

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Análisis *in silico* de las rutas metabólicas asociadas al proceso de caída del ovario no fertilizado de *Vanilla planifolia* Andrews (Orchidaceae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

Luis Jesús Miranda Rivera

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras FES Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Víctor Manuel Salazar Rojas M. en C. Alejandro Monsalvo Reyes M. en C. María Teresa Ortiz Melo Dr. José Arturo Alcántara Rodríguez

Los Reyes Iztacala, Edo. De México 2021







Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres:

Por mostrarme que la única manera es no rendirse, que cuando uno no puede correr entonces camina, cuando no puede caminar se arrastra y cuando no puede arrastrarse ni siquiera se da cuenta.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos, con el apoyo del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (SEP- CONACYT), Convocatoria de Investigación Científica Básica 2015, Proyecto 255952.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, quien acepto ser mi mentor y dirigirme durante toda la realización de este trabajo; sus ideas, conocimientos, consejos y apoyo fueron indispensables para poder terminarlo. Gracias por mostrarme que en la ciencia el equipo de trabajo también puede ser una familia y también por demostrarme lo que significa ser un buen mentor.

Al Dr. Víctor Salazar Rojas, uno de los mejores profesores que pude tener en la carrera, que me mostró que cuando alguien ama lo que hace puede hacer cosas grandiosas con ello. Que a través de sus clases me mostró el amor a la ciencia y lo importante que es apoyar a aquellos que ignoran más que nosotros.

Al Dr. José Arturo Alcántara Rodríguez, quien me ayudo a introducirme a la rama de la biología que durante cuatro años estuve buscando. Fue a través de su clase que por fin tuve el valor de perseguir mi sueño dentro de la bioinformática, y aprendí mucho de sus consejos a lo largo de este trabajo.

Al Maestro Alejandro Monsalvo Reyes, que me recibió en el laboratorio igual que a un viejo amigo, que siempre con su amabilidad y esa personalidad tan amigable me hizo sentir en casa. Gracias por sus consejos, sus enseñanzas y su ayuda.

A la Maestra María Teresa Ortiz Melo, que sin conocerme de antes acepto apoyarme durante este trabajo y siempre estuvo atenta y dispuesta a ayudarme con lo que necesitara. Gracias por todo su apoyo.

A la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) y las personas que la conforman por siempre mostrarse dispuestas a apoyarme durante no sólo la realización de este trabajo sino durante toda mi carrera.

Al Laboratorio de Bioquímica de la UBIPRO que me recibió con las puertas abiertas y donde pase los últimos días de mi carrera trabajando, aprendiendo y riendo.

ii

A todas las personas que conforman este laboratorio: académicos, trabajadores y alumnos, especialmente a Clau, Nelly y Andy que desde el primer día y hasta el último no dejaron de darme consejos, apoyo y compartieron lo que habían aprendido antes de mí; esos consejos, ese apoyo y los trabajos tan importantes que realizan fueron la base del mío.

A la profesora Irma, la primera profesora que conocí en mi carrera y cuyo entusiasmo me salvó varias veces de tirar la toalla antes de que empezara la pelea. Gracias por mostrarme que soy más de lo que creo.

Al Dr. César Durán por siempre compartir su conocimiento y brindarme su apoyo sin dudar, su forma de ser me inspiró a ser alguien más amable y dispuesto a compartir mis conocimientos igual que él.

Al Dr. Erasmo Negrete gracias por ponerme los pies en la tierra y mostrarme lo mucho que cuesta ser un científico, pero también lo gratificante que puede ser.

A la Dra. Gabriela Sánchez, gracias por aceptarme como parte de la familia del laboratorio, por lanzarme a intentar cosas nuevas y por las varias cubetadas de agua fría que me hicieron crecer como universitario, científico y persona. Gracias por su constante ánimo, sus enseñanzas y su amor para hacer las cosas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me recibió desde que era un adolescente. Antes ya había recibido a mi madre y después se encargo de formar a mi hermano. Esta Universidad es nuestro hogar y siempre será así. Gracias a todas las personas que la conforman y la han conformado antes, al fin y al cabo, somos nosotros los que hacemos a la Universidad mientras ella se encarga de hacernos a nosotros.

A Diana, por mostrarme que cuando uno quiere algo se lanza con todo sin importar lo que digan los demás, gracias a ella me esforcé más y más todos los días porque siempre tenía alguien con quien competir.

iii

A Daniel y Jesus, mis amigos y compañeros de equipo por tantos años, siempre estuvieron ahí a mi lado aprendiendo, trabajando y esforzándose junto conmigo.

A Vanessa, por sostenerme desde el primer día, literalmente. Gracias por hacerme reír todos los días durante media carrera, no pude encontrar a una mejor compañera y amiga, junto a ella todos los proyectos no fueron solo mejores de los que pude haberlos hecho solo, sino que fueron divertidos. Gracias por las veces que me sostuviste y me volviste a poner en pie, sin ti hoy no estaría aquí.

A Oscar, el amigo que conocí desde antes de entrar a la Universidad y cuya amistad atesoro hasta el día de hoy. No sólo es un gran amigo sino también un gran hombre al que admiro, si todos tuviesen las ganas, la actitud y la gentileza que él tiene, el mundo sería un lugar mucho más feliz.

A Lola, mi mejor amiga, quien muy pronto se volvió una parte muy importante de mi vida, gracias a ella he encontrado valor y he podido seguir adelante en los tiempos más complicados y oscuros. Admiro el valor que tienes para seguir tus sueños, y las ganas con las que enfrentas las dificultades que te pone la vida en frente. Si todos compartiéramos tu convicción habríamos colonizado la galaxia entera hace cien años.

A Majo, mi compañera, mi amiga, mi pareja, mi vida entera. Mi compañera desde el primer día en la escuela, mi amiga desde el segundo cuarto de la carrera y mi pareja desde... bueno, eso es una larga historia, pero una bonita eso sí. Gracias por estar siempre a mi lado, por hacerme un mejor hombre, por hacerme una mejor persona, gracias por tu cariño y tu apoyo, gracias por ser mi pilar y dejarme ser el tuyo, gracias por cuidarme, por dejarme cuidarte, por hacerme reír, por mostrarme cuando estoy mal, por comprenderme, por aceptarme, por devolverme mis sentimientos. Gracias a quien sea que le tenga que agradecer porque tu estés en mi vida; a tu lado la vida tiene un tono diferente, uno que me encanta. Ahora, todo lo que deseo de esta vida es tu risa.

iv

A Leonel y Thiago, llegaron en el momento perfecto y ni siquiera tienen idea, es por ellos que siempre demostraré que se puede ser feliz, amable, gentil, paciente, perseverante y altruista. Es por ellos que siempre seré la mejor versión de mí, ojalá algún día tengan la edad para leer esto y sepan lo importantes que son para mí.

A Jorge, por aparecer de repente en nuestra vida, siempre es agradable ganar un hermano sobre todo si ese hermano es alegre, divertido, amigable y sobre todo un buen padre.

A Ale, mi hermanita que de hecho es mayor. Llegué a este mundo y ella ya estaba aquí, me cuidó, jugó conmigo y nos divertimos mucho hasta que la adolescencia nos hizo separarnos. Incluso en esos tiempos, sin embargo, siempre estuvo ahí para ayudarme con las cosas que yo no era capaz de hacer y con aquellas cosas que no comprendía. Gracias al cielo la adolescencia se acaba y volvió a ser esa hermanita a la que tanto quiero, quien me hace reír, me apoya y a quien admiro por ser una mujer exitosa en un mundo de hombres.

A Ernesto, mi hermano que siempre ha estado a mi lado, muchas veces siguiendo mis pasos y otras guiando los míos. Cuando llegue al mundo el aún no estaba aquí, pero ni siquiera había comenzado a entender cuál era mi propósito en este lugar cuando el apareció y como agradezco que lo haya hecho, él fue mi primer propósito, alguien a quien enseñarle lo poco que había aprendido, alguien a quien proteger y alguien para quien tenía que ser un ejemplo. Qué rápido supera el alumno al maestro, gracias por enseñarme que, si la pared no se rompe a la primera, uno sigue golpeando.

A Luis Miranda Osorio mi padre, que me enseñó todo lo que hasta ahora he necesitado para navegar por la vida, aún recuerdo cuando llegaba por la noche con revistas de ciencia para mí y mi hermano, es eso lo primero en mi memoria que hay empujándome hacia el camino correcto, gracias. Mi padre no nació en cuna de oro, ni de lejos, tuvo que enfrentar adversidad tras adversidad desde que era un niño pequeño, un bebé de hecho. No es un hombre letrado porque para estudiar primero hay que comer y él estaba concentrado en eso, pero cuantas cosas sabe, puedes

preguntarle lo que sea y tendrá una respuesta, de él he aprendido un montón de cosas que utilicé a lo largo de mi universidad, a lo largo de toda mi vida de hecho. Él lleva trabajando desde los diez años, ya pasa de los sesenta y no ha parado, no se detiene y dudo que lo haga nunca. Él se encargó de cuidarme, alimentarme y enseñarme la lección más importante que he aprendido hasta ahora: el amor mueve montañas. Mi padre me ama de una manera que seguro no conoceré ni entenderé hasta tener mis hijos propios, ama a mi madre con su vida entera, ama a mis hermanos, a sus nietos, ama la vida. Sin amor mi padre no existe y es así, gracias a él, que intento vivir mi vida, amando lo que hago, amando a las personas que hay en mi vida, así estoy seguro de que llegaré lejos, igual que hizo él. Gracias papá, por todo.

A María Alejandra Rivera Valencia mi madre, que desde antes que yo naciera ya estaba dejándose la vida en mí. Me cuidó desde que estaba en su vientre, dejó sus noches de sueño por estar a mi lado y aprendió a correr al hospital de tantas veces que estuve a punto dejar esta existencia, a mi madre le debo la vida. También a ella le debo mis ganas de aprender, ella fue quien me acerco a los libros y al gusto por el conocimiento, ella siempre apoyó mis sueños de convertirme en científico. A mi madre le agradezco enseñarme el poder del altruismo, lo importante que es ser amable hacia los demás y siempre estar dispuesto a darle una mano a quien lo necesite, ella dedicó su vida a ello, una trabajadora social desde la médula. Admiro mucho a esa mujer porque sé que ha cambiado el mundo un paso a la vez, ha ayudado a tantas personas que si las juntásemos a todas llenaríamos varios estadios y la mayoría de ellos la recordarían y lo que hizo por ellos. Mi madre nunca ha dejado de aprender, a sus casi sesenta años (y ojalá vuelva ella a leer esto cuando llegue hasta allá) sigue estudiando, aprendiendo, formándose con un solo objetivo: poder ayudar a más personas todavía. No solo es altruista, también es una trabajadora incansable, siempre buscando que hacer, en que ayudar, en que mejorar y por eso debo agradecerle, es ella la que me enseñó que el mundo nunca deja de dar vueltas, que debemos movernos con él, sólo cuando hayamos hecho todo lo que esta vida nos de tiempo de hacer será hora de descansar. Gracias,

mamá por tu inmenso amor del que sé muy bien nunca conoceré final, gracias por hacer de este mundo un lugar mejor para todos.

Aún debo agradecer a mi madre y mi padre, pues fueron ellos quienes me sostuvieron en mi peor momento, cuando aprendí que no podía hacerlo todo solo, cuando aprendí que necesitaba ayuda fueron ellos los primeros que extendieron su mano y me sostuvieron por ese largo camino. Ustedes me dieron la vida, me lanzaron a ella y luego me recogieron, salvaron mi vida y volvieron a lanzarme a ella, puedo decir sin temor a equivocarme que me han tocado los mejores padres que alguien pudo tener. Gracias.

A todas las personas que han influido en mi vida para bien o para mal, pues es la suma de todas estas personas la que me ha hecho ser quien soy, gracias por haber estado ahí en su momento, gracias por haberme dado una mano, gracias por orientarme, por enseñarme, por ayudarme, por alegrarme, gracias a todos los que me hicieron llegar hasta aquí a terminar este trabajo que con todo mi esfuerzo entrego, ha sido una aventura maravillosa y no puedo esperar por la siguiente.

Gracias.

"No importa la lentitud con la que avances, siempre y cuando no te detengas"

-Confucio

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber"

-Albert Einstein

"No existe una manera fácil. No importa cuán talentoso seas, tu talento te va a fallar si no lo desarrollas. Si no estudias, si no trabajas duro, si no te dedicas a ser mejor cada día"

-Will Smith

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOSII
ÍNDICEIX
RESUMEN1
ABSTRACT1
INTRODUCCIÓN2
MARCO TEÓRICO4
Absición
El etileno es una de las fitohormonas principales que participan en la abscisión y lo hace a través de diferentes
RUTAS DE SEÑALIZACIÓN
Existe variación genotípica entre las poblaciones de <i>V. planifolia</i> cultivadas en la región de Totonacapan,
KEDES DE INTERACCION PROTEINA-PROTEINA
NETWORKANALYST COMO HERRAMIENTA INTEGRATIVA PARA EL ESTUDIO DE REDES PROTEÍNA-PROTEÍNA
JUSTIFICACIÓN
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS PARTICULARES
MATERIAL Y MÉTODO12
Búsqueda de secuencias nucleotídicas
Búsqueda de coincidencias a través de BLAST12
CREACIÓN DE CROMOSOMAS ARTIFICIALES

АМҮЗ
PI4KG418
PHS1 y PHS2
UBQ11 y RUB1
SS3, SS2 y GBSS
DEGRADACIÓN DE PARED CELULAR
BRI1
BSK3
BZR1
ASK7
RUTA BASAL DE ABSICIÓN
AGL18
AGD5 (NEV)
SOBIR1 (EVR)
AGL15
KNAT1 y KNAT2
ETILENO ENDÓGENO
SAMDC1
TAT3 y MS2
ASA1
LYSA1
SAM1
MGL
SPDS1
ETILENO EXÓGENO

CTR1	
RUTA DE ABSCISIÓN SEMI-INDEPENDIENTE DE ETILENO	
AGI 42	35
LIGNINA	
AL DU2CA	27
ALD112C4	
СҮТВ5-В	
CONCLUSIONES	
PERSPECTIVAS	42
REFERENCIAS	
ANEYO	

RESUMEN

Desde el 2005 el cultivo de vainilla sufre una pérdida del 90% de producción a causa de la caída de ovarios no fertilizados, dicho fenómeno ocurre a través de la abscisión, este es un proceso fisiológico que causa la disolución de paredes celulares de la zona de unión entre el ovario y el raquis, cuyo inicio está relacionado con la biosíntesis de etileno. En el germoplasma cultivado de Vanilla planifolia se han descrito diferencias en el nivel de tolerancia a este fenómeno entre algunos genotipos. En este trabajo se realizó un análisis in silico para comparar los niveles de expresión de 276 genes pertenecientes a siete redes metabólicas relacionadas con la caída de ovario no fertilizado en dos genotipos de V. planifolia. Además, se crearon redes de interacción de proteínas para definir aquellos genes con mayor importancia en la regulación de sus procesos metabólicos. Se comprobó que el genotipo CH-I es resistente a la caída de ovario no fertilizado pues en él se expresan genes relacionados con la inhibición de la respuesta a etileno, a la formación de reservas energéticas como almidón y a la biosíntesis de lignina que ayuda al reforzamiento de la zona de unión. También se comprobó que el genotipo CH-VI es más susceptible a este fenómeno, pues en él se expresan en mayor medida genes relacionados con la biosíntesis de etileno, degradación de pared celular y celulosa y no ocurre formación de lignina.

ABSTRACT

Since 2005, the vanilla crops suffer a 90% loss of production due to the fall of unfertilized ovaries, this phenomenon occurs through abscission, this is a physiological process that causes the dissolution of cell walls in the area of union between the ovary and the rachis, started by ethylene biosynthesis. Differences in the level of tolerance to this phenomenon have been described in the cultivated germplasm of *V. planifolia* among some genotypes. In this work, an *in silico* analysis was carried out to compare the expression levels of 276 genes belonging to seven

metabolic networks related to the loss of unfertilized ovary in two genotypes of *V. planifolia*. In addition, protein interaction networks were created to define the most important genes in regulating their metabolic processes. It was found that the CH-I genotype is resistant to the fall of the unfertilized ovary since there is a bigger expression of genes related to the inhibition of the response to ethylene, the formation of energy reserves such as starch and the biosynthesis of lignin that helps the reinforcement of the joint area. It was also verified that the CH-VI genotype is more susceptible to this phenomenon, since it has a bigger expression of genes related to ethylene biosynthesis, cell wall and cellulose degradation, and no lignin formation occurs

INTRODUCCIÓN

Vanilla planifolia Andrews (Orchidaceae) es una orquídea nativa del trópico húmedo de México y ha sido cultivada desde antes de la llegada de los españoles en la región Totonaca de Veracruz-Puebla (Lubinsky et al. 2008; CONABIO, 2019).

Si bien la vainilla es el principal aromatizante de la industria alimentaria, la producción de vainilla de México sólo representa el 1% a nivel mundial. Y a pesar de que en el periodo 2003-2016 duplicó su producción el problema agronómico de caída prematura de fruto ha provocado una disminución de 90% en la producción de vainilla nacional y mundial (Hernández, 2014; SAGARPA, 2017).

Biológicamente, el fenómeno de caída de ovario no fertilizado, se explica a través de la abscisión, que hace referencia a la disolución de paredes celulares en el área debajo de la base del órgano floral, creando un área definida como zona de abscisión (ZA), cuyas células suelen tener paredes más delgadas que las de las adyacentes, además de presentar un citoplasma denso, mayor espacio intracelular y menor contacto entre sí (van Doorn & Stead, 1997; Sexton & Roberts, 1982).

En el caso de *V. planifolia* no se forma una zona de absición, sino que, desde la formación de la flor, se define una zona de unión entre la flor y el raquis, es en esta zona donde se realiza la abscisión.



Figura 1. Vanilla planifolia (Pabst, 1890).

Es importante señalar que se han descrito diferencias de susceptibilidad a la caída de ovario no fertilizado entre genotipos de vainilla. Particularmente, se ha observado que el genotipo CH-I es tolerante y el genotipo CH-VI es más susceptible (Salazar-Rojas et al. 2016). Por tanto, el objetivo del presente trabajo es comparar el transcriptoma diferencial de ovario no fertilizado en dos genotipos de *V. planifolia,* mediante un análisis *in silico* de la expresión de genes en diferentes rutas metabólicas.

MARCO TEÓRICO

Absición

La abscisión es un proceso fisiológico que se originó temprano en el curso de la evolución con la capacidad de las células vegetales para separarse unas de otras, conforme las plantas se hicieron más complejas está capacidad también lo hizo, llegando a poder ser localizada en ciertas zonas para separar órganos enteros del organismo como hojas, flores, pétalos, y frutos. Las plantas con flores hacen uso de esta capacidad para su dispersión, por ejemplo, hay plantas que generan una gran cantidad de flores como seguro de que no todas puedan llegar a convertirse en frutos y, después de haber obtenido unos cuantos, de ellos, se deshacen de las flores restantes. También existen plantas que además de hacer esto, conservan más frutos jóvenes de los que pueden madurar y después someten el exceso de ellos a abscisión. Al final, pueden también cortar los frutos ya maduros con el fin de dispersarse (Addicot, 1982; Sexton & Roberts, 1982; Patterson, 2001; Estornell et al. 2013).

El proceso de abscisión ocurre a través de la definición de zonas de abscisión, áreas localizadas entre la unión del órgano al cuerpo principal de la planta, caracterizadas por presentar varias capas de células con paredes delgadas, con un citoplasma denso, mayor espacio intracelular y menor contacto entre unas y otras. Presentan acumulación de microcuerpos e invaginaciones en la membrana plasmática, además de un ensanchamiento en la parte proximal o distal de la zona de abscisión (van Doorn & Stead, 1997; Sexton & Roberts, 1982, Patterson, 2001; Tripathi et al. 2008; Estornell et al. 2013).

Las zonas de abscisión pueden diferenciarse a partir de estímulos ambientales o fisiológicos, o estar presentes desde etapas tempranas del desarrollo de los órganos laterales del organismo (Estornell et al. 2013). En dicho caso las zonas de abscisión presentan pequeñas células isodiamétricas que pueden ocupar hasta cincuenta capas celulares, estas células se dividen más frecuentemente y carecen de características propias de células maduras como la lignificación. La forma de estas

células podría deberse a una adaptación geométrica, pues al comenzar a separarse unas de otras, estas se elongarían de forma longitudinal estrechándose y causando la ruptura del tejido. Por otro lado, la falta de lignificación puede deberse a que la lignina es especialmente resistente a las enzimas hidrolíticas que son necesarias para romper las paredes de estas células, por lo que su presencia representaría un refuerzo para la zona (Sexton & Roberts, 1982).



Figura 2. Corte histológico de la zona de abscisión del fruto de *V. planifolia* en un genotipo no susceptible a caída de ovario no fertilizado (izquierda) y uno susceptible (derecha) (Salazar-Rojas et al. 2016).

Se ha propuesto un modelo que divide a la abscisión en cuatro eventos importantes:

- El primero es la determinación de la zona de abscisión, en donde las células pertenecientes al tejido de unión de la planta al órgano que será cortado adquieren las características propias de la zona de abscisión; no hay registros de que la abscisión pueda iniciar sin que esta diferenciación celular ocurra.
- El segundo evento es la capacidad para responder a las señales de abscisión en donde las células se vuelven sensibles a las señales fitohormonales que pueden iniciar el proceso.
- El tercer paso es la activación de la abscisión, aquí ocurre la separación del órgano y el cuerpo principal de la planta.

 El último evento es la formación de una capa protectora para evitar daños por el ambiente (Patterson 2001; Estornell et al. 2013).



Figura 3. Etapas del proceso de abscisión (Estornell et al. 2013).

La abscisión ocurre tras una serie de eventos bioquímicos coordinados y está mediada por fitohormonas. Algunas de las que promueven el proceso son el ácido abscísico, el ácido jasmónico y el etileno, mientras que las giberelinas, poliaminas, brasinoesteroides y auxinas lo inhiben. Además, es necesaria la presencia de enzimas hidrolíticas para degradar las paredes de las células de la zona de abscisión. (Beyer & Morgan, 1971; Sexton & Roberts, 1982; Patterson, 2001; Estornell et al. 2013).

El etileno es una de las fitohormonas principales que participan en la abscisión y lo hace a través de diferentes rutas de señalización.

El etileno es especialmente importante para la abscisión, ya que forma parte de eventos, como la senescencia y el estrés ambiental, que promueven este proceso. Esta molécula puede estar presente en la planta por ruta exógena, llevando a cabo señalización por medio de receptores o de manera endógena siendo sintetizada a través del ciclo de Yang. La sobreexpresión de esta fitohormona acelera la abscisión. El etileno también puede activar la expresión de genes necesarios para la remodelación de paredes celulares. Sin embargo, se ha visto que al inhibir los genes encargados de la respuesta a esta fitohormona (ETR1 y EIN2) la abscisión

continúa, aunque con retraso, ello sugiere que el etileno podría no ser absolutamente esencial para este proceso. Para dar explicación a esto se ha propuesto una ruta de abscisión semi-independiente de etileno, la cual está mediada por el complejo del péptido Inflorescence deficient in abscission (IDA) y las cinasas HAESA (HAE) y HAESA-like2 (HSL2), siendo estas esenciales en las últimas fases de la abscisión pudiendo actuar en ausencia de etileno, sin embargo, el etileno también puede activar a este complejo lo que hace que la ruta no sea completamente independiente de la fitohormona y que esta represente una mayor importancia en el inicio de la abscisión (Bleecker & Patterson 1997; van Doorn, 2002; Patterson & Bleecker, 2004; Estornell et al. 2013; Granados, 2019; Meir et al. 2019). Además, se ha sugerido que puede existir una ruta de abscisión basal que ocurre río arriba de estas dos rutas, pues la percepción del etileno depende de varias señales. Se sugiere que en esta ruta participan factores de transcripción como AGL15, BOP2, NEV, EVR y KNAT2 (Granados, 2019).

Existe variación genotípica entre las poblaciones de *V. planifolia* cultivadas en la región de Totonacapan, Veracruz-Puebla.

En el 2012 Salazar-Rojas et al., con el fin de obtener información sobre el nivel de polimorfismo en el germoplasma de *V. planifolia*, midieron los niveles de cuatro ácidos aromáticos (Vainillina, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico) que definen la calidad del aroma de sus frutos. Sus resultados mostraron que en las diferentes poblaciones de *V. planifolia* existen distintos niveles de ácidos aromáticos que se pueden clasificar en seis genotipos. La variación de estos genotipos responde a un proceso de selección por domesticación, aquellos genotipos más cultivados son los que poseen una mayor cantidad de vainillina y los menos cultivados los que presentan características aromáticas silvestres (menor cantidad de vainillina). Las diferencias entre los genotipos también llevan a la caída de ovario no fertilizado, se encontró que existe un genotipo (CH-I) con bajo porcentaje de caída de ovario no fertilizado y otro (CH-VI) que es más susceptible

a este proceso (Salazar-Rojas et al. 2016; Granados, 2019). En 2016, Salazar-Rojas et al., realizaron una comparación de la expresión genética de estos genotipos y encontraron que en el genotipo CH-VI la biosíntesis de lípidos es menor que en el genotipo CH-I, además, no existe síntesis de lignina ni de auxinas y hay un aumento en el metabolismo del etileno.

Redes de interacción proteína-proteína

Las proteínas son macromoléculas capaces de interactuar entre sí y con otras moléculas para llevar a cabo funciones como señalización, almacenamiento, movimiento, defensa, funciones catalíticas o incluso unirse unas con otras para formar estructuras necesarias para darle estabilidad a la célula. Es evidente entonces, que la importancia de las proteínas yace (en mayor medida) en las interacciones que estas tienen con otras moléculas y no simplemente en su existencia individual. Estas interacciones permiten el correcto funcionamiento de los procesos biológicos de los que depende un organismo, y son especialmente relevantes tanto en las rutas metabólicas encargadas de sintetizar o degradar compuestos según sea necesario, como en las rutas de señalización que pueden darse de manera intra o intercelular. Además, las interacciones proteicas pueden representar un papel importante en la evolución pues, sabiendo que las diferentes especies proceden de un ancestro en común, se puede asumir que ciertos genes y las proteínas para los que estos codifican están igual de conservados que las interacciones que después se generan entre ellos (Roy et al. 2019).

Las interacciones proteína-proteína representan un campo de estudio muy extenso, pueden clasificarse según su tipo de interacción en físicas (unas se unen a otras, normalmente para formas estructuras) y funcionales (se unen con el fin de señalizar o activarse). O, según el tiempo que duran, en transitorias y persistentes, y por la cantidad de interacciones que forman en nodos (con muchas interacciones) y bordes (con muy pocas interacciones). Es esta variedad en las interacciones entre proteínas lo que hace de ellas un gran campo de estudio que puede aportar mucha

información para la resolución de diversos problemas como la creación o mejoramiento de fármacos, el entendimiento de estructuras proteicas complejas, o la elucidación de rutas metabólicas enteras y la interacción que puede haber entre ellas.

Haciendo uso de la teoría gráfica, este tipo de interacciones puede representarse en redes de interacción proteína-proteína, donde las proteínas son representadas como nodos (cualquier figura o cuerpo geométrico) y sus interacciones como ejes que conectan estos nodos que, comúnmente, no tienen dirección pues las interacciones ocurren en ambos sentidos (Snider et al. 2015; Folador et al. 2018).

NetworkAnalyst como herramienta integrativa para el estudio de redes proteína-proteína

Se puede extender la cantidad y tipo de información obtenida de las redes de interacción proteína-proteína al incluir otros datos, como la expresión de estas en diferentes condiciones (expresión diferencial), lo que puede llevar a comprender que interacciones están presentes en mayor medida en una u otra condición, así como identificar nuevos objetivos de estudio que puedan ser importantes para que existan tales cambios entre las condiciones. Network analyst es una herramienta web que responde a esta necesidad (Xia et al. 2014). En la actualidad, Network analyst no solo sirve para esto, sino que ha evolucionado y ha agregado más herramientas como la creación de redes de interacción de proteínas célula o tejido específicas, redes regulatorias de genes, redes de coexpresión de genes y redes estudios tóxico y farmacogenómicos. Además de herramientas visuales como redes 2D, 3D, y realidad virtual (VR) (Xia et al. 2015, Zhou et al. 2019).

Para generar las redes de interacción de proteínas Network analyst utilizaba una base de datos específica que solo contenía datos de dos especies (humano y ratón), sin embargo, con el fin de extender la posibilidad de más estudios sobre diferentes especies, ahora utiliza la herramienta Search Tool for Retrieval of Interacting

9

Genes/Proteins (STRING), cuyo objetivo es obtener datos de interacción de genes y proteínas a través de la minería de datos en textos y bases oficiales como KEGG (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes) además de utilizar interacciones obtenidas a través de la predicción computacional (Szklarczyk et al. 2019).

A pesar de su gran evolución, Network analyst solo puede hacer análisis acerca de organismos modelo, pues las interacciones entre proteínas son un campo aún en desarrollo que requiere de muchos estudios tanto experimentales como computacionales para generar el conocimiento necesario sobre interacciones de proteínas en organismos específicos (Zhou et al. 2019). Sin embargo, recordando que las proteínas evolucionan junto con las especies que forman, y seguramente sus interacciones también lo hagan, el uso de datos de organismos específicos a través de bases de organismos modelo, se convierte en una solución factible que puede ayudar a resolver problemas relacionados con la interacción de proteínas sin pasar años realizando estudios experimentales para comprobarlas una a una (Roy et al. 2019).

JUSTIFICACIÓN

Analizar las diferencias en la expresión de los genes que son parte de las rutas metabólicas involucradas en el proceso de caída prematura de ovario no fertilizado entre un genotipo tolerante y uno susceptible, permite identificar cuáles de esos genes son los más relevantes para que dicho fenómeno ocurra. Además, analizar las diferencias de expresión entre genotipos usando redes de interacción de proteínas facilita reconocer que proteínas interactúan y cuáles de ellas son especialmente relevantes para que ocurra la caída prematura de ovario no fertilizado.

La identificación de los genes de mayor importancia para la caída prematura del ovario no fertilizado permitirá proponer nuevos estudios enfocados a elucidar la manera en que estos contribuyen al proceso lo que dará paso a la creación de estrategias dedicadas a regular su expresión con el fin de evitar la caída prematura de ovario no fertilizado. Tomando en cuenta que este fenómeno ha causado pérdidas de productividad de hasta 90% en el cultivo de vainilla prevenir su ocurrencia podría incrementar los rendimientos de cultivo en igual medida.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el transcriptoma diferencial de ovario en dos genotipos de *V. planifolia,* por medio del análisis *in silico* de redes de expresión genética en diferentes rutas metabólicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Calcular y comparar los niveles de expresión de las rutas metabólicas asociadas a caída de ovario no fertilizado en *V. planifolia* en los genotipos CH-I y CH-VI.

Crear redes génicas con los valores de expresión de los genes de las rutas metabólicas asociadas a caída de ovario no fertilizado en *V. planifolia* en los genotipos CH-I y CH-VI para identificar genes de alto interés.

MATERIAL Y MÉTODO

Búsqueda de secuencias nucleotídicas

Se buscaron las rutas metabólicas de biosíntesis de lignina y etileno (ciclo de Yang), síntesis y degradación de celulosa, degradación de pared celular y ruta de respuesta a etileno exógeno para Dendrobium catenatum y Arabidopsis thaliana en el sitio web Encyclopedia of Genes and Genomes Kyoto (KEGG: https://www.genome.jp/kegg/pathway.html) y se descargaron las secuencias en formato FASTA de cada una de las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas que forman parte de estas rutas. Adicionalmente, las proteínas pertenecientes a las rutas basal de abscisión y semindependiente de etileno se descargaron directamente de The Arabidopsis Information Resource (TAIR: https://www.arabidopsis.org).

Búsqueda de coincidencias a través de BLAST

Cada secuencia perteneciente *A. thaliana* fue comparada con la familia Orchidaceae utilizando la herramienta BLAST del sitio en línea NCBI. Una vez encontrada la secuencia con mayor coincidencia (nunca por debajo de 80%) se descargó el formato FASTA de la orquídea correspondiente.

Después, utilizando el programa Geneious 9.1, se realizó un BLAST para cada proteína para encontrar coincidencias con el genoma (BioProject: PRJNA507095) y un transcriptoma (Accession: PRJNA339318) de *V. planifolia* obtenidos previamente. Las secuencias coincidentes obtenidas de este análisis fueron comparadas una vez más a través de un BLAST en NCBI en contra de miembros de la familia Orchidaceae logrando así una triple verificación de la coincidencia de secuencias entre especies y/o familias.

Creación de cromosomas artificiales

Una vez obtenidas las secuencias de las proteínas de *V. planifolia* se separaron en siete grupos correspondientes a cada ruta metabólica a analizar (Biosíntesis de lignina, biosíntesis de etileno, síntesis y degradación de celulosa, degradación de pared celular, respuesta a etileno exógeno, ruta basal de abscisión y ruta semindependiente de etileno). Para cada grupo, las secuencias se concatenaron en una sola utilizando espaciadores de 100 nucleótidos de longitud, para formar cromosomas artificiales.

Mapeo de cromosomas contra ambos genotipos y comparación de expresión

Cada uno de los cromosomas artificiales fueron mapeados contra los dos transcriptomas a analizar (genotipo CH-I y genotipo CH-VI). A continuación, se calcularon los niveles de expresión para cada transcriptoma y se compararon entre sí, de acuerdo con el protocolo del software Geneious 9.1.

Análisis de redes de interacción proteína-proteína

Una vez obtenidos los niveles de expresión para cada ruta metabólica se recuperaron el número de lecturas (*reads*) crudas del transcriptoma de cada gen normalizadas del CH-I y CH-VI y se asociaron a la ID de TAIR para crear tablas de expresión de genes analizables en el sitio web NetworkAnalyst (<u>networkanalyst.ca</u>), tal como se muestra en su tutorial. Sólo se tomaron en cuenta aquellos genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas, esto es: con un valor de *p*< 0.5 y una razón de expresión diferencial (calculada automáticamente por el programa Geneious 9.1) \leq -1 o \geq 1. Después, la tabla fue subida a NetworkAnalyst, usando *A. thaliana* como organismo, "cuentas" para el tipo de datos, "ID de TAIR" como tipo de identificadores y "Sumas" para la sumatoria a nivel de genes. Los filtros se mantuvieron tal y como aparecen predeterminados en la aplicación (15 para el filtro de varianza y 4 en el filtro de abundancia baja), y la normalización se utilizó

ninguna dado que los dados ya han sido previamente normalizados por el programa Geneious. El método estadístico de expresión diferencial elegido fue la prueba de Limma y se utilizó la comparación específica entre transcriptomas. Respecto de los límites de significancia el valor p fue de 0.05 y el cambio de veces de log₂ de 1. Luego, para el método de mapeo se utilizó "Generic Protein Interaction" (Interacción proteína-proteína genérica) para crear una red de interacción de proteínas con la herramienta "String Interactome" con un valor de confianza de 800 siendo necesarias las evidencias experimentales para determinar las interacciones. Se utilizaron las redes obtenidas directamente sin hacer más cambios más que a la presentación de estas eligiendo "expresión" y proyección en tercera dimensión.

Segundo análisis de redes de interacción proteína-proteína

Las redes sugirieron proteínas asociadas a las ya analizadas por lo que estas se buscaron en el sitio web "NCBI protein" (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein</u>) para obtener las secuencias en formato FASTA de las secuencias nucleotídicas que las codifican. El proceso de utilización del programa Geneious se repitió con estas para encontrar las coincidencias en el transcriptoma y genoma de *V. planifolia*, pasando primero por un BLAST contra la familia Orchidaceae si los nucleótidos solo fueron encontrados para *A. thaliana*, los cromosomas artificiales ya existentes se extendieron al concatenarles estas nuevas secuencian y se repitió el cálculo y comparación de expresión en ambos genotipos. Después, utilizando estos datos, las tablas de NetworkAnalyst fueron extendidas y se obtuvo una red más grande de los genes involucrados en cada una de las rutas. Se eligió solo presentar las redes basales en este trabajo para mantener un enfoque más específico de las rutas metabólicas analizadas.



Figura 4. Diagrama de flujo que explica el método utilizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron los datos de expresión diferencial de 276 genes presentados en una tabla (ver Anexo) junto con la razón de expresión diferencial de cada gen entre los dos genotipos analizados.

Se obtuvieron siete redes de interacción de proteínas para las diferentes rutas metabólicas analizadas. Todas las redes fueron coloreadas en gris y distintos tonos de verde y rojo, los tonos rojos indican una mayor expresión en el genotipo CH-VI (susceptible a caída de ovario no fertilizado) y los tonos verdes indican mayor

expresión en el genotipo CH-I (no susceptible a caída de ovario no fertilizado), la intensidad del color indica qué tan diferente es la expresión de un genotipo a otro, tonos más intensos sugieren mayor expresión del gen en un genotipo, además entre más grande es el diámetro de la esfera que representa al nodo existe una mayor cantidad de interacciones con otras proteínas.

Se identificaron cinco redes metabólicas involucradas: celulosa, degradación de pared celular, etileno endógeno, etileno exógeno, y lignina, estas responden al mismo código de color que las redes de interacción de proteínas.

Metabolismo Celulosa

La red principal de metabolismo de celulosa (Fig. 4) contiene seis nodos, cuatro de los cuales están mayormente expresados en el genotipo CH-VI (AMY3, PI4KG4, UBQ11 y RUB1) y dos en el genotipo CH-I (PHS1 y PHS2).



Figura 5. Red principal de interacción de proteínas para la vía metabólica de síntesis y degradación de celulosa. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en verde y los más expresados en el CH-VI en rojo. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.

Tabla 1. Valores de razón de cambio (logFC) y valor P (signific	ancia) de los nodos
en la red de celulosa.	

AMY3	Nombre	logFC valor P	
RUB1-55.66.3376E-64PI4KG4-4.12.8402E-67UBQ11-4029.91.7425E-65PHS22.5358E-663.2845E-67PHS1/GPP19.73.2845E-67GBSS11.4059E-693.9882E-67SS25.23.0882E-67SS310.82.6081E-67	AMY3	-3	5.5072E-73
PI4KG4-4.12.8402E-67UBQ11-4029.91.7425E-65PHS22.5358E-66PHS1/GPP19.73.2845E-67GBSS1124.41.4059E-69SS23.9882E-67SS310.82.6081E-67	RUB1	-55.6	6.3376E-64
UBQ11-4029.91.7425E-65PHS216.52.5358E-66PHS1/GPP19.73.2845E-67GBSS11.4059E-691.4059E-69SS25.23.9882E-67SS310.82.6081E-67	PI4KG4	-4.1	2.8402E-67
PHS2 16.5 2.5358E-66 PHS1/GPP 19.7 3.2845E-67 GBSS1 124.4 1.4059E-69 SS2 5.2 3.9882E-67 SS3 10.8 2.6081E-67	UBQ11	-4029.9	1.7425E-65
PHS1/GPP 19.7 3.2845E-67 GBSS1 124.4 1.4059E-69 SS2 5.2 3.9882E-67 SS3 10.8 2.6081E-67	PHS2	16.5	2.5358E-66
GBSS1124.41.4059E-69SS25.23.9882E-67SS310.82.6081E-67	PHS1/GPP	19.7	3.2845E-67
SS2 5.2 3.9882E-67 SS3 10.8 2.6081E-67	GBSS1	124.4	1.4059E-69
SS3 10.8 2.6081E-67	SS2	5.2	3.9882E-67
	SS3	10.8	2.6081E-67

AMY3: La proteína AMY3 o α -amilasa 3 es una glucano hidrolasa que corta los enlaces α -1,4-glucosídicos en el almidón (Seung et al. 2013). El almidón está directamente relacionado con los precursores de la celulosa y su degradación está vinculada a la senescencia de hojas y a la abscisión de órganos florales. Hay evidencia que dicta que en las zonas de abscisión previamente al propio evento de abscisión, el almidón es degradado y transportado en forma de glucosa hacia los tallos de la planta (Lloyd, 1916; Poapst, 1959; Bornman et al. 1966; Alonso, 2011). Una mayor expresión del gen que codifica para la proteína AMY3 (ver tabla 1) en el genotipo CH-VI podría apoyar la afirmación de que este es más susceptible a la caída de ovario no fertilizado y el hecho de que exista una diferencia en la expresión entre genotipos hace de este un gen de interés para el estudio de este fenómeno.

PI4KG4: Fosfatidilinositol-4-cinasa-γ-4 (PI4KG4) es otro de los nodos que tienen una mayor expresión en el genotipo CH-VI respecto del genotipo CH-I (ver tabla 1). El rol de esta proteína en la célula aún no está bien descrito, sin embargo, se ha visto que, al inhibirla en células sometidas a medios libres de sacarosa, condición que causaría que la celulosa sintasa migre de la membrana plasmática al citoplasma, la celulosa sintasa se mantiene en la membrana. Se cree entonces que el trabajo de la PI4KG4 es hacer migrar la celulosa sintasa de la membrana plasmática hacia el citoplasma, en los casos en que sea necesario modificar la pared celular (Fujimoto et al 2014). Esto tiene sentido en el caso del fenómeno de la abscisión, pues se ha descrito que las zonas de abscisión se caracterizan por estar formadas por células de paredes delgadas, es decir con menor cantidad de celulosa (van Doorn & Stead, 1997; Sexton & Roberts, 1982). Es lógico suponer entonces que en el genotipo CH-VI una mayor expresión de la PI4KG4 se debe a la gran migración de celulosa sintasa fuera de la membrana plasmática para evitar la síntesis de celulosa y obtener células con paredes delgadas. **PHS1 y PHS2:** A diferencia de las proteínas anteriormente mencionadas, PHS1 y PHS2 se encuentran mayormente expresadas en el genotipo CH-I (ver tabla 1). La fosforilasa plastidial (PHS1) Y su isoforma citosólica (PHS2) se encargan de degradar el almidón, pero no lo hacen como AMY3 cuyo fin es degradar el almidón para enviarlo hacia los tallos una vez comienza la abscisión (Lloyd, 1916; Poapst, 1959; Bornman et al. 1966; Alonso, 2011), PHS1 y PHS2 degradan el almidón y lo convierten en α -D-glucosa-1-fosfato (Malinova, 2014) que después puede ser convertida a ADP-Glucosa para formar más almidón o a GDP-glucosa para formar celulosa (Schomburg et al 2007). Es posible que esta proteína se esté utilizando para degradar las reservas de almidón en las células y utilizarlas para generar celulosa con el fin de fortalecer las paredes y evitar la abscisión asegurando la supervivencia de los frutos de la planta. Sin embargo, es necesario estudiar la expresión de PHS1 y PHS2 junto con los niveles de almidón y celulosa en ambos genotipos para confirmar esta hipótesis.

UBQ11 y RUB1: Otras de las proteínas que presentan mayor expresión en el genotipo CH-VI son la Ubiquitina 11 (UBQ11) y la proteína relacionada a ubiquitina 1 (RUB1). Las ubiquitinas han sido estudiadas extensamente y se sabe que tienen distintas funciones siendo la principal el marcaje de proteínas para su posterior degradación (Zamudio-Arroyo 2012; Hernandez 2013). El ser parte de un proceso que involucra tantas proteínas de diferentes rutas metabólicas podría hacer de UBQ11 un nodo poco informativo, sin embargo, debe ser notado que este nodo aparece junto con RUB1 con una expresión similar hacia el mismo genotipo. RUB1 está implicado en la conjugación con el complejo Skp1-Cullin1-F-box-Transport inhibitor response 1 (complejo SCF-TIR1) que está relacionado con la respuesta a auxinas (Dharmasiri et al. 2005). Se ha visto que RUB1 se une a la subunidad Culina 1 (CUL1) de este complejo y ayuda a la conjugación del complejo SCF-TIR1 con proteínas AUX/IAA para degradarlas e iniciar la respuesta a auxinas (Gray et al. 2001). Este complejo también está implicado con la degradación de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) lo que promueve el paso de la fase G1 a la S del ciclo celular (Pozo et al. 1998; del Pozo & Estelle, 1999; del Pozo et al.

2002; Gutiérrez, 2002). Desde la perspectiva de la abscisión, la existencia de estos dos nodos (UBQ11 y RUB1) en el genotipo CH-VI, puede explicarse con la creación de las propias zonas de abscisión, RUB1 estaría encargándose de activar el complejo SCF-TIR1 y junto con UBQ11, estaría degradando los inhibidores que evitan la continuación del ciclo celular para así promover la proliferación de células dentro y debajo de la zona de abscisión, las primeras para generar una zona débil que pueda cortarse y las otras para empujar dicha zona y terminar con el proceso de corte del órgano floral. Existe sólo un problema con esta hipótesis, y es que para que todo este mecanismo funcione se requiere la presencia de auxinas, y se ha establecido que dichas moléculas están presentes en menor cantidad en el genotipo CH-VI (Granados, 2019). Esto llevaría a pensar que tanto RUB1 como UBQ11 deberían estar mayormente expresadas en el genotipo CH-I a pesar de que los datos muestran lo contrario. Una posible explicación para estos datos es que las auxinas estén presentes en mayor cantidad durante la creación de la zona de abscisión para promoverla y después disminuyen hasta tal punto que se inhiba el crecimiento de los órganos a expulsar. Esta teoría coincide con la propuesta por Basu et al. (2013), quienes demostraron que una gran cantidad de auxinas puede evitar la abscisión, pero la inhibición total de estas moléculas también; entonces, se deduce que es necesaria una pequeña cantidad de ellas para el inicio de la abscisión seguida de una disminución en su concentración para continuar con el proceso.

SS3, SS2 y GBSS: Las proteínas almidón sintasa 3 y 4 (SS3 y SS2) y la almidón sintasa unida al gránulo 1 (GBSS1) son nodos terminales en la red de la ruta metabólica de celulosa cuya expresión es superior en el genotipo CH-I. Antes se habló de que en este genotipo el almidón estaba siendo degradado por PHS1 y PHS2 y, el hecho de que SS3, SS2 y GBSS1 se encarguen de sintetizar este mismo compuesto (Streb & Zeeman, 2012) puede ser contradictorio. Sin embargo, se debe tomar en cuenta un proceso esencial que existe en un genotipo y en otro no: la fotosíntesis. En las células del genotipo CH-VI este proceso se detiene, pues el órgano floral está a punto de ser sometido a abscisión y es inútil para la planta seguir

generando energía para un tejido que, técnicamente, ya no es necesario (Zhu et al. 2011). En el genotipo CH-I la fotosíntesis continúa con normalidad para lograr el crecimiento del fruto, ello causa que exista una mayor síntesis del compuesto almidón en las plantas menos susceptibles a caída de ovario no fertilizado, pues este compuesto es el principal almacén de energía en las plantas (Dashek, 2010; Yang et al. 2018).



Figura 6. Red metabólica de sacarosa y almidón. Se muestran los genes mayormente expresados en el genotipo CH-VI en rojo [**3.2.1.21** = BG1 (β -glucanasa-1); **3.2.1.4** = EGN (Endoglucansa); **2.7.7.9** = UGP1 (UTP-glucosa-1-fosfato-uridiltransferasa); **3.2.1.68** = ISA (Isoamilasa); **3.2.1.1** = AMY3 (α -amilasa-3); **3.2.1.2** = BAM (β -amilasa)], y los mayormente expresados en el genotipo CH-I en verde [**3.6.1.21** = NUDX14 (Nudix-hidrolasa-14); **2.4.1.21** = SS3 (Almidón sintasa 3); **2.4.1.242** = GBSS (Almidón sintasa unida al granulo);

2.4.1.1 = PHS1 (α-glucano-fosforilasa-1) 2.4.1.18 = SBE (Enzima ramificadora de almidón);
2.4.1.25 = DPE (Enzima desproporcionante)]. En el círculo azul se encuentra la celulosa y en el morado el almidón. Modificada de https://www.kegg.jp

Degradación de pared celular

La red principal de proteínas involucradas en la degradación de pared celular encontrada en *V. planifolia,* está relacionada con sus ortólogos en los brasinoesteroides presentes en la familia Brassicaceae, por lo que sus funciones fueron consideradas como válidas para esta red. Esta red contiene únicamente cuatro nodos, dos de ellos tienen una mayor expresión en el genotipo CH-I (BRI1 y BSK3) y los dos restantes en el genotipo CH-VI (BZR1 y ASK7) (Fig. 6).



Figura 7. Red principal de interacción de proteínas para la ruta metabólica de degradación de pared celular. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en

verde y los más expresados en el CH-VI en rojo. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.

Tabla 2. Valores de razón de cambio (logFC) y valor P (significancia) de los nodos en la red de degradación de pared celular.

Nombre	logFC	valor P
BR1	9.5	3.97E-74
BZR1/2 (protein BZR1 homolog 1)	-41.9	9.70E-72
BIN2/ASK7	3.4	5.75E-70
BSK3	-12.1	7.64E-70

BRI1: (Brassinosteroid insensitive 1) codifica para un receptor transmembranal tipo cinasa cuyo sustrato es el brasinólido (Wang et al. 2001). Esta molécula, junto con los demás brasinoesteroides, está asociada con el crecimiento celular y el desarrollo en las plantas (Noguchi et al 1999; Peng et al. 2018). Una mayor expresión de BRI1 en el genotipo CH-I no es inusual pues este, a diferencia del genotipo CH-VI, continuará su crecimiento de manera normal.

BSK3: La cinasa de señalización por brasinoesteroides 3 (BSK3) es el sustrato de BRI1 dentro de la membrana, esta proteína inicia la transducción de señales por brasinoesteroides (Tang et al. 2008; Sreeramulu et al. 2013). BSK3 se expresa mayormente en el genotipo CH-I (ver tabla 2) lo que indica que en este el crecimiento continúa, mientras que en el otro (CH-VI), debido a la caída de ovario no fertilizado, disminuye.

BZR1: Actúa como represor de la biosíntesis de brasinoesteroides lo que podría explicar su mayor presencia en el genotipo CH-VI (ver tabla 2), pues estaría evitando la continuación del crecimiento del órgano floral (Huang et al. 2013). Existe solo un problema con este razonamiento, BZR1 también es un factor de
transcripción que funciona como mediador de la respuesta de crecimiento en la planta (He et al. 2005). Una posible explicación que se ajusta a esta función dual de la proteína es que los datos aquí analizados corresponden a la expresión del gen que la codifica y no a la cantidad de la proteína misma. Es decir, en el genotipo VI se estaría generando BZR1 para frenar la biosíntesis de brasinoesteroides sin que esto quiera decir que la proteína se está acumulando para mediar el crecimiento.

ASK7: El otro nodo asociado al genotipo CH-VI (ver tabla 2): ASK7 (o BIN2 Brassinosteroid insensitive 1), apoya la explicación de la presencia de BZR1 pues este se encarga de inhibirlo. Se ha visto que, en ausencia de brasinoesteroides, BIN2 (ASK7) fosforila a BZR1 dejándolo inactivo, esto evitaría que cumpla su función como factor de transcripción para la regulación del crecimiento (He et al. 2002; Li & Nam, 2002; Ashraf et al. 2010). En el genotipo VI, entonces, BZR1 estaría generándose para evitar la biosíntesis de brasinoesteroides, pero, gracias a BIN2, no estaría acumulándose para iniciar respuestas de crecimiento. Es necesario hacer un estudio en el que se midan la concentración de brasinoesteroides y la acumulación de BZR1 desfosforilada junto con los niveles de expresión de *BZR1* y *BIN2* para confirmar esta teoría.



Figura 8. Red metabólica de degradación de pared celular. Red metabólica de brasinosteroides (proceso para llegar a la degradación de pared celular). Se muestran los genes mayormente expresados en el genotipo CH-VI en rojo y los mayormente expresados en el genotipo CH-I en verde. Modificada de https://www.kegg.jp.

Ruta basal de absición

De la ruta basal se obtuvieron dos redes principales, ya que algunos nodos tienen mayor interacción entre sí (como es el caso de KNAT1 y KNAT2) pero dicha relación con los demás es demasiado débil para estar en una misma red. De la primera red se obtuvieron cuatro nodos, tres de los cuales están mayormente expresados en el genotipo CH-VI. La segunda red contiene dos nodos y ambos están expresados en el genotipo CH-I.



Figura 9. Primera red principal de interacción de proteínas para la ruta basal de caída de ovario no fertilizado. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en verde y los más expresados en el CH-VI en rojo. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.



Figura 10. Segunda red principal de interacción de proteínas para la ruta basal de caída de ovario no fertilizado. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en verde. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.

Tabla 3. Valores de razón de cambio (logFC) y valor P (significancia) de los nodos en la red basal de abscisión.

Nombre	logFC	valor P
AGL 15	69.8	1.06E-80
AGL18	-149.4	1.69E-84
EVR/SOBIR1	-3	4.03E-78
NEV/AGD5	-37.1	5.49E-82
KNAT1	112.3	1.34E-83
KNAT2	42.2	6.36E-83

AGL18: Es el nodo con mayor expresión en el genotipo VI para esta ruta (ver tabla 3), su presencia en este genotipo tiene sentido pues esta proteína previene la floración además de que evita el crecimiento de ramas laterales (Adamczyk et al. 2007; Kai et al. 2018).

AGD5 (NEV): Se encarga del transporte intracelular de moléculas esenciales para el proceso de abscisión en la planta, además de que evita la elongación de las células en esta zona (Liljegren et al. 2009; Leslie et al. 2010; Liu et al. 2013; Gubert & Liljegren, 2014).

SOBIR1 (EVR): Restringe el proceso de abscisión a una sola zona y regula el tiempo en que esta ocurrirá al alterar la localización de proteínas promotoras del proceso como IDA y HAE/HSL2 (Leslie, 2010; Gubert & Liljegren, 2014).

AGL15: Es el único nodo con una expresión mayor en el genotipo CH-I en la primera red basal. Esta proteína se encarga de retrasar la senescencia y aumentar la longevidad de las flores (Fang & Fernandez, 2002). Su presencia en este genotipo podría no ser para evitar la caída de ovario no fertilizado, sino para asegurar la supervivencia del fruto de *V. planifolia*.

KNAT1 y KNAT2: En la segunda red aparece el nodo KNAT1, esta proteína se encarga de mantener indiferenciadas las células meristemáticas (Lincoln et al. 1994), además de que previene la abscisión prematura al regular el momento en que esta debe iniciar. KNAT2, por otro lado, es un regulador positivo de la separación de las células (Shi et al. 2011). KNAT1 se encarga de suprimir el efecto de KNAT2 por lo que su expresión en el genotipo CH-I podría estar asociada al crecimiento y no a la caída de ovario no fertilizado.

Etileno endógeno

En la red principal del metabolismo de etileno endógeno se encuentran 9 nodos, cinco mayormente expresados en el genotipo CH-VI y cuatro en el CH-I.



Figura 11. Red principal de interacción de proteínas para la ruta metabólica de etileno endógeno. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en verde y los más expresados en el CH-VI en rojo. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.

i abla 4.	Valores	de razon	de cambio	i (logFC) y	valor P	(significancia)	de los	nodos
en la rec	d de etile	no endóg	eno.					

Nombre	logFC	valor P
AMTD	-1013.5	8.57E-68
(SAMDCY)		
ТАТ	-24.9	4.75E-69
MS2	-60	2.44E-65
ASA1	-4.9	1.38E-65
LYSA1	-3.6	1.49E-64
AMS/SAM1	76	3.43E-60

MGL	14.5	1.34E-64
SS (SPDS1)	14.5	1.20E-63
СРА	19.3	8.23E-68

SAMDC1: En el genotipo CH-VI se expresan mayormente genes que promueven la biosíntesis de etileno, la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC1) por ejemplo, usa como sustrato a la S-adenosilmetionina y la convierte en Metiltioadenosina, esta reacción es importante para sintetizar etileno a través de las enzimas 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y amino-ciclopropanocarboxilato oxidasa (ACO1) (Shelly, 2000; Bürstenbinder, 2006; Argueso et al. 2007). Estas enzimas también están mayormente expresadas en el genotipo CH-VI (ver Anexo) lo que indica una mayor presencia de etileno endógeno en este genotipo. La biosíntesis de etileno está asociada a la creación de zonas de abscisión en las plantas (González-Carranza et al. 1998) y se ha visto que al inhibir SAMDC1 las inflorescencias crecen a un mayor ritmo (Ge et al. 2006), por lo que esta proteína debe estar presente en mayor medida en el genotipo CH-VI para responder a la necesidad de evitar el crecimiento de tejidos que van a ser cortados por la planta además de iniciar la abscisión de los mismos. SAMDC1 también es importante en el ciclo de la metionina, pues su producto, la metiltioadenosina puede ser convertida en metionina usando ATP (Bürstenbinder, 2006).

TAT3 y MS2: Otras de las proteínas que intervienen en este ciclo son la Tirosina aminotransferasa 3 (TAT3) que interviene en la síntesis de metionina a partir del 4-Metiltio-2-oxobutanoato y la Metionina sintasa (MS2) que se encarga, obviamente, de sintetizar metionina (Ravanel et al. 2004). Se ha comprobado que una mayor concentración de metionina en los tejidos acelera su abscisión (Valdovinos & Muir, 1965; Chatterjee, 1977), lo que podría explicar la presencia de estos nodos en el genotipo CH-VI.

ASA1: La antranilato sintasa otro de los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-VI (ver tabla 4), se encarga de la biosíntesis de antranilato, un intermediario del triptófano. Este aminoácido funge como precursor de las auxinas, lo que indicaría que ASA1 estaría causando, indirectamente, un incremento de estas fitohormonas para detener el crecimiento de los tejidos (Cai & Lashbrook, 2008; Mao et al. 2016) además de iniciar la abscisión (Basu et al. 2013; Jin, 2015). De nuevo, se recomienda revisar la concentración de auxinas junto con la expresión de ASA1 en diferentes momentos de la abscisión para confirmar esta explicación.

LYSA1: La lisina sintasa 1 se expresa más en el genotipo susceptible a caída de ovario no fertilizado, su papel es el de sintetizar lisina, sin embargo, en lo que respecta al proceso de abscisión, este es solo un paso intermedio. Otra proteína, que no aparece como nodo en ninguna de las redes, pero cuyos datos también se obtuvieron (ver Anexo) es la Lisina cinasa reductasa (LKR) esta se expresa más en el genotipo CH-VI y se encarga del catabolismo de la lisina hacia el glutamato. Este aminoácido sirve como señalizador en tejidos afectados por estrés como las zonas de abscisión (Galili, 2002), además de que se ha visto que su concentración aumenta mientras este proceso avanza (Ghiasi et al. 1987).

SAM1: En el caso del genotipo CH-I algunos de los nodos también son parte del ciclo de biosíntesis de etileno (ciclo de Yang), por ejemplo, la S-adenosilmetionina sintasa 1 (SAM1). Siendo que el etileno funciona como un promotor de la abscisión la presencia de SAM1 en este genotipo sería extraña, sin embargo, en CH-I también hay una mayor expresión de S-adenosil-1-homocisteina hidrolasa 2 (SAHH2) (ver Anexo) esta enzima forma parte del ciclo de la metilmetionina, el cual funciona como regulador de la biosíntesis de etileno. SAHH2 sintetiza homocisteína a partir de la S-adenosil-L-homocisteína que, a su vez, es producto de la transformación de la S-adenosil-L-metionina (Lindermayr et al. 2006). Es decir, SAHH2 estaría utilizando indirectamente el producto de SAM1 para continuar el ciclo de la metilmetionina evitando que ACS inicie la síntesis de etileno. La expresión de SAM1 se explica

entonces con la necesidad de evitar la acumulación de metionina y no la de sintetizar etileno.

MGL: La metionina-gamma-liasa cataliza la degradación de metionina a alfacetobutirato, metanotiol y amoniaco. El metanotiol es parte de la ruta de metabolismo de azufre y se ha visto que su escasez puede llevar a abscisión, probablemente por la falta de aminoácidos que necesitan de él para ser sintetizados (Addicott, 1968). MGL estaría entonces, por un lado, evitando la acumulación de metionina y por otro permitiendo la absorción de azufre necesario para la síntesis de aminoácidos y continuación del crecimiento del fruto de *V. planifolia*. Además de que evitaría de forma indirecta la síntesis de etileno al usar la metionina.

SPDS1 y CPA: Los últimos dos nodos de esta red, Espermidina Sintasa (SPDS1) y N-carbamoil putrescina amidasa (CPA) se encargan de sintetizar las poliaminas espermidina (Wu et al. 2007) y putrescina (Piotrowski et al. 2003) respectivamente. Ambas poliaminas están relacionadas de forma negativa con la abscisión y se ha comprobado que al aumentar su concentración este proceso puede inhibirse (Aziz, et al. 2001; Aziz, 2003; Roussos et al. 2004), lo que explica su presencia en el genotipo CH-I.



Figura 12. Red metabólica de biosíntesis de etileno. Se muestran en rojo los genes mayormente expresados en el genotipo CH-VI [2.6.1.5 = TAT3 (Tirosina aminotransferasa 3); 2.1.1.14 = MS2 (Metionina sintasa 2); 1.13.11.54 y 1.13.11.53 = ARD (Acireductona dioxigenasa); 4.4.1.14 = ACS (1-amino—ciclopropano-1-caeboxilato sintasa); 1.14.17.4 = ACO (Amino-ciclopropano-carboxilato-oxidasa); 4.1.1.50 = SAMDC (S-adenosilmetionina-descarboxilasa) 5.3.1.23 = MTI (Metiltioribosa-1-fosfato-isomerasa)], y en verde los mayormente expresados en el genotipo CH-I [4.4.1.11 = MGL (Metionina-gamma-liasa); 2.6.1.- = VAS1 (Aminotransferasa aromática); 2.5.1.6 = SAM1 (S-adenosilmetionina sintasa 1); 3.1.3.77 y 4.2.1.109 = DEP1 (Complejo deshidratasa-enolasa-fosfatasa-1); 2.5.1.16 = SPDS1 (Espermidina sintasa 1); 2.7.1.100 = MTK (S-metil-5-tioribosa cinasa); 3.2.2.16 = MTAN2 (Metiltioedenosina-nucleosidasa-2)]. En el círculo azul se encuentra el etileno. Modificada de https://www.kegg.jp

Etileno exógeno

Para la ruta metabólica de etileno exógeno se obtuvo una red principal de 3 nodos, con solo uno expresado mayormente en el genotipo CH-I.



Figura 13. Red principal de interacción de proteínas para la ruta de etileno exógeno. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en verde y los más expresados en el CH-VI en rojo. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.

Tabla 5. Valores de razón de cambio (logFC) y valor P (significancia) de los nodos en la red de etileno exógeno.

Nombre	logFC	valor P		
EIN2	-16.2	8.78E-74		
CTR1	4	1.09E-72		
ETR/ERS2	-32.5	6.96E-73		

CTR1 es un regulador negativo de la señalización por etileno, se une a EIN2 y ERS2 (ambos nodos en esta red) y los bloquea en ausencia de etileno (Kieber et al. 1993;

Payton, 1996; Müller & Stummann, 2003; Ju et al. 2012). Es comprensible su presencia en el genotipo CH-I pues estas dos proteínas promueven la abscisión. Se ha establecido que al inhibir **EIN2**, un receptor de etileno, el proceso de corte del órgano floral se retrasa, lo que indica que, si bien está proteína no es esencial para que ocurra la abscisión, es muy importante para controlar el momento en que esta inicia (Bleecker & Patterson, 1997). **ERS2** es también un receptor de etileno (Hua & Meyerowitz, 1998) y su sobreexpresión causa un incremento en la expresión de genes relacionados con la degradación de pared celular (Li & Yuan, 2008).



Figura 14. Ruta de señalización por etileno exógeno. Se muestran los genes mayormente expresados en el genotipo CH-VI en rojo y los mayormente expresados en el genotipo CH-I en verde. Modificada de https://www.kegg.jp

Ruta de abscisión semi-independiente de etileno

La red de interacción de proteínas de la ruta semi-independiente de etileno contiene únicamente un nodo, con una expresión mayor en el genotipo CH-I.



Figura 15. Red principal de interacción de proteínas para la ruta independiente de etileno. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en verde y los más expresados en el CH-VI en rojo. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.

Tabla 6. Valores de razón de cambio (logFC) y valor P (significancia) de los nodos en la red de abscisión semi-independiete de etileno.

Nombre	logFC	valor P
FYF/AGL42	69.4	2.46E-75

AGL42 (FYF): Está proteína promueve la floración además de que retrasa la senescencia y la abscisión al reprimir la respuesta a etileno.

Lignina

Para la ruta metabólica de lignina se obtuvo una red con seis nodos, de los que sólo uno está mayormente expresado en el genotipo CH-VI.



Figura 16. Red principal de interacción de proteínas para la ruta metabólica de lignina. Los nodos mayormente expresados en el genotipo CH-I se muestran en verde y los más expresados en el CH-VI en rojo. El tamaño de la esfera indica la cantidad de proteínas con las que interactúa.

Tabla 7. Valores de razón de cambio (logFC) y valor P (significancia) de los nodos en la red de lignina.

Nombre	logFC	valor P
ALDH2C4	-36.2	2.94E-73
CYP73A5	253.2	1.06E-73
F5H/CYP84A1	17.8	1.78E-72
CYP98A3	96.5	6.00E-74

CCR1	135.9	3.29E-71
CYTB5-B	473.6	4.32E-73

ALDH2C4: La Aldehído deshidrogenasa 2C4 (ALDH2C4), esta enzima sintetiza ácido sinápico y ácido ferúlico a partir de Sinapaldehído y Coniferilaldehído respectivamente (Nair et al. 2004). Estos dos aldehídos son precursores de la lignina (Vanholme et al. 2010), lo que indica que ALDH2C4 estaría evitando la síntesis de este compuesto en el genotipo susceptible a caída de ovario no fertilizado.

Los demás nodos, excepto CYTB5-B, forman parte de la ruta de biosíntesis de lignina. La cinamato-4-hidroxilasa (CYP73A5 nodo en la red) es la primera en actuar al hidroxilar el trans-cinamato a 4-cumarato (Sewalt et al. 1997; Blee, 2001; Gou et al. 2018). Este compuesto después es transformado en ácido caféico a través de una citocromo P450 monooxigenasa (CYP450), después a ácido ferúlico por una ácido caféico 3-O-metiltransferasa (OMT1), y luego a ácido-5-hidroxiferulico por la ferulato-5-hidroxilasa (F5H o CYP84A1 nodo en la red) (Humphreys, et al. 1999; Gou et al. 2018). Por último, el ácido-5-hidroxiferúlico puede ser metabolizado en ácido sinápico usando OMT1. Cada uno de estos ácidos puede ser sustrato de la 4-cumarato-CoA-ligasa (4CCOAL) formando sus derivados unidos a CoA (Cafeoil-CoA, Feruloil-CoA, 5-Hidroxiferuloil-CoA y Sinapoil-CoA, respectivamente). Estos derivados también pueden formarse directamente si el 4-cumarato es metabolizado por la 4CCOAL en vez de la CYP450 formando cumaroil-CoA que después es convertido en ácido-p-cumárico a través de la shikimato-O-cinamoiltransferasa (SGT) y luego a ácido clorogénico por la CYP98A3 (nodo en la red) (Humphreys, & Chapple, 2002; Gou et al. 2018). El ácido clorogénico es metabolizado por la SGT para producir Cafeoil-CoA que después podrá derivar en los demás ácidos (Feruloil-CoA. 5-Hidroxiferuloil-CoA y Sinapoil-CoA) usando la cafeoil-CoA-Ometiltransferasa (CCOAMT). Estos compuestos serán convertidos a sus formas

aldehído por la Cinamoil-CoA reductasa (**CCR1**) (Lacombre et al. 1997). Finalmente, la lignina es sintetizada por medio de dos enzimas, la Cinamoil aldehído deshidrogenasa (CADH) que convierte los aldehídos en alcoholes y una peroxidasa (PO) (Vanholme et al. 2010), estas no aparecen como nodos en ninguna red, sin embargo, están mayormente expresadas en el genotipo CH-I (ver Anexo).

CYTB5-B: esta proteína funciona como transportador de electrones para varias oxigenasas, y participa en la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) (Kumar et al. 2012). Los VLCFA forman parte de la cera cuticular que recubre las partes aéreas de las plantas (Lee & Suh, 2013), por lo que su presencia en el genotipo CH-I podría ser debido a la formación de esta cera para proteger los tejidos del fruto y zona de unión de *V. planifolia*. Además, se ha visto que CYTB5-B y sus isoformas (-C, -D y -E) pueden interactuar con la proteína Reversión a sensibilidad a etileno 1 (ETR1) para inhibir la respuesta a este compuesto (Chang et al. 2013) lo que podría evitar la creación de una zona de abscisión. Por último, es importante mencionar que la isoforma -D de CYTB5-B funciona como transportador de electrones para la biosíntesis de siringil-lignina (Gou, et al. 2019), por tanto, debería revisarse si CYTB5-B tiene esa misma función en *V. planifolia*.



Figura 17. Red metabólica de biosíntesis de fenilpropanoides. Se muestran en rojo los genes mayormente expresados en el genotipo CH-VI [**3.2.1.21** = BGLU (β -glucosidasa); **4.3.1.24** = PAL (Fenilalanina-amonio-liasa); **23.1.133** = HCT (Shikimato-O-hidroxicinamoil-transferasa); **3.1.1.-** = CSE (Cafeoil-shikimato-esterasa); **2.1.1.68** = OMT1 (O-metiltransferasa-1); **2.1.1.104** = CCAMT (Cafeoil-CoA-O-metiltransferasa); **1.2.1.68** = ALDH2C4 (Aldehído-deshidrogenasa 2C4); **2.4.1.120** = UGT84A2 (Ácido sinápico-1-glucosiltransferasa)], y en verde los mayormente expresados en el genotipo CH-I [**6.2.1.12** = 4CL1 (4-cumarato-CoA-ligasa); **1.2.1.44** = CCR1 (Cinamoil-CoA-reductasa-1); **1.14.14.91** = C4H (Cinamato-4-hidroxilasa); **1.1.1.195** = CADH (Cinamoil-alcohol-deshidrogenasa); **1.11.1.7** = PO (Peroxidasa); **1.14.14.96** = CYP98A3 (5-O-(4-cumaroil)-D-quinato 3'-monooxigenasa); **F5H** (Ácido ferúlico-5-hidroxilasa-1)]. Modificada de https://www.kegg.jp Existe una clara diferencia entre el genotipo CH-I y el CH-VI en las siete rutas metabólicas analizadas. El metabolismo de la celulosa va del anabolismo en el genotipo CH-I al catabolismo en el CH-VI, lo que revela que en el genotipo resistente a la caída prematura del ovario no fertilizado la celulosa (el principal componente de la pared celular) se conserva, permitiendo que existan zonas de unión ovario raquis más resistentes a aquellas que existen en el genotipo CH-VI. En el caso de este genotipo la endoglucanasa, enzima encargada de degradar la celulosa, está expresada 117.6 veces más en el genotipo CH-I (ver tabla 8).

Respecto del proceso de abscisión mismo, los genes AGD5 (Nevershed) y SOBIR1 (Evershed) están mayormente expresados en el genotipo susceptible, dichos genes están asociados al inicio y localización de la abscisión lo que indica que esta ocurre con mayor medida en el genotipo CH-VI, llevando a la caída prematura de ovario no fertilizado.

Como se ha mencionado, el etileno es uno de los principales señalizadores de abscisión en las plantas, su presencia conduce a este proceso y es en el genotipo CH-VI que la biosíntesis de etileno ocurre en mayor medida además de que los genes asociados a la señalización por etileno exógeno también están más expresados en este genotipo. Mientras que en el genotipo CH-I el inhibidor de receptores de etileno exógeno está más expresado que en el CH-VI. Es, por tanto, que se puede decir con seguridad que los efectos del etileno afectan más al genotipo CH-VI haciéndolo susceptible a la caída de ovario no fertilizado. Existe también una ruta de abscisión semi-independiente de etileno, ello podría llevar a pensar que la abscisión podría promoverse en le genotipo CH-I a través de ella, sin embargo, al analizarla se encontró que el gen encargado de inhibir la respuesta a etileno se encuentra más expresado en este genotipo causando un retraso en el proceso de abscisión.

Por último, los genes involucrados con la biosíntesis de lignina están todos más expresados en el genotipo CH-I y el encargado de devolver los productos generados en esta ruta metabólica a sus precursores se expresa en mayor medida en el

genotipo CH-VI, con esto se infiere que el genotipo resistente presenta una mayor lignificación lo que provee resistencia a la zona de unión ovario-raquis y por tanto al proceso de caída prematura de ovario no fertilizado.

Estas diferencias nos permiten no sólo identificar los procesos que ocurren a nivel genético que pueden causar la susceptibilidad o resistencia a la caída prematura de ovario no fertilizado, sino que nos hacen reconocer exactamente cuáles genes son de gran importancia para el proceso. Además, el análisis de redes de interacción de proteínas nos permite identificar cuáles genes están relacionados con ellos, lo que da nueva luz al problema de caída prematura de ovario no fertilizado y permite proponer nuevos estudios que puedan llevar a su resolución.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias en la expresión de genes relacionados a caída de ovario no fertilizado entre los dos genotipos analizados.

Para la ruta metabólica de síntesis y degradación de celulosa se encontró que en el genotipo CH-VI ocurre una mayor degradación de almidón y se evita la salida de la celulosa sintasa del citoplasma de las células. Mientras que en el genotipo CH-I hay degradación y generación de almidón, lo que puede estar relacionado a la fotosíntesis.

En la ruta metabólica de degradación de pared celular los hallazgos indican que los organismos pertenecientes al genotipo CH-I continúan de manera normal su crecimiento mientras que en el genotipo CH-VI hay una mayor actividad de degradación de pared celular.

Dentro de la ruta basal de abscisión, en el genotipo CH-VI se expresan mayormente genes encargados de promover la caída del ovario mientras que en el genotipo CH-

41

I los genes que más se expresan están relacionados con la prevención de este proceso.

En la ruta metabólica de etileno endógeno se confirmó la existencia de mayor biosíntesis de este compuesto en el genotipo CH-VI mientras que en el CH-I se observó una mayor actividad del ciclo de la metilmetionina, metabolismo de azufre y biosíntesis de poliaminas.

Para la ruta metabólica de etileno exógeno se encontró que hay una mayor expresión de receptores de etileno en el genotipo CH-VI y que en el CH-I un represor de estos receptores se expresa en mayor medida.

Dentro de la ruta de abscisión independiente de etileno, se observó que en el genotipo CH-I se expresa un promotor de floración que además retrasa la senescencia.

En la ruta metabólica de lignina se confirmó que en el genotipo CH-I ocurre la biosíntesis de lignina como refuerzo de la zona de unión ovario-raquis, mientras que en el genotipo CH-VI los precursores de este compuesto son reciclados.

Estas diferencias de expresión permiten afirmar que el genotipo CH-VI presenta mayor susceptibilidad a la caída de ovario no fertilizado, lo que corresponde con las observaciones hechas en campo.

A partir del análisis de las redes obtenidas en este trabajo, se identificaron los siguientes genes presentes los nodos principales para cada ruta metabólica: AMY3, EGN, AGL18, KNAT1, SAM1, SAMDC1, EIN2, ERS2, ALDH2C4.

PERSPECTIVAS

Comprobar de forma experimental la expresión en ambos genotipos, de los genes sugeridos como de mayor importancia en el fenómeno de caída de ovario no fertilizado. Así mismo, se sugiere comprobar la hipótesis del efecto de la concentración de auxinas asociada a la expresión de RUB1 en el metabolismo de celulosa.

Comprobar si la diferencia en la disponibilidad de azufre entre los dos genotipos es significativa para determinar su resistencia al proceso de abscisión.

REFERENCIAS

- Adamczyk, B. J., Lethi-Shiu, M. D., & Fernandez, D. E. (2007). The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in Arabidopsis. *The Plant Journal: for cell and molecular biology.*, *50*(6), 1007-1019.
- Addicot, F. T. (1982). Abscission. California: University of California Press.
- Addicott, F. T. (1968). Environmental Factors in the Physiology of Abscission. *Plant physiology*, *43*(9), 1471-1479.
- Alonso, J. R. (2011). Manual de histología vegetal. Madrid: Paraninfo.
- Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J. (2007). Regulation of Ethylene Biosynthesis. *Journal of plant growth regulation, 26*, 92-105.
- Ashraf, M., Akram, N. A., Arteca, R. N., & Foolad, M. R. (2010). The Physiological, Biochemical and Molecular Roles of Brassinosteroids and Salicylic Acid in Plant Processes and Salt Tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences,* 29(3), 162-169.
- Aziz, A. (2003). Spermidine and related-metabolic inhibitors modulate sugar and amino acid levels in Vitis vinifera L.: possible relationships with initial fruitlet abscission. *Journal of Experimental Botany*, *54*(381), 355-363.

- Aziz, A., Brun, O., & Audran, J.-C. (2001). Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (Vitis vinifera). *Physiologia plantarum*, *113*(1), 50-58.
- Basu, M. M., González-Carranza, Z. H., Azam-Ali, S., Tang, S., Ali Shahid, A., & Roberts, J. A. (2013). The Manipulation of Auxin in the Abscission Zone Cells of Arabidopsis Flowers Reveals That Indoleacetic Acid Signaling Is a Prerequisite for Organ Shedding. *Plant Physiology*, *162*(1), 96-106.
- Beyer, E. M., & Morgan, P. W. (1971). Abscission. The Role of Ethylene Modification of Auxin Transport. *Plant physiology, 48*, 208-212.
- Blee, K., Choi, J. W., O'Connel, A. P., Jupe, S. C., Schuch, W., Lewis, N. G., & Bolwell, G. P. (2001). Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochemistry*, *57*(7), 1159-1166.
- Bleecker, A. B., & Patterson, S. E. (1997). Last Exit: Senescence, Abscission, and Meristem Arrest in Arabidopsis. *The Plant Cell, 9*, 1169-1179.
- Bornman, C. H., Addicott, F. T., & Spurr, A. R. (1966). Auxin and gibberellin effects on cell growth and starch during abscission in cotton. *Plant physiology, 41*, 871-876.
- Brown, K. M. (2006). Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum, 100*(3), 567-576.
- Bürstenbinder, K., Rzewuski, G., Wirtz, M., Hell, R., & Sauter, M. (2006). The role of methionine recycling for ethylene synthesis in Arabidopsis. *The plant journal*, 49(2), 238-249.
- Cai, S., & Lashbrook, C. C. (2008). Stamen Abscission Zone Transcriptome Profiling Reveals New Candidates for Abscission Control: Enhanced Retention of Floral Organs in Transgenic Plants Overexpressing Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN2. *Plant physiology, 146*(3), 1305-1321.

- Chang, J., Clay, J. M., & Chang, C. (2013). Association of cytochrome b5 with ETR1 ethylene receptor signaling through RTE1 in Arabidopsis. *The plant journal,* 77(4), 558-567.
- Chatterjee, S. (1977). Studies on the abscission of flowers and fruits of cotton (Gossypium barbadense L.). *Biologia Plantarum, 19*, 81-87.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (21 de Septiembre de 2019). Vainilla. Obtenido de https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/vainilla.html

Dashek, W. V. (2010). Plant Cell Biology. EUA: CRC Press.

- del Pozo, J. C., & Estelle, M. (1999). The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96*(26), 15342-15347.
- del Pozo, J. C., Dharmasiri, S., Hellmann, H., Walker, L., Gray, W. M., & Estelle, M. (2002). AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell, 14*(2), 421-423.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin. *Nature, 435*(7041), 441-445.
- Estornell, L. H., Agustí, J., Merelo, P., Talón, M., & Tadeo, F. R. (2013). Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Science, 199-200*, 48-60.
- Fang, S. C., & Fernandez, D. E. (2002). Effect of regulated overexpression of the MADS domain factor AGL15 on flower senescence and fruit maturation. *Plant Physiology*, 130(1), 78-89.
- Folador, E. L., Tiwari, S., Da Paz Barboza, C. E., Jamal, S. B., Da Costa Schulze,
 M., Barh, D., & Azevedo, V. (2018). Protein-Protein Interactions: An
 Overview. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, *2*, 821-833.

- Fujimoto, M., Suda, Y., Vernhettes, S., Nakano, A., & Ueda, T. (2014). Phosphatidylinositol 3-kinase and 4-kinase have distinct roles in intracellular trafficking of cellulose synthase complex in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 56(2), 287-298.
- Galili, G. (2002). New insights into the regulation and functional significance of lysine metabolism in plants. *Annual review of plant biology*, *53*, 27-43.
- Ge, C., Cui, X., Wang, Y., Hu, Y., Fu, Z., Zhang, D., . . . Li, J. (2006). BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development. *Cell Research*, *16*(5), 446-456.
- Ghiasi, H., Paech, C., & Dybing, C. D. (1987). Free amino Acid content and metabolic activities of setting and aborting soybean ovaries. *Plant physiology*, *85*(1), 91-95.
- González-Carranza, Z. H., Lozoya-Gloria, E., & Roberts, J. A. (1998). Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. *Trends in Plant Science, 3*(1), 10-14.
- Gou, M., Ran, X., Martin, D. W., & Liu, C.-J. (2018). The scaffold proteins of lignin biosynthetic cytochrome P450 enzymes. *Nature plants, 4*(5), 299-310.
- Gou, M., Yang, X., Zhao, Y., Xiuzhi, R., Song, Y., & Liu, C.-J. (2019). Cytochrome b5 Is an Obligate Electron Shuttle Protein for Syringyl Lignin Biosynthesis in Arabidopsis. *The plant cell, 31*, 1344-1366.
- Granados-Hernández, C. V. (2019). Análisis y validación de genes involucrados en el proceso de abscisión prematura del fruto de Vanilla planifolia G. Jacks (Orchidaceae). (Tesis de Maestría) UNAM, México.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature, 414*(6861), 271-276.

- Gubert, C. M., & Liljegren, S. J. (2014). HAESA and HAESA-LIKE2 activate organ abscission downstream of NEVERSHED and EVERSHED in Arabidopsis flowers. *Plant Signaling and Behavior, 9*(7).
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M., & del Pozo, J. C. (2002). G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology, 5*(6), 480-486.
- He, J. X., Gendron, J. M., Gampala, S. S., Gendron, N., Sun, C., & Wang, Z. Y. (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, *307*(5715), 1634-1638.
- He, J. X., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J., & Wang, Z. Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the Naational Academy of Sciences of the United States of America, 99*(15), 10185-10190.
- Hernandez, R. A. (2013). La vía ubiquitina-proteasoma ¿destruir o construir? ese es el dilema. *Revista habanera de Ciencias Médicas, 12*(1), 22-34.
- Hernández Hernández, J. (2014). Beneficiado artesanal de vainilla en México. En C. Araya Fernández, R. Cordero Solórzano, A. Paniagua Vásquez, & J. B. Azofeifa Bolaños (Ed.), Seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, extensión y producción de vainilla en Mesoamérica. (págs. 133-141). Costa Rica: INSEFOR/UNA.
- Hua, J., & Meyerowitz, E. M. (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. *Cell, 94*(2), 261-271.
- Huang, H. Y., Jiang, W. B., Hu, Y. W., Wu, P., Zhu, J. Y., Liang, W. Q., . . . Lin, W.
 H. (2013). BR signal influences Arabidopsis ovule and seed number through regulating related genes expression by BZR1. *Molecular Plant, 6*(2), 456-469.

- Humphreys, J. M., & Chapple, C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current* opinion in plant biology, 5(3), 224-229.
- Humphreys, J. M., Hemm, M. R., & Chapple, C. (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96*(18), 10045-10050.
- Jin, X. (2015). *The Role of Auxin in Abscission of Organs and Tissues.* Tesis doctoral. Umeå: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., . . . Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19486-19491.
- Kai, Y., Chao-Chuang, L., Yu, W., Xiao-Quan, W., Zhi-Min, W., Da-Yong, W., . . . Qing-Lin, T. (2018). AGL18-1 delays flowering time through affecting expression of flowering-related genes in Brassica juncea. *Plant Biotechnology*, 357-363.
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., & Ecker, J. R. (1993).
 CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 72(3), 427-441.
- Kumar, R., Tran , L. S., Neelakadan, A. K., & Nguyen, H. T. (2012). Higher plant cytochrome b5 polypeptides modulate fatty acid desaturation. *PLos One*, 7(2), e31370.
- Lacombre, E., Hawkins, S., Doorsselaere, J. V., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., . . . Grima-Pettenati, J. (1997). Cinnamoyl CoA reductase,

the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *The plant journal, 11*(3), 429-441.

- Lee, S. B., & Suh, C. M. (2013). Recent Advances in Cuticular Wax Biosynthesis and Its Regulation in Arabidopsis. *Molecular plant, 6*(2), 246-249.
- Leslie, M. E., Lewis, M. W., Youn, J. Y., Daniels, M. J., & Liljegren, S. J. (2010). The EVERSHED receptor-like kinase modulates floral organ shedding in Arabidopsis. *Development, 137*(3), 467-476.
- Li, J., & Nam, K. H. (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science*, *295*(5558), 1299-1301.
- Li, J., & Yuan, R. (2008). NAA and Ethylene Regulate Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Perception, and Cell Wall Degradation During Fruit Abscission and Ripening in 'Delicious' Apples. *Journal of Plant Growth Regulation, 27*(283).
- Liljegren, S. J., Leslie, M. E., Darnielle, L., Lewis, M. W., Taylor, S. M., Luo, R., . . . Ecker, J. R. (2009). Regulation of membrane trafficking and organ separation by the NEVERSHED ARF-GAP protein. *Development, 136*(11), 1909-1918.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., & Hake, S. (1994). A knotted1like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *The Plant Cell, 6*(12), 1859-1876.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Bahnweg, G., & Durner, J. (2006). Differential Inhibition of Arabidopsis Methionine Adenosyltransferases by Protein S-Nitrosylation. *The journal of biological chemestry*, 281(7), 4285-4291.
- Liu, B., Butenko, M. A., Shi, C. L., Bolivar, J. L., Winge, P., Stenvik, G. E., . . . Aalen,
 R. B. (2013). NEVERSHED and INFLORESCENCE DEFICIENT IN
 ABSCISSION are differentially required for cell expansion and cell separation

during floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany, 64*(17), 5345-5357.

- Lloyd, F. E. (1916). Abscission in Miriabilis jalapa. Botanical Gazette, 61, 213-230.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández Hernández, J., Kim, S.-C., & Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (Vanilla planifolia Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, *6*2(2), 127-138.
- Malinova, I., Mahlow, S., Alseekh, S., Orawetz, T., Fernie, A. R., Baumann, O., ... Fettke, J. (2014). Double Knockout Mutants of Arabidopsis Grown under Normal Conditions Reveal that the Plastidial Phosphorylase Isozyme Participates in Transitory Starch Metabolism. *Plant Physiology*, *164*(2), 907-921.
- Mao, J.-L., Miao, Z.-Q., Wang, Z., Yu, L.-H., Cai, X.-T., & Xiang, C.-B. (2016). Arabidopsis ERF1 Mediates Cross-Talk between Ethylene and Auxin Biosynthesis during Primary Root Elongation by Regulating ASA1 Expression. *PLoS genetics*, *12*(1), e1005760.
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Riov, J., Tucker, M. L., Patterson, S. E., & Roberts, J. A. (2019). Re-evaluation of the ethylene-dependent and -independent pathways in the regulation of floral and organ abscission. *Journal of experimental botany*, *70*(5), 1461-1467.
- Müeller, R., & Stummann, B. M. (2003). Genetic regulation of ethylene perception and signal transduction related to flower senescence. *Food, Agriculture & Environment, 1*(1), 87-94.
- Nair, R. B., Bastress, K. L., Ruegger, M. O., Denault, J. W., & Chapple, C. (2004). The Arabidopsis thaliana REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 Gene Encodes an Aldehyde Dehydrogenase Involved in Ferulic Acid and Sinapic Acid Biosynthesis. *The plant cell, 16*, 544-554.

- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Yuan, H., . . . Tax, F.
 E. (1999). Brassinosteroid-Insensitive Dwarf Mutants of Arabidopsis Accumulate Brassinosteroids. *Plant Physiology*, *121*(3), 743-752.
- Pabst, G. (1890). Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte Band 2. Berlin: Köhler.
- Patterson, S. E. (2001). Cutting Loose. Abscission and Dehiscence in Arabidopsis. *Plant physiology, 126*, 494-500.
- Patterson, S. E., & Bleecker, A. B. (2004). Ethylene-Dependent and -Independent Processes Associated with Floral Organ Abscission in Arabidopsis. *Plant physiology*, *134*, 194-203.
- Payton, S., Fray, R. G., Brown, S., & Gierson, D. (1996). Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Molecular Biology*, 31(6), 1227-1231.
- Peng, Y., Chen, L., Li, S., Zhang, Y., Xu, R., Liu, Z., ... Li, Y. (2018). BRI1 and BAK1 interact with G proteins and regulate sugar-responsive growth and development in Arabidopsis. *Nature communications, 9*(1522).
- Piotrowski, M., Janowitz, T., & Kneifel, H. (2003). Plant C-N hydrolases and the identification of a plant N-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *The journal of biological chemestry, 278*(3), 1708-1712.
- Poapst, P. A., WARD, G. M., & Phillips, W. R. (1959). Maturation of McIntosh Apples in Relation to Starch Loss and Abscission. *Canadian Journal of Plant Science*, *39*(3), 257-263.
- Pozo, J. C., Timpete, C., Tan, S., Callis, J., & Estelle, M. (1998). The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. *Science, 280*(5370), 1760-1763.

- Ravanel, S., Block, M. A., Rippert, M. A., Jabrin, S., Curien, G., Rébeillé, F., & Douce, R. (2004). Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import Sadenosylmethionine from the cytosol. *The journal of biological chemestry*, 279(21), 22548-22557.
- Roussos, P., Pontikis, C. A., & Zoti, M. A. (2004). The role of free polyamines in the alternate-bearing of pistachio (Pistacia vera cv. Pontikis). *Trees, 18*, 61-69.
- Roy, S., Manners, H. N., Elmsallati, A., & Kalita, J. K. (2019). Alignment of Protein-Protein Interaction Networks. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 1, 997-1015.
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-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*, 875-877.
- Salazar-Rojas, V. M., Sandoval-Zapotitla, E., Granados-Hernández, C. V., Cruz-Ruiz, Y., Herrera-Cabrera, B. E., & Campos-Contreras, J. E. (2016).
 Descripción estructural y funcional de caída prematura de frutos de Vanilla planifolia Jacks. ex Andrew. *Agroproductividad, 9*(11-B), 17-18.
- Schomburg, D., Schomburg, I., & Chang, A. (2007). *Handbook of enzymes.* Germany: Springer.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). Vainilla Mexicana. En *Planeación Agrícola Nacional* 2017-2030. México: SAGARPA.
- Seung, D., Thalmann, M., Sparla, F., Hachem, M. A., Lee, S. K., Issakidis-Bourguet, E., . . . Santelia, D. (2013). Arabidopsis thaliana AMY3 Is a Unique Redox-

regulated Chloroplastic α-Amylase. *Journal of Bilogical Chemistry*, 288(47), 33620-33633.

- Sewalt, V., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., . . . Dixon, R. A. (1997). Reduced Lignin Content and Altered Lignin Composition in Transgenic Tobacco Down-Regulated in Expression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase or Cinnamate 4-Hydroxylase. *Biochemistry and enzymology*, 115, 41-50.
- Sexton, R., & Roberts, J. A. (1982). Cell biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 133-162.
- Shelly, C. L. (2000). S-Adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(4), 391-395.
- Shi, C.-L., Stenvik, G.-E., Vie, K. A., Bones, A. M., Pautot, V., Proveniers, M., & Butenko, M. A. (2011). Arabidopsis Class I KNOTTED-Like Homeobox Proteins Act Downstream in the IDA-HAE/HSL2 Floral Abscission Signaling Pathway. *The Plant Cell*, 23(7), 2553-2567.
- Snider, J., Kotlyar, M., Saraon, P., Yao, Z., Jurisica, I., & Stagljar, I. (2015). Fundamentals of protein interaction network mapping. *Molecular Systems Biology*, *11*(12), 848.
- Soto Arenas, M. A. (2006). La vainilla retos y perspectivas de su cultivo. *Biodiversitas, 6*(66), 1-9.
- Sreeramulu, S., Mostizky, Y., Sunitha, S., Shani, E., Nahum, H., Salomon, D., . . . Sessa, G. (2013). BSKs are partially redundant positive regulators of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 74(6), 905-919.
- Streb, S., & Zeeman, S. C. (2012). Starch Metabolism in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book, 2012*(10).

- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Capas, J., . . . von Meering, C. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research, 47*, D607-D613.
- Tang, W., Kim, T. W., Oses-Prieto, J. A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., . . . Wang, Z. Y. (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science*, *321*(5888), 557-560.
- Tripathi, S. K., Sane, A. P., Nath, P., & Tuteja, N. (2008). Organ abscission in plants: Understandig the process through transgenic approaches. En M. Rivera-Domínguez, R. Troncoso-Rojas, & M. E. Tiznado-Hernández, A transgenic approach in plant biochemistry and physiology (págs. 155-180). Kerala, India: Research SignPost.
- Valdovinos, J. G., & Muir, R. M. (1965). Effects of D and L Amino Acids on Foliar Abscission'. *Plant Physiology, 40*(2), 335-340.
- van Doorn, W. G. (2002). Effect of Ethylene on Flower Abscission: a Survey. *Annals of Botany, 89*(6), 689-693.
- van Doorn, W. G., & Stead, A. D. (1997). Abscission of flowers and the florarl parts. Journal of Experimental Botany, 48(309), 821-837.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant physiology*, *153*(3), 895-905.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J. (2001). BRI1 Is a Critical Component of a Plasma-Membrane Receptor for Plant Steroids. *Nature*, 410(6826), 380-383.
- Wu, H., Min, J., Ikeguchi, Y., Zeng, H., Dong, A., Loppnau, P., . . . Plotnikov, A. N. (2007). Structure and Mechanism of Spermidine Synthases. *Biochemestry*, *46*(28), 8331-8339.

- Xia, J., Benner, M. J., & Hancock, R. E. (2014). NetworkAnalyst integrative approaches for protein–protein interaction network analysis and visual exploration. *Nucleic Acids Research, 42*(W1), W167-W174.
- Xia, J., Gill, E. E., & Hancock, R. E. (2015). NetworkAnalyst for statistical, visual and network-based meta-analysis of gene expression data. *Nature Protocols*, 823-844.
- Yang, G., Xiao, L., & Lamboni, L. (2018). *Bioinspired Materials Science and Engineering*. EUA: Wiley & Sons.
- Zamudio-Arooyo, J. M., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escobar, J. R. (2012). La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 15*(2), 131-141.
- Zhou, G., Soufan, O., Ewald, J., Hancoock, R. E., Basu, N., & Xia, J. (2019). NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Research, 47*(W1), W234-W241.
- Zhu, H., Dardick, C. D., Beers, E. P., Callanhan, A. M., Xia, R., & Yuan, R. (2011). Transcriptomics of shading-induced and NAA-induced abscission in apple (Malus domestica) reveals a shared pathway involving reduced photosynthesis, alterations in carbohydrate transport and signaling and hormone crosstalk. *BMC Plant Biology*, *11*(138).

ANEXO

En la tabla 1 se encuentran los datos de expresión diferencial de los 276 genes analizados, en rojo pueden verse aquellos mayormente expresados en el genotipo CH-VI y en verde en el genotipo CH-I. Entre más se aleja el valor de cero mayor es la diferencia en la expresión.

Tair	Name	Valor p	Razón de expresión	AT5G52210 AT4G30510	ATARLB1 ATATG18	0.11 0.024	1.3 1.7
CELLIOSA			unerencial	ATECE6240		0.024	1.4
AT1G69830	ΔΜΥЗ	0.86	1 1	AT1C05180		0.054	-1.4
AT1G31340	RUB1	0.33	1.1	AT1003180		0.42	_1 2
AT2G46500	PI4KG4	0.55	1 1	AT2G02500		0.42	-1.2
AT4G05050		0.00	1.1	AT3G13550		0.54	-1.2
A14005050	ODQII	+00	1.2	AT2G04030		0.13	1.3
AT3G46970	PHS2	0.11	-1.3	AT4G02570		0.000	-1.5
AT3G29320	PHS1/GP	0.058	-1.4	AT1G05070		0.78	1.1
	P			ATEC10180		0.75	1 1
AT1G32900	GBSS1	6.00E	-3.8	AT5G19180		0.75	1.1
		-19		AT3G04240		0.97	1.1
AT3G01180	SS2	0.59	-1.2	AT5000550		0.95	1.1
AT4G18240	SS3	0.16	-1.5	AT5G53460		0.53	-1.1
AT4G11980	AAPSD	0.000 04	-1.8	A15G04140	GLUI	0.000	-2.3
AT2G36390	AGBE	0.38	-1.1	AT4G16660	HSP70	0.9	-1.1
AT2G32290	BA	1	1	AT5G52640	HSP81.1	3.10E	1.3
AT3G57270	BGU44	1	1	472007770		-07	1 /
AT5G09870	CS sb5	0.024	1.3	A13G0///0	HSP89.1 (HSP00-	0.12	1.4
AT1G22880	EGN	0.00E	117.6		6)		
AT1603310	142	0.86	1 2	AT3G27360	HTR2	0.62	-1.3
AT1603310	55/	0.00	-1.2	AT5G13530	KEG	0.4	-1.3
AT1011720		0.001	1.3	AT5G55130	MOCS3	0.000	-2.3
A13003230	т	0.000	1.5	474077760	NU 4 4	/9	7.0
AT1G76130	AMY2	1	1	A11G///60	NIA1	1.60E -07	7.6
AT2G19570	CDA1	0.12	1.2	AT2G40030	NRPE1	0.95	-2.3
AT3G05420	ACBP4	0.98	1	AT3G17970	OEP64	0.15	-1.3
AT5G27630	ACBP5	0.63	-1.8	AT5G09420	OM64	0.59	1.3
AT1G36160	ACC1	0.65	-1.1	AT2G39800	P5SC1	1.20E	-2.3
AT3G06650	ACLB-1	0.62	1.1			-08	

Tabla 8. Expresión diferencial de los genes analizados

AT1G49340	PI4KA1	0.94	-1.1	AT5G50870	UBC27	0.000	1.6
AT5G44740	POLH	1	-1			021	
AT5G02310	PRT6	1	-1	AT5G41700	UBC8	4.20E	1.8
AT5G15400	PUB1	0.27	-1.3			-29	
AT1G74260	PUR4	0.46	-1.3	AT3G20630	UBP14	0.4	1.3
AT3G54470	PYRE-F	0.59	1.2	AT4G17895	UBP20	1	1./
AT1G18080	RACK1A	0.57	1.1	AT1G51710	UBP6	0.14	-1.2
AT1G79650	RAD23B	0.33	1.2	AT2G21270	UFD1	0.002	-1.4
AT5G38470	RAD23D	0.86	1	AT4C29600		1	1 1
AT4G36800	RCE1	0.42	-1	AT4G38600		0.85	-1.1
AT3G48430	REF6	1	-1.1	AT4G12370		0.95	1.2
AT4G36130	RPL8C	0.39	-1	A14034390	ALGZ	0.54	-1.2
AT4G38630	RPN10	0.13	1.3		א הב		
AT5G47320	RPS19	1	1.8	PARED			
AT2G47110	RPS27AB	0.00E	1.5	AT4G39400	BR1	0.1	-2.1
		+00		AT1G75080	BZR1/2	0.37	1.1
AT3G57870	SCE1	0.083	1.1		(protein		
AT5G09600	SDH3_1	0.71	-1		BZR1		
AT4G32210	SDH3-2	0.000	1.4		homolog		
AT4G11260	SGT1B	2.00E	1.8	AT/C19710		0 0	1
		-08		A14018/10	7	0.8	1
AT4G24190	SHD	0.79	-1	AT4G00710	BSK	0.91	-1
AT4G22753	SMO1-3	0.11	1.6	AT5G42750	BK11	1	-2.4
AT1G09020	SNF4	0.6	-1.2		(BRI1		
AT5G55160	SUMO2	7.30E	1.4		kinase		
		-09			inhibitor		
AT1G32750	TAF1	0.38	-1.2		1)		
AT3G17880	TDX	0.33	-1.2	AT5G67260	CYCD3	0.88	-1.4
AT4G34570	THY2	1	1		(cyclin-		
AT3G04710	TPR10	0.51	1.3	ATECE7560	US-2) VTU2	1 00E	20
AT3G18730	TSK	1	-1.3	A13037300	ATTIS	1.00L -10	2.0
AT3G14950	TTL2	0.54	1.2	AT4G26080	ABI1	0.028	1.7
AT2G30110	UBA1	0.32	-1.2	AT5G62000	ARF2	0.012	-1.3
AT5G06460	UBA2	0.58	-1.1	AT1G70490	ARF2-A	0.34	1
AT2G02760	UBC2	0.007	-1.1	AT5G20730	ARF7	0.43	1.1
AT4050400		9		AT3G61415	ASK21	0.68	-1.1
A11G50490	OBC20	0.8	1.1	AT1G71030	AtDBP1	0.024	-1.4

AT2G25620	ATMYBL2	0.2	-1.1	AT5G20350	PAT24	0.73	-1.1
AT4G33430	BAK1	0.069	1.3	AT1G07630	PLL5	0.000	-5.3
AT1G55610	BRL1	0.15	1.3			0057	
AT4G35230	BSK1	0.75	1.1	AT2G46920	POL	1	1.2
AT4G03080	BSL1	0.8	-1.1	AT1G59830	PP2A1	0.26	1.2
AT2G27210	BSL3	0.21	-1.2	AT1G10430	PP2A2	0.61	-1.1
AT3G11130	CHC1	0.16	-1.2	AT3G25800	PP2AA2	0.06	1.2
AT5G50375	CPI1	0.15	1.4	AT5G63870	PP7	0.28	-1.3
AT2G04030	CR88	0.017	1.4	AT2G25070	PPC4-2	0.000	-1.2
AT1G08450	CRT3	1	-1			028	
AT4G34160	CYCD3-1	0.45	-1.2	AT3G02750	PPC6-1	0.98	-1
AT4G03270	CYCD6-1	1	-1.3	AT1G03590	PPC6-6	0.017	1.8
AT1G53720	CYP59	0.09	1.5	AT2G28890	PLL4	4.40E -09	-3.2
A11G14920	GAI	2.20E	-2.7	AT5G55260	PPX2	0.23	1.3
AT4G34460	GB1	0.85	1 1	AT1G08700	PS1	0.8	1.1
AT2G41880	GK-1	0.000	1.5	AT2G29900	PS2	0.85	1.3
		78		AT1G09630	RABA2A	0.000	-1.2
AT1G22300	GRF10	2.90E	1.8	AT5G47320	RPS19	1	1.9
ATEC65420	CDEQ	-19	1 1	AT4G24190	SHD	1	1
AT3G03430		0.33	-1.1	AT2G46280	TIF3I1	0.83	-1
AT4G17400		0.30	1 2	AT2G39840	TOPP4	0.017	1.3
AT1G18260		0.35	1.2	AT1G15750	TPL	0.028	-1.4
AT1G10200	Ηςεδ1	0.045	1.5	AT5G58220	TTL	0.39	1.1
AT5G52640		2 20F	1.1	AT4G26510	UKL4	0.19	-1.3
A13032040	1151 01.1	-10	1.5	AT3G53900	UPP	0.53	1.1
AT3G07770	HSP89.1	0.019	1.4	AT4G31750	WIN2	0.74	1
	(HSP90-			AT1G63700	YDA	1	-1.2
AT5G56010	0) HSP90-3	0 00F	27	BACAL			
A19690010	1151 50 5	+00	2.7	BASAL			
AT5G19280	КАРР	0.000	-1.9	AT5G13790	AGL 15	0.000 028	-1.6
AT3G21220	MKK5	0.000	-1.4	AT3G57390	AGL18	3.10E	3.1
		1		AT2G31880	EVR/SOBI	0.91	1.3
AT5G35080	OS9	0.49	-1.1		R1	0.01	2.0
AT2G42810	PAPP5	0.34	-1.2	AT5G54310	NEV/AGD	0.003	1.5
AT1G22280	PAPPDC2	0.42	-1.2		5	7	

AT4G08150	KNAT1	3.00E -10	-2	AT2G24850	TAT	0.000 16	3.5
AT1G70510	KNAT2	0.001	-1.6	AT3G03780	MS2	0.074	1.1
		5		AT5G05730	ASA1	0.81	1.1
AT2G41370	BOP2	1	-1	AT3G14390	LYSA1	0.9	1.1
AT1G23380	KNAT6	1	1	AT1G02500	AMS/SA	0.25	-1
AT1G24260	SEP3	1.20E	2.3		M1		
		-18		AT1G64660	MGL	0.44	-1.3
AT2G41100	CML12	2.40E -11	-1.2	AT1G23820	SS (SPDS1)	0.54	-1
AT4G35600	CONNEXI	0.001	-1.2	AT2G27450	СРА	0.084	-1.3
474022470	N32	2	1	AT1G80360	AAT/VAS	0.24	-1.2
A14G33470		1	1 2		1		
AT3G18520		0.28	1.2	AT1G01480	ACS	1	1.1
A14G38130	HDA19	0.3	1.3	AT1G05010	ACO1	0.067	1.1
AT5G61060			-1	AT2G26400	DKMTP	0.004	3.6
A11008400	ПDAO	0.00E	1.4	ATECE29ED		0 11	1 1
AT4G18880	HSFA4A	0.55	-1.2	AT3G55850	MDI	0.11	-1.1
AT5G65710	HSL2	1	-1.1	AT2G03830	ΜΤΔΝ	0.08	-1.2
AT1G10210	MPK1	0.99	-1	A14034040		0.000	1.5
AT3G59790	MPK10	0.12	-1.1	AT1G49820	МТК	0.21	-1.1
AT2G46070	MPK12	0.64	1.1	AT2G28880	ADCS	0.79	-1.1
AT5G19010	MPK16	0.000	-1.8	AT3G06350	EMB3004	0.95	1.1
		47		AT3G23890	TOP2	1	1
AT1G59580	MPK2	0.18	1.4	AT3G18010	WOX	0.83	-1000000
AT3G18040	MPK9	1.00E	1	AT1G25220	ASB1	0.44	1.1
		+00		AT3G59970	MTHFR1	2.50E	-2.1
AT1G21970	NFYB9	0.000	1.4			-13	
AT1G22280		0 5 3	-1 2	AT2G41680	NTRC	1	-1.1
AT1G22280		0.00	-1.2	AT5G17990	PAT1	7.60E	2
A1100/050	TOLLS	0084	5.1			-11	
AT2G45640	SAP18	0.11	1.1	ΓΥΆΩΓΝΟ			
AT1G15750	TPL	0.05	-1.3	ATECO2280	EINIO	0.094	1 /
				AT5G03280		0.064	1.4
ENDÓGENO				AT160/210		0.00	-1.2
AT3G02470	AMTD	0.00E	1.9	AT2625/00	FRF1 2	0.045	1.2
	(SAMDCY	+00		AT2G25450		0.011	-1.0
)			A110/5/50	LILJ	0.97	1.1
AT3G23240	ERF1	0.008	1.9	AT1G59580	MPK2	0.2	1.4
---------------	---------------	--------------	----------	-----------	----------	--------------	------
AT2G43790	MPK6	0.54	-1.1	AT3G45640	MPK3	0.002	-1.3
AT4G28110	AtMYB41	-1.9	0.88			8	
AT5G54430	ATPHOS3 2	1.1	0.11	AT4G11330	MPK5	0.000 062	-1.6
AT3G23610	DSPTP1	1.1	0.62	AT2G43790	MPK6	0.015	1.3
AT2G27050	EIL1/EIN 3	1.1	0.02	AT3G18040	МРК9	1	1
AT2G26150	HSFA2	5.4	1.40E-07	LIGNINA			
AT4G18880	HSFA4A	-1.3	0.29			0.000	
AT2G04550	IBR5	1	0.94	AT3G24503	ALDH2C4	54	1.8
AT4G29810	MKK2	-1.2	0.23			9.20E	
AT3G21220	MKK5	-1.6	0.000029	AT2G30490	CYP73A5	-15	-1.5
AT1G73500	MKK9	1.1	0.52	474020220	F5H/CYP	0.011	2.2
AT3G55270	MKP1	1.1	0.57	A14G36Z20	84A1	0.011	-2.2
AT1G10210	MPK1	-1.1	0.29	AT2G40890		4.50E	-1.6
AT3G25250	OXI1	1	0.62	A12040050		0.000	1.0
AT1G71860	PTP1	1.4	0.078	AT1G15950	CCR1	46	-1.1
AT1G75950	SKP1A	-1.1	0.00058			1.10E	
AT3G18730	TSK	-1.4	1	AT2G32720	CYTB5-B	-29	-1.5
						0.00E	
INDEPENDIENTE				AT1G51680	4CCOAL	+00	-2.6
AT5G62165	FYF/AGL	2.90E	-2.3	AT1G02850	BGU44	0.57	1.2
	42	-08		AT1G72680	CADH	0.24	-1.3
AT1G71450	FUF1	1	1			4.00E	
AT4G28490	HAESA	0.56	1.5	AT5G54160	OMT1	-43	3.3
AT1G68765	IDA	0.88	3.1	474024725	CCOANAT	0.00E	гр
AT4G33470	HDA14	1	-1	AT1G24735	CCUAIVIT	+00	5.3
AT3G18520	HDA15	0.33	1.2	A11G52760	USE	1 2 10E	L
AT5G61060	HDA5	1	-1.1	AT2G37040	ΡΔΙ	-08	14
AT1G08460	HDA8	0.078	1.4	A1203/040	17.2	1.70E	±.+
AT1G10210	MPK1	0.73	-1	AT1G05240	РО	-13	-1.4
AT3G59790	MPK10	0.07	-1.1			1.10E	
AT1G01560	MPK11	2.40E -13	1.6	AT3G21560	SGT	-48	2.9
AT2G46070	MPK12	0.74	1.1	AT5649020	тснт	3.40E	2.4
AT5G19010	MPK16	0.000	-1.8	A13048330	TCHT	7.40F	5.4
		35		AT1G80820	CCR2	-01	1.2