpFBX14* recibe señales de auxina, y a través de *VpXBOS33* (*Vanilla planifolia* PROBABLE E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE) activa la maquinaria de ubiquitinización para degradar a *VpIAA6*; que habilita a los factores de transcripción *VpARF* para encender los genes de respuesta a auxinas (*VpRNJ*, *VpAAP2*, *VpALA9*, *VpAIR9* y *VpGAT1*) relacionados con embriogénesis, transporte de aminoácidos,

transporte de fosfolípidos y ciclo celular (Figura 20-A) (Axelsen & Palmgren, 2001; Buschmann et al., 2006; Calderon-Villalobos et al., 2010; Gleason et al., 2011; Chen et al., 2015).

Adicionalmente, las proteínas VpGH3.11 y VpJAR4 se encargan de conjugar el AIA en el ovario y con ello reducen la síntesis y concentración de auxinas en el tejido que se requiere para el desarrollo del fruto (Figura 20-A) (Pattison et al., 2014).

En el caso de la pre-polinización en el genotipo CH-VI, la radiación UV-B también activa la proteína VpRUS2 y junto con VpWAG1 (*Vanilla planifolia* PROTEIN KINASE 3) y VpACL5 (*Vanilla planifolia* ACAULIS 5), induce el transporte polar de auxinas, aunque con redes genéticas distintas a las del genotipo CH-I (*VpPIN3*, *VpPIN3.1*, *VpABCB2*, *VpABCB19*, *VpABCB11* y *VpLAX3*) (Figura 20-B) (Clay & Nelson, 2005; Dhonukshe et al., 2015; Yokawa & Baluška, 2015).

En este caso, después de la polinización, las auxinas del polen se transportan a larga distancia, a través del tubo polínico donde reciben la señal dos receptores: VpFBX14 y VpTIR1A y mediante dos proteínas VpXBOS33 y VpNPY2 (NAKED PINS IN YUC MUTANTS 2) se activa la maquinaria de ubiquitinización para degradar a las proteínas VpIAA25 e VpIAA6, que liberan a los factores de transcripción VpARF para activar genes de respuesta a auxinas específicos para el genotipo CH-VI (*VpAAP2*, *VpAAP6*, *VpRNJ*, *VpCPL2*, *VpE2FB* y *VpSCI1*) que participan en el transporte de aminoácidos, embriogénesis, estrés osmótico, ciclo celular, desarrollo floral y división celular (Figura 20-B) (Magyar et al., 2005; Ueda et al., 2008; Calderon-Villalobos et al., 2010; Gleason et al., 2011; Depaoli et al., 2012; Chen et al., 2015).

Y contrariamente a lo que se observa en el genotipo tolerante a caída prematura de ovario (CH-I), en este genotipo, se observa actividad de las proteínas VpNPY (ROOT PHOTOTROPISM 3) y VpTAR1 que se encargan de la biosíntesis de auxinas y del mantenimiento de altas concentraciones de auxinas, que es característico de etapas inmaduras en el desarrollo del ovario (Cheng et al., 2008; Stepanova et al., 2008).

Este núcleo regulatorio, coincide con la descripción histológica que reportan Hernández-Miranda et al. (2020) donde se observa que en etapas avanzadas de la TFF cercanas al tiempo de fecundación, el genotipo CH-VI presenta tubos polínicos rodeando óvulos que están en estado inmaduro por lo que no se presenta la fecundación.

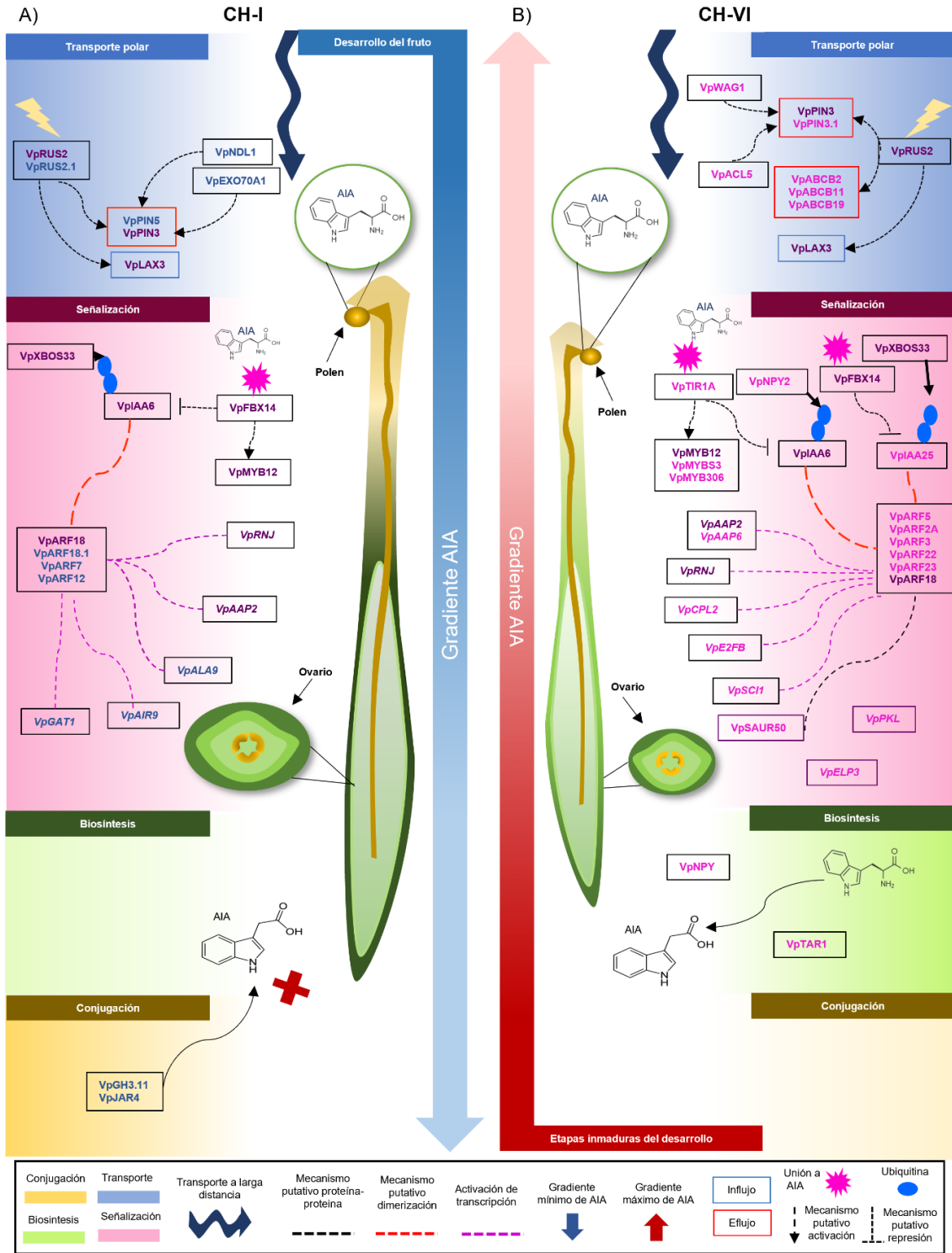


Figura 20. Modelo sobre la variación intraespecífica en el núcleo regulador del metabolismo de auxinas durante la TFF de *V. planifolia*. A) Genotipo CH-I y B) Genotipo CH-VI. Fuente en color morado representan genes o proteínas que comparten ambos genotipos, color azul del genotipo CH-I y color rosa del genotipo CH-VI.

A partir del análisis de expresión diferencial, la identificación de GHJ de los núcleos regulatorios de cada genotipo y del modelo planteado sobre la regulación del metabolismo de auxinas durante la TFF de *V. planifolia* (Figura 20). Se proponen los siguientes primers para validar los GHJ *VpFBX14*, *VpRUS2*, *VpARF12*, *VpGH3.11*, *VpTAR1* y *VpMYB12* mediante qPCR en estudios futuros sobre la TFF de *V. planifolia*.

Cuadro 7. Primers específicos para *VpFBX14*, *VpRUS2*, *VpARF12*, *VpGH3.11*, *VpTAR1* y *VpMYB12* con características para qPCR.

Gen	Función	Expresión diferencial	Hub score	Primers
<i>VpFBX14</i>	Ubiquitinación de proteínas y vía de señalización activada por auxina.	Si	Promedio entre genotipos = 0.92	F: TCGGCCTGATCACCTAACAG R: ATAGCAAGCCAGAGACAGCA
<i>VpRUS2</i>	Transporte polar de auxina, respuesta a UV-B y acetilación de histona.	Si	Promedio entre genotipos = 0.97	F: AGTGCGGCATTGTCAGTGTT R: GCATGCTGCATCCCATCTTT
<i>VpARF12</i>	Vía de señalización activada por auxinas y regulación de la transcripción.	Si	Genotipo CH-I = 1	F: CGTAAGGCACTGGGTAAGAT R: ACAAATACAAGCTGCCAGCC
<i>VpGH3.11</i>	Respuesta a la auxina y respuesta al estímulo luminoso.	No	Genotipo CH-I = 1	F: CTGTTTTGGGAGATCGCCTG R: TAGTTGAGCGAGTCCTCCAC
<i>VpTAR1</i>	Proceso biosintético de auxinas.	No	Genotipo CH-VI = 0.88	F: TTCAGCCTGCCACAATTCCA R: TCAACCAGGCAAAAGCAGGA
<i>VpMYB12</i>	Respuesta a UV-B, respuesta al etileno y respuesta a la auxina.	No	Promedio entre genotipos = 0.89	F: AGCGTACTGGTGGTGTCTAT R: CAAAGATGGGAGGCTGCTGTT

9. CONCLUSIONES

- Se identificó la existencia de expresión diferencial significativa en seis genes (*VpAVT6D*, *VpRUS2*, *VpPHT1*, *VpFBX14*, *VpAVT6C* y *VpARF12*) del metabolismo de auxinas entre los genotipos CH-I y CH-VI, con sobreexpresión en el genotipo CH-I que sugieren diferencias regulatorias entre genotipos.
- El análisis de conglomerados *Heatmap*, mostró diferencias temporales en los perfiles de expresión del metabolismo de auxinas entre genotipos, que sugieren un desfase durante la TFF en el genotipo CH-VI.

- Se modelaron las redes de co-expresión VNCH-I y VNCH-VI que resultaron ser de libre escala, no aleatorias y de mundo pequeño; por lo tanto, representan los vínculos funcionales entre genes del metabolismo de auxinas durante la TFF.
- Se definieron cinco módulos funcionales del metabolismo de auxinas en el genotipo CH-I y cuatro en el genotipo CH-VI, así como diferencias en el número de motivos entre genotipos que sugieren variación intraespecífica funcional.
- Se identificaron 11 genes *hub* coincidentes, 16 en el genotipo CH-I (Programa genético de desarrollo) y 38 en el genotipo CH-VI (Interacción ambiental)
- El modelo de variación funcional en *V. planifolia* sugiere que la regulación del genotipo CH-I está asociada con niveles bajos de auxinas gracias a los genes *VpJAR4* y *VpGH3.11*, mientras que en el genotipo CH-VI presenta una regulación asociada a concentraciones altas de auxinas gracias a los genes *hub VpTAR1* y *VpNPY*
- El análisis de transcriptoma sugiere que en el genotipo CH-VI existe un perfil de expresión y núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas característico de tejidos en etapas inmaduras durante la TFF.

10. PRESPECTIVAS Y APLICACIONES

El enfoque de biología de sistemas y el análisis de redes de co-expresión permite modelar e inferir las relaciones regulatorias de los genes co-expresados que participan en procesos biológicos comunes, identificar módulos regulatorios y genes con funciones desconocidas en grupos taxonómicos que no se habían estudiado previamente (Emamjomeh et al., 2017; Contreras-López et al., 2018).

En este sentido, los resultados obtenidos sobre el núcleo regulatorio del metabolismo de auxinas muestran diferencias sustanciales entre los genes *hub* que participan en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* y *Fragaria vesca* durante la TFF (Pattison et al., 2014; Grimplet et al., 2017; Shahan et al., 2018). Por lo tanto, la presente investigación permite entender la regulación del metabolismo de auxinas en plantas con síndrome post-polinización de la familia Orchidaceae (O'Neill & Nadeau, 1997).

Por otro lado, la biología de sistemas atiende desafíos sobre las asociaciones genotipo-fenotipo a través del análisis de las redes genéticas que subyacen a la plasticidad fenotípica del desarrollo

de las plantas, para generar estrategias de adaptación en entornos cambiantes (Fukushima et al., 2012; Piperno, 2017; Fajardo & Quecini, 2021). En este sentido la presente investigación aporta datos sobre variación intraespecífica funcional entre los genotipos CH-I (tolerante a caída prematura de ovario) y CH-VI (susceptible a caída prematura de ovario) que podría ser importante para desarrollar estrategias de intervención en la problemática de caída prematura que presenta *Vanilla planifolia*. Sin embargo, es necesario validar experimentalmente la función de los genes *hub* que se identificaron.

Otra aplicación importante del análisis de redes de co-expresión en *V. planifolia* es desarrollar redes del transcriptoma completo para identificar todos los módulos regulatorios asociados a la TFF o analizar otras rutas metabólicas asociadas a procesos biológicos particulares.

Otro enfoque desde la biología de sistemas es la aplicación de redes booleanas que podrían ayudar a modelar la direccionalidad de la regulación genética a partir de datos de expresión de los GHJ para completar el modelo propuesto sobre la regulación del metabolismo de auxinas durante la TFF en *V. planifolia* (Shmulevich et al., 2002).

Por otro lado, se ha planteado que, en plantas con domesticación incipiente, los principales rasgos de domesticación son resultado de cambios particulares en la organización y estructura de redes de co-expresión y no necesariamente por modificaciones en el genoma (Sauvage et al., 2017). En este sentido, otra aplicación de este tipo de enfoques es realizar estudios de genómica y transcriptómica a nivel poblacional para identificar rasgos de domesticación asociados con cambios genéticos y regulatorios en *V. planifolia* (Sauvage et al., 2017; Barrera-Redondo et al., 2020).

Se plantea que la diversidad funcional de los organismos resulta de múltiples capas regulatorias más allá del genoma y que es necesaria su integración para comprender procesos biológicos complejos (Bludau & Aebersold, 2020). En este sentido, de acuerdo con la notación funcional de la presente investigación, se puede identificar que hay otros procesos regulatorios implicados en los genes *hub* del metabolismo de auxinas como empalme alternativo, regulación a través de miRNA, metilación, acetilación de histonas y cambios en la estructura de la cromatina (Cuadro 5, Cuadro 5 y Cuadro 6). Por lo tanto, es de vital importancia realizar estudios bajo el enfoque de biología de sistemas con la integración de herramientas ómicas, que expliquen distintos niveles de complejidad a través del enfoque de redes multicapa (Sonawane et al., 2019).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki, K., Ogata, Y., & Shibata, D. (2007). Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. *Plant and Cell Physiology*, 48(3), 381–390. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm013>
- Axelsen, K. B., & Palmgren, M. G. (2001). Inventory of the superfamily of P-type Ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126(2), 696–706. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.696>
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Barabási, A. L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: Understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*, 5(2), 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrg1272>
- Barrera-Redondo, J., Piñero, D., & Eguiarte, L. E. (2020). Genomic, Transcriptomic and Epigenomic Tools to Study the Domestication of Plants and Animals: A Field Guide for Beginners. *Frontiers in Genetics*, 11(July), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00742>
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L. L., Studholme, D. J., Yeats, C., & Eddy, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1), D138–D141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh121>
- Bludau, I., & Aebersold, R. (2020). Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6), 327–340. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0231-2>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh, N. D., Kuo, T. H., Davis, F. G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A. R., Tsai, S. L., Coyne, S., Ye, W. W., Freeman, R. M., Peshkin, L., Tabin, C. J., ... Whited, J. L. (2017). A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Reports*, 18(3), 762–776. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063>
- Buschmann, H., Chan, J., Sanchez-Pulido, L., Andrade-Navarro, M. A., Doonan, J. H., & Lloyd, C. W. (2006). Microtubule-Associated AIR9 Recognizes the Cortical Division Site at Preprophase and Cell-Plate Insertion. *Current Biology*, 16(19), 1938–1943. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.028>
- Calderon-Villalobos, L. I., Tan, X., Zheng, N., & Estelle, M. (2010). Auxin Perception — Structural Insights. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005546>
- Chen, H., Zou, W., & Zhao, J. (2015). Ribonuclease J is required for chloroplast and embryo development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 2079–2091. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv010>
- Cheng, Y., Qin, G., Dai, X., & Zhao, Y. (2008). NPY genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 21017–21022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809761106>
- Chevalier, É., Loubert-Hudon, A., Zimmerman, E. L., & Matton, D. P. (2011). Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: From its inception to fertilization. *New Phytologist*, 192(1), 13–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03836.x>
- Clay, N. K., & Nelson, T. (2005). Arabidopsis thickvein mutation affects vein thickness and organ

- vascularization, and resides in a provascular cell-specific spermine synthase involved in vein definition and in polar auxin transport. *Plant Physiology*, 138(2), 767–777. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055756>
- Contreras-López, O., Moyano, T. C., Soto, D. C., & Gutiérrez, R. A. (2018). Step-by-Step Construction of Gene Co-expression Networks from High-Throughput Arabidopsis RNA Sequencing Data. In *Root Development* (Vol. 1761, pp. 275–301). Humana Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1xhr7d5.24>
- de Bruijn, S., Angenent, G. C., & Kaufmann, K. (2012). Plant “evo-devo” goes genomic: From candidate genes to regulatory networks. *Trends in Plant Science*, 17(8), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.002>
- Delker, C., Pöschschl, Y., Raschke, A., Ullrich, K., Ettingshausen, S., Hauptmann, V., Grosse, I., & Quint, M. (2010). Natural variation of transcriptional auxin response networks in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22(7), 2184–2200. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073957>
- Depaoli, H. C., Goldman, G. H., & Goldman, M. H. S. (2012). SCI1, the first member of the tissue-specific inhibitors of CDK (TIC) class, is probably connected to the auxin signaling pathway. *Plant Signaling and Behavior*, 7(1), 53–58. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18525>
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C. S., Ma’ho’nen, A. P., Kleinevehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., & Offringa, R. (2015). Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development (Cambridge)*, 142(13), 2386–2387. <https://doi.org/10.1242/dev.127415>
- Emamjomeh, A., Saboori Robat, E., Zahiri, J., Solouki, M., & Khosravi, P. (2017). Gene co-expression network reconstruction: a review on computational methods for inferring functional information from plant-based expression data. *Plant Biotechnology Reports*, 11(2), 71–86. <https://doi.org/10.1007/s11816-017-0433-z>
- Espinosa-Soto, C., & Wagner, A. (2010). Specialization can drive the evolution of modularity. *PLoS Computational Biology*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000719>
- Fajardo, T. V. M., & Quecini, V. (2021). Comparative transcriptome analyses between cultivated and wild grapes reveal conservation of expressed genes but extensive rewiring of co-expression networks. *Plant Molecular Biology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01122-2>
- Fischer, A. H. L., & Smith, J. (2012). Evo-devo in the era of gene regulatory networks. *Integrative and Comparative Biology*, 52(6), 842–849. <https://doi.org/10.1093/icb/ics112>
- Fukushima, A., Nishizawa, T., Hayakumo, M., Hikosaka, S., Saito, K., Goto, E., & Kusano, M. (2012). Exploring tomato gene functions based on coexpression modules using graph clustering and differential coexpression approaches. *Plant Physiology*, 158(4), 1487–1502. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188367>
- 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. <http://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v33n1/v33n1a3.pdf>
- Gleason, C., Foley, R. C., & Singh, K. B. (2011). Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017245>
- Grimplet, J., Tello, J., Laguna, N., & Ibáñez, J. (2017). Differences in Flower Transcriptome between Grapevine Clones Are Related to Their Cluster Compactness, Fruitfulness, and Berry Size. *Frontiers in Plant Science*, 8(632), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00632>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles,

- D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Habets, M. E. J., & Offringa, R. (2014). PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: A key target for environmental and endogenous signals. *New Phytologist*, 203(2), 362–377. <https://doi.org/10.1111/nph.12831>
- Hernández-Miranda, O. A., Reyes-Mateos, D. A., Campos, J. E., Sandoval-Zapotitla, E., Herrera-Cabrera, B. E., & Salazar-Rojas, V. M. (2020). EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL COMPLEJO ARF8-IAA25-like-TIR1 DURANTE EL SÍNDROME POST-POLINIZACIÓN EN DOS GENOTIPOS DE VAINILLA. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 43(4-A), 575–582. <https://doi.org/https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4-A.575>. <https://revfitotecnia.mx/index.php/RFM/article/view/836/796>
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Campos-Contreras, J., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 43–50. <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.37>
- Hu, W., Zuo, J., Hou, X., Yan, Y., Wei, Y., Liu, J., Li, M., Xu, B., & 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00742>
- Joldersma, D., & Liu, Z. (2018). The making of virgin fruit: The molecular and genetic basis of parthenocarpy. *Journal of Experimental Botany*, 69(5), 955–962. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx446>
- Kleinberg, J. M., Newman, M., Barabási, A. L., & Watts, D. J. (2011). *Authoritative sources in a hyperlinked environment* (Issue May 1997, pp. 514–542). Princeton University Press. www.harvard.edu
- Koskinen, P., Törönen, P., Nokso-Koivisto, J., & Holm, L. (2015). PANNZER: High-throughput functional annotation of uncharacterized proteins in an error-prone environment. *Bioinformatics*, 31(10), 1544–1552. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu851>
- Leslie, A. B., & Boyce, C. K. (2012). Ovule function and the evolution of angiosperm reproductive innovations. *International Journal of Plant Sciences*, 173(6), 640–648. <https://doi.org/10.1086/665818>
- Liu, M., Gomes, B. L., Mila, I., Purgatto, E., Peres, L. E. P., Frasse, P., Maza, E., Zouine, M., Roustan, J. P., Bouzayen, M., & Pirrello, J. (2016). Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato. *Plant Physiology*, 170(3), 1732–1744. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01859>
- Lord, E. M., & Russell, S. D. (2002). The Mechanisms of Pollination and Fertilization in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.083438>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D., & Bögre, L. (2005). The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell*, 17(9), 2527–2541. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033761>
- Marguerat, S., & Bähler, J. (2010). RNA-seq: From technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(4), 569–579. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>

- Marsit, S., Leducq, J. B., Durand, É., Marchant, A., Filteau, M., & Landry, C. R. (2017). Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nature Reviews Genetics*, *18*(10), 581–598. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.49>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.01.009>
- Mimura, M., Yahara, T., Faith, D. P., Vázquez-domínguez, E., Colautti, R. I., Araki, H., Javadi, F., Mori, A. S., Zhou, S., Hollingsworth, P. M., Neaves, L. E., Fukano, Y., Smith, G. F., Tachida, Y. S. H., & Hendry, A. P. (2016). Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evolutionary Applications*, *10*(2), 121–139. <https://doi.org/10.1111/eva.12436>
- Molbiotools. Multiple List Comparator. Available online: <http://www.molbiotools.com/listcompare.html> (accessed on March 2021).
- Mudgil, Y., Ghawana, S., & Jones, A. M. (2013). N-MYC DOWN-REGULATED-LIKE proteins regulate meristem initiation by modulating auxin transport and MAX2 expression. *PLoS ONE*, *8*(11), e77863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077863>
- O'Neill, S. D. (1997). Pollination Regulation of Flower Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *48*(1), 547–574. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.547>
- O'Neill, S. D., & Nadeau, J. A. (1997). Postpollination Flower Development. In *Horticultural Reviews* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1002/9780470650622.ch1>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.011>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, *14*(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Pattison, R. J., Csukasi, F., & Catalá, C. (2014). Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiologia Plantarum*, *151*(1), 62–72. <https://doi.org/10.1111/ppl.12142>
- Piperno, D. R. (2017). Assessing elements of an extended evolutionary synthesis for plant domestication and agricultural origin research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(25), 6429–6437. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703658114>
- Ravasz, E., Somera, A. L., Mongru, D. A., Oltvai, Z. N., & Barabási, A. L. (2002). Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, *297*(5586), 1551–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1073374>
- Rocha-Flores, R. G., Herrera-Cabrera, B. E., Velasco-Velasco, J., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., & Mendoza-Castillo, M. C. (2018). DETERMINACION PRELIMINAR DE COMPONENTES DE RENDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) EN LA REGION TOTONACAPAN, MEXICO. *AGROProductividad*, *11*(3), 9-15.
- Romero-Campero, F. J., Perez-Hurtado, I., Lucas-Reina, E., Romero, J. M., & Valverde, F. (2016). ChlamyNET: A Chlamydomonas gene co-expression network reveals global properties of the transcriptome and the early setup of key co-expression patterns in the green lineage. *BMC Genomics*, *17*(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2564-y>
- Ruan, Y. L., Patrick, J. W., Bouzayen, M., Osorio, S., & Fernie, A. R. (2012). Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science*, *17*(11), 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.005>

- Salazar-Rojas, V. M., Sandoval-Zapotitla, E., Granados-Hernández, C. V., Cruz-Ruiz, Y., Herrera-Cabrera, B. E., & Campos-Contreras, J. E. (2016). DESCRIPCION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE CAIDA PREMATURA DE FRUTOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew. *Agroproductividad*, 9(S1), 17–20. <http://www.colpos.mx/wb/index.php/agroproductividad/agroproductividad-2016#.WIGuFd-WbIU>
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., González, F., & Cobos-Peralta, M. (2012). Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(5), 875–887. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9729-y>
- Sauvage, C., Rau, A., Aichholz, C., Chadoeuf, J., Sarah, G., Ruiz, M., Santoni, S., Causse, M., David, J., & Glémin, S. (2017). Domestication rewired gene expression and nucleotide diversity patterns in tomato. *Plant Journal*, 91(4), 631–645. <https://doi.org/10.1111/tbj.13592>
- Seppy, M., Manni, M., & Zdobnov, E. M. (2019). *BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness* (Vol. 1962, pp. 227–245). Humana, New York, NY. <https://doi.org/10.2307/j.ctvfxvc64.18>
- Shahan, R., Zawora, C., Wight, H., Sittmann, J., Wang, W., Mount, S. M., & Liu, Z. (2018). Consensus Coexpression Network Analysis Identifies Key Regulators of Flower and Fruit Development in Wild Strawberry. *Plant Physiology*, 178(1), 855–859.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303.metabolite>
- Shmulevich, I., Dougherty, E. R., & Zhang, W. (2002). From boolean to probabilistic boolean networks as models of genetic regulatory networks. *Proceedings of the IEEE*, 90(11), 1778–1792. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2002.804686>
- Singh, V. K., Rajkumar, M. S., Garg, R., & Jain, M. (2017). Genome-wide identification and co-expression network analysis provide insights into the roles of auxin response factor gene family in chickpea. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11327-5>
- Solano-De La Cruz, M. T., Adame-García, J., Gregorio-Jorge, J., Jiménez-Jacinto, V., Vega-Alvarado, L., Iglesias-Andreu, L. G., Escobar-Hernández, E. E., & Luna-Rodríguez, M. (2019). Functional categorization of de novo transcriptome assembly of *Vanilla planifolia* Jacks. potentially points to a translational regulation during early stages of infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *BMC Genomics*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6229-5>
- Sonawane, A. R., Weiss, S. T., Glass, K., & Sharma, A. (2019). Network medicine in the age of biomedical big data. *Frontiers in Genetics*, 10(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00294>
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D. Y., Doležal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., & Alonso, J. M. (2008). TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell*, 133(1), 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.047>
- Sundberg, E., & Østergaard, L. (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001628>
- Tan, H., Man, C., Xie, Y., Yan, J., Chu, J., & Huang, J. (2019). A Crucial Role of GA-Regulated Flavonol Biosynthesis in Root Growth of *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 12(4), 521–537. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.12.021>
- Tang, N., Deng, W., Hu, G., Hu, N., & Li, Z. (2015). Transcriptome profiling reveals the regulatory

mechanism underlying pollination dependent and parthenocarpic fruit set mainly mediated by auxin and gibberellin. *PLoS ONE*, 10(4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125355>

Tordera, M. P. (2009). La complejidad en el asma: inflamación y redes libres de escala. *Archivos de Bronconeumología*, 45(9), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.03.007>

Ueda, A., Li, P., Feng, Y., Vikram, M., Kim, S., Kang, C. H., Kang, J. S., Bahk, J. D., Lee, S. Y., Fukuhara, T., Staswick, P. E., Pepper, A. E., & Koiwa, H. (2008). The Arabidopsis thaliana carboxyl-terminal domain phosphatase-like 2 regulates plant growth, stress and auxin responses. *Plant Molecular Biology*, 67(6), 683–697. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9348-y>

UniProt Consortium, (2015). UniProt: A hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D204–D212. <https://doi.org/10.1093/nar/gku989>

Vukašinović, N., Oda, Y., Pejchar, P., Synek, L., Pečenková, T., Rawat, A., Sekereš, J., Potocký, M., & Žárský, V. (2017). Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in Arabidopsis. *New Phytologist*, 213(3), 1052–1067. <https://doi.org/10.1111/nph.14267>

Winterbach, W., Mieghem, P. Van, Reinders, M., Wang, H., & Ridder, D. de. (2013). Topology of molecular interaction networks. *BMC Systems Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-90>

Yokawa, K., & Baluška, F. (2015). Pectins, ROS homeostasis and UV-B responses in plant roots. *Phytochemistry*, 112, 80–83. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.016>

Yuan, X., Zhang, S., Liu, S., Yu, M., Su, H., Shu, H., & Li, X. (2013). Global Analysis of Ankyrin Repeat Domain C3HC4-Type RING Finger Gene Family in Plants. *PLoS ONE*, 8(3), e58003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058003>