



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**“Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de
abscisión del fruto de *Vanilla planifolia* G. Jack (Orchidaceae)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

CLAUDIA VERÓNICA GRANADOS HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado. Gracias por los consejos y cuidados; por el esfuerzo de procurarme la educación y formación necesarias para alcanzar esta meta. A mi papá por cuidarme, motivarme y enseñarme tantas cosas en su singular, especial y práctico estilo, que me da una perspectiva diferente de las cosas. A mi mamá por el apoyo incondicional, por siempre estar conmigo; por el amor, las preocupaciones, los cuidados, las charlas, debates, los momentos especiales y por enseñarme a observar la vida de una manera distinta a lo convencional.

A Alejandro mi querido hermano, por ser mi persona favorita, mi mejor amigo y mi mayor motivación; mi cómplice y compañero; porque a pesar de tu corta edad he aprendido mucho de ti. Gracias por las risas, los buenos momentos y experiencias; por tu comprensión y por siempre ser luz y consuelo en medio de cualquier oscuridad. Gracias por la confianza, por el vínculo especial entre nosotros y por hacer que siempre me sienta orgullosa de ti.

A mis abuelos por el cariño y apoyo. A mi abuelito Fernando por enseñarme que, aún a pesar de las circunstancias, con inteligencia, esfuerzo y un poco de creatividad, se pueden alcanzar las metas. A mi abuelita Marina(†) por ser mi segunda madre, por mostrarme el lado amable, generoso y compasivo de la vida. Te agradezco por acompañarme y guiarme; por el amor, los consejos, las preocupaciones, la comprensión, y el apoyo. Por enseñarme y recalcarme junto con mi madre, la importancia de la congruencia en todo momento; del respeto hacia todo ser vivo y de alimentar la mente y el espíritu antes que la vanidad. La influencia de ambas fue muy importante para yo encontrar mi verdadera vocación.

A mis tías Socorro(†) y Graciela por ser mis segundas abuelas, por el cariño y los consejos acertados y objetivos, por hacer de su casa un segundo hogar para mí. A toda mi familia, Duplancher Hernández y Granados, por todo el apoyo. A mis tíos Julio(†) y Esteban(†) por el afecto y por compartir las enseñanzas y anécdotas que fomentaron mi imaginación, curiosidad e interés. A mi tía Jacinta por la alegría y la energía que irradas.

A mis tíos Alejandro(†), Fernando, Gerardo y Javier, gracias a todos por estar al pendiente de mí, por las risas, y por su ejemplo de vida. He aprendido tantas cosas buenas de cada uno y de su extraordinaria forma de ser, de su constancia y de su buen corazón. A mis primos, sé que hay un cariño especial y que cuento con ellos a pesar de la distancia. A Jenny y Alejandra por sus preguntas, momentos especiales y agregar un toque de locura necesaria a mi vida.

A las familias Oriza, y Aldape, quienes me han apoyado y considerado como si fuera parte de su familia; asistido en varios aspectos de mi vida, principalmente el espiritual y han abierto las puertas de su corazón y su hogar para mí. Gracias por permitirme crecer a su lado, por las risas y consejos. A mis padrinos Silvia y Gabriel por ser un ejemplo a seguir, por acompañarme, cuidarme, apoyarme y guiarme desde pequeña en todos los aspectos.

A todos mis compañeros y amigos que me han acompañado en este camino. A mis amigos de la infancia Isaac, Jacob, Julio, Javier, Celia y Salvador Castañón, la familia Aguilar y Salvador González por tantos años de amistad, cariño y apoyo.

A mis amigos de la preparatoria. Regina gracias por tu amistad, los gratos momentos pasados en tu compañía y por ser ejemplo e inspiración de éxito profesional. Gabriel, Ivar, Guillermo, Luis, Diego, Nidia e Iván gracias por su amistad, por acompañarme durante tanto tiempo; por las críticas siempre constructivas y consejos; las risas, bromas, buenos momentos y alegría compartida conmigo.

Carlos muchas gracias por tu amistad incondicional, tu comprensión, por escucharme siempre que lo necesito y por tu apoyo constante e insistencia para completar mis metas. Agradezco tus palabras sinceras, consejos y regaños que siempre me han ayudado a superar los obstáculos, dificultades y momentos tristes. Gracias por que a pesar de todo nada ha podido doblegar nuestra amistad. Sé que siempre puedo contar contigo.

Manuel muchas gracias por todo. Por tu amistad, cariño especial, paciencia, comprensión y preocuparte siempre por mí. Gracias por darme confianza, por apoyarme en varios momentos de mi vida, en especial en esta etapa; tu ayuda y apoyo fueron fundamentales para completarla. Agradezco también todos los momentos geniales, tus detalles, cuidados, consejos, regaños y compartir tus inteligentes y acertados puntos de vista que siempre me muestran panoramas distintos. Gracias por siempre estar para mí sin importar las circunstancias.

A mis compañeros y amigos de la Facultad por compartir conmigo alegrías, desvelos, frustraciones, prácticas de campo y lo maravilloso que es estudiar Biología. A Jonathan por tu amistad y cariño, por haber sido mi mayor apoyo durante los últimos semestres de la carrera. Gracias por ayudarme a descubrir mi área predilecta y encontrar el camino académico. A O. Omar, por aparecer inesperadamente y brindarme tu apoyo y amistad en momentos difíciles. Marco y Omar F., gracias por su amistad, sus palabras, el apoyo y las charlas enriquecedoras. A Stephanye M., Berenice y Elena, por siempre dibujar una sonrisa en mi rostro y recordarme que esa sonrisa puede mantenerse a pesar de los infortunios. A Nora por ser mi compañera y amiga. Stephanie C., Karen y Gilberto, gracias por contagiarme su alegría y por su confianza.

Sairi, gracias por tu amistad, por volver y continuar y fortalecer nuestra amistad. Gracias por escucharme y ser mi confidente; por tu comprensión, las risas, los gratos momentos y por ayudarme a recuperar la confianza de ser yo misma. Te agradezco que compartas conmigo la nobleza de tu corazón y siempre tener palabras positivas y de ánimo para mí. Gracias también por ayudarme a revalorizar el concepto de amistad.

J. Omar. Gracias por ser la persona que, durante mi formación profesional, me ha brindado su amistad sincera e incondicional a pesar de cualquier adversidad. Por escucharme, aconsejarme, cuidarme y consolarme. Por acompañarme en los momentos más difíciles y darme la confianza de poder compartir contigo todo tipo de comentarios, buenos ratos, secretos, puntos de vista, anécdotas, experiencias y conversaciones de cualquier tema.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Abril, Yesenia, Ariadna, Edgar, Edmundo, Salvador, Sara y Daniela por ayudar a sobrellevar las frustraciones propias de la experimentación y la tesis; por compartir sus dudas, aprietos e inquietudes conmigo, escuchar las mías y encontrar juntos las respuestas y soluciones. Gracias por su amistad y la grata convivencia. Y. Emmanuel, te agradezco lo antes mencionado y por ayudarme y apoyarme a regresar a mi camino.

A mis sinodales y profesores:

Mi más sincero y profundo agradecimiento a mi tutor, el Doctor Jorge Campos. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio que está a su cargo. Por su amistad, tiempo, orientación, dedicación y paciencia; por compartir sus conocimientos y amplia experiencia conmigo. Le agradezco ser siempre tan amable, comprensivo y asequible y hacer tan grata la estancia en el laboratorio.

Al Doctor Víctor Salazar. Gracias por despertar en mí admiración y deseo de aprendizaje al compartir conmigo sus conocimientos y la visión tan amplia y particular que tiene de los aspectos biológicos y de la vida en general. Por su asesoría, observaciones y consejos. Le agradezco su amistad, amabilidad, palabras de aliento y la agradable convivencia y compañía.

Al Doctor Eduardo López por su asesoría y apoyo en la realización de esta tesis. A la M. en C. Josefina Vázquez, porque desde el primer semestre, gracias a usted aprendí la importancia de la disciplina, constancia y dedicación en la investigación. Le agradezco también su apoyo, asesoría y observaciones en esta última etapa académica.

Al M. en C. Alejandro Monsalvo por la muy grata convivencia, por asesorarme y por ser tan accesible para acudir con usted ante cualquier duda. A la Doctora Martha Martínez, por su amabilidad, sus palabras y comprensión y porque, a pesar de no ser mi sinodal, siempre tuve la confianza de acercarme a usted por asesoría. A la Doctora Estela Sandoval y a su equipo por compartir sus conocimientos y agradables experiencias en campo.

A todos mis profesores. A los profesores Araceli, Antonio, Isabel, Patricia y Josefina, que me guiaron con su ejemplo, clases y consejos para tomar la decisión tan importante que es la elección de carrera. A mis profesores de la carrera, en especial a: Rafael Quintanar, Arnulfo Reyes, Ismael Ledesma, Ricardo Mejía, Martha Salcedo, Sergio González(†), Elías Piedra, Sergio Vaca, Patricia Ramírez, José Guadalupe Martínez(†), Daniel Tejero, María de los Ángeles García, Nicolás Rodríguez, Diodoro Granados, Jaime Barrales, Mario Fernández, Irma Dueñas, Marissa Calderón, Jonathan Franco, Javier Martínez y José Luis Muñoz, porque además de compartir sus amplios conocimientos de la carrera, fomentaron en mí el cuestionamiento y el análisis crítico de problemáticas sociales y científicas para proponer soluciones y me permitieron aprender de ellos más allá de la temática de sus clases.

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por tan generosa educación que me ha brindado y por todo lo que ofrece desinteresadamente a sus alumnos. A la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), especialmente al Laboratorio de Bioquímica Molecular por prestar sus recursos, instalaciones, materiales y equipos para completar mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), que a través del proyecto CONACyT No. 2012-04-190442 financió esta tesis, al Macroproyecto de investigación aplicada a Vainilla sin el cual no hubiera sido posible la realización de la presente y a los productores por su apoyo y por compartir su experiencia.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron a que yo pudiera completar esta etapa tan importante para mí.

ÍNDICE

RESÚMEN	9
1.INTRODUCCIÓN	11
1.1 Justificación	12
2.MARCO TEÓRICO	12
2.1. Generalidades de <i>Vanilla planifolia</i>	12
2.1.1. Género <i>Vanilla</i>	12
2.1.2. <i>Vanilla planifolia</i> Andrews, generalidades	13
2.1.3. Distribución de <i>Vanilla planifolia</i>	14
2.1.4. Hábitat y ecología de <i>Vanilla planifolia</i>	14
2.1.5. Importancia de <i>Vanilla planifolia</i>	15
2.2. Quimiotipos y genotipos en <i>Vanilla planifolia</i>	19
2.3. El proceso de abscisión	21
2.4. Proteínas	24
2.4.1. Degradación de las proteínas mediante el Sistema Ubiquitin-proteosoma (UPS)	24
2.4.1.1 Cascada de Ubiquitinación	25
2.4.1.2 Degradación del producto (proteína)	26
2.5. Transcriptoma y Proteoma	27
2.6. Proteómica	28
2.7. Electroforesis como técnica de separación de proteínas	28
2.7.1. Electroforesis de una dimensión (1D)	28
2.7.2. Electroforesis de dos dimensiones (2D)	29
3.ANTECEDENTES	30
4.OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo general	31
4.2. Objetivos específicos	31
5.MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1. Caracterización de las principales proteínas expresadas diferencialmente durante el proceso de abscisión del fruto de <i>V. planifolia</i>	31
5.1.1. Material biológico	31
5.1.2. Extracción de ARN total y proteínas	32
5.1.3. Cuantificación de proteínas	32
5.1.4. Electroforesis unidimensional (1D)	32
5.1.5. Electroforesis bidimensional (2D)	33
5.1.5.1. Primera dimensión	33
5.1.5.2. Segunda dimensión	33
5.1.6. Determinación de Punto isoeléctrico (<i>pI</i>) y Peso Molecular relativo (<i>PMr</i>)	34
5.1.6.1. Punto isoeléctrico (<i>pI</i>)	34
5.1.6.2. Peso Molecular relativo (<i>PMr</i>)	34
5.1.7. Búsqueda de proteínas en la Base de datos TagIdent (Swiss-Prot)	35

5.2. Identificación del patrón de expresión diferencial de las proteínas relacionadas con la abscisión del fruto de <i>V. planifolia</i>	35
5.2.1. Búsqueda de secuencias de las proteínas en la Base de datos GenBank (NCBI)	35
5.2.2. Comparación de secuencias y de expresión de las proteínas mediante el Sistema Software Geneious	36
5.2.3. Búsqueda de ubicación celular de las proteínas, en la Base de datos COMPARTMENTS	36
5.2.4. Búsqueda de localización de las proteínas en las vías metabólicas, en la Base de datos_KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	37
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. Caracterización de las principales proteínas expresadas diferencialmente durante el proceso de abscisión del fruto de <i>V. planifolia</i>	39
6.1.1. Electroforesis bidimensional (2D)	39
6.1.2. Valores de Punto isoeléctrico (<i>pI</i>) y Peso Molecular relativo (<i>PMr</i>)	39
6.1.3. Búsqueda de proteínas en la Base de datos TagIdent (Swiss-Prot)	40
6.2. Identificación del patrón de expresión diferencial de las proteínas relacionadas con la abscisión del fruto de <i>V. planifolia</i>	41
6.2.1. Comparación de secuencias y de expresión de las proteínas mediante el Sistema Software Geneious	41
6.2.1.1. Expresión total de las proteínas por genotipos (total de CH I respecto al total de CH VI)	42
6.2.1.2. Expresión diferencial de ambas situaciones en un mismo genotipo (CH I sin abscisión respecto a CH I con abscisión y CH VI sin abscisión respecto a CH VI con abscisión)	44
6.2.1.3. Expresión diferencial de CH I y CH VI sin abscisión, comparada con CH I y CH VI en presencia de abscisión	48
6.2.1.4. Ubicación celular de algunas de las proteínas expresadas en el fruto de <i>V. planifolia</i> durante el proceso de abscisión	49
6.2.1.5. Función de las proteínas encontradas en relación al proceso de abscisión y su localización en las vías metabólicas	52
Señalización y biosíntesis del etileno	52
1)Receptores de etileno	52
2)Factores de transcripción asociados a la síntesis de etileno	53
3)Síntesis de etileno	54
La acción de las auxinas en el proceso de abscisión	57
Degradación de las proteínas mediante el Sistema Ubiquitin-Proteosoma (UPS)	59
Zona de Abscisión	61
1)Formación de la Zona de Abscisión	61
2)Señalización y Síntesis de etileno y su relación con la zona de abscisión	63
3)Degradación de la Zona de Abscisión	64
6.2.6. Expresión diferencial no relacionada directamente al proceso de abscisión	67
7. CONCLUSIONES	70
7.1. Perspectivas	70
LITERATURA CITADA	71

RESÚMEN

El extracto de *Vanilla planifolia* G. Jack es uno de los productos más demandados a nivel mundial por diversas industrias. Durante mucho tiempo la exportación de vainilla constituyó una fuente de divisas importante para México. Sin embargo, debido a varios problemas climáticos y sociales, su producción casi desapareció. Otra de las causas de esta pérdida es la abscisión prematura del fruto; la abscisión es el proceso natural de separación tisular mediante el cual las plantas pierden sus hojas y flores senescentes y sus frutos o semillas maduras. Esta separación se origina en la zona de abscisión donde se producen proteínas degradadoras de pared celular. Dicho proceso está regulado hormonalmente; la presencia de altas concentraciones de auxinas en el receptáculo al inicio de la fructificación, está relacionada con el retardo de la abscisión. Una disminución o alteración de esta hormona, ya sea por factores naturales o por estrés, estimula la síntesis de etileno, el cual sensibiliza las células para formar la capa de abscisión. *V. planifolia* presentó un incremento en los eventos de abscisión de frutos inmaduros. Dicha problemática provocó una disminución en la producción de vainilla de 90% aproximadamente, que a su vez generó pérdidas económicas en todos los eslabones que integran el sistema producto vainilla a nivel nacional. De manera que, previo a identificar y relacionar agentes causales, es necesario comprender el mecanismo natural que estimula la abscisión de frutos en *V. planifolia* y compararlo con las situaciones en las que el evento se lleva a cabo de manera prematura. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue realizar una comparación diferencial de expresión de proteínas en los tejidos relacionados con la abscisión de frutos en dos genotipos de *V. planifolia* con comportamiento contrastante frente a dicho fenómeno; CH I presenta un bajo porcentaje de caída y CH VI el mayor porcentaje de caída. Las proteínas totales se extrajeron a partir de un extracto crudo del fruto, mediante el kit AllPrep (QIAGEN), se cuantificaron por el método BCA y se visualizaron en SDS-PAGE 1D, teñidas con Coomassie y SilverQuest™ Silver Staining Kit (Life technology). Para conocer el punto isoelectrico y peso molecular, las muestras se corrieron en SDS-PAGE 2D y se utilizaron los mismos métodos de tinción. Con estos datos se buscaron los nombres de posibles proteínas en el servidor ExpASY de la base de datos Swiss-Prot, empleando la herramienta TagIdent. Las secuencias de dichas posibles proteínas se buscaron en el GenBank del NCBI y se compararon con el transcriptoma previamente secuenciado de CH I y CH VI en ambas condiciones, con y sin abscisión prematura. La comparación fue realizada con el programa Geneious y el transcriptoma fue secuenciado por la UUSMD del IBT, UNAM. La búsqueda en TagIdent arrojó 660 proteínas relacionadas con el proceso de abscisión, de las cuales se eligieron 107 debido a que sus valores de *pI* y de *PMr* son más cercanos a los encontrados en la base de datos. De las 107 proteínas elegidas hubo 28 coincidencias en al menos un genotipo o en una condición. Estas proteínas están relacionadas con la señalización de etileno (ETR1, ERS1, ERS2, EIN4 y ER4; los factores de transcripción: AIL1, AIL6, ERF022, ERF038, RAP2-7, RAP2-13, EIL1, EIN3); la biosíntesis de éste (ACO1, ACO3 y MTN2); la regulación de auxinas (ARF 6 y IAA30); la degradación de proteínas mediante ubiquitinación (ETO1, UBLCP1 y UPE3); lignificación de la zona de abscisión (OMT3) y degradación de pared celular (β GLU46, HGL1 y MPZ). La mayoría de estas proteínas presentaron diferencia de su expresión en las condiciones contrastantes (con abscisión y sin abscisión). Al parecer los receptores de etileno son las proteínas que tienen mayor influencia en el proceso de abscisión, debido a la cantidad de proteínas de este tipo que se presentaron y su alta expresión de algunas de ellas. En segundo lugar estaría ACO1 y en tercer lugar OMT3, por lo que podría asumirse que además del metabolismo del etileno, la formación de lignina en la zona de abscisión es importante en la abscisión del fruto. También puede deducirse la acción del estrés en el proceso de abscisión, ya que, para la mayoría de las proteínas encontradas en este trabajo, existen funciones de respuesta al estrés reportadas en la literatura.

1. INTRODUCCIÓN

El extracto de *Vanilla planifolia* G. Jack es uno de los productos más demandados a nivel mundial por las industrias saborizantes, aromatizantes, cosméticas y alimenticias (Castillo & Engleman, 1993; Koekoek, 2005). Los usos de este condimento se remontan a la época prehispánica, ya que, esta especie que tiene como origen Mesoamérica (Rodolphe *et al.*, 2011), fue utilizada por los totonacas como pago de tributo a los aztecas, quienes la usaban a su vez, para dar sabor y perfume al chocolate (Correll, 1953).

Durante mucho tiempo la exportación de vainilla constituyó una fuente de divisas importante para México, siendo Papantla, Veracruz, la región vainillera más importante del país. No obstante debido a varios problemas meteorológicos y sociales su producción casi desapareció (Castillo & Engleman, 1993; Soto, 2006). Actualmente, el mayor productor de vainilla es Madagascar, con un porcentaje de producción mundial del 58%, mientras que México produce sólo el 3% (Castro, 2008).

Son diversas las razones por las cuales los rendimientos promedios de vainilla en México son bajos, entre ellas está la caída o abscisión prematura del fruto. La abscisión es el proceso de separación tisular mediante el cual las plantas pierden sus hojas senescentes, órganos florales y frutos o semillas maduras (Roberts *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2006). Esta separación se produce dentro de un tejido específico denominado zona de abscisión (ZA), conformado por varias capas pequeñas de células densamente citoplasmáticas ubicadas en la unión del órgano y el cuerpo principal de la planta (Patterson, 2001).

El proceso de abscisión está regulado hormonalmente, ya que la presencia de altas concentraciones de auxinas en el receptáculo al inicio de la floración y de la fructificación, está relacionada con el retardo de la abscisión. La síntesis de auxinas establece un gradiente de concentración, lo cual impide el desarrollo de la zona de abscisión, mientras que la presencia de etileno sensibiliza las células para formar la capa de abscisión (Van Doorn & Stead, 1997; Herrera *et al.*, 2006). Diversas proteínas participan en dicho proceso, tales como receptores, segundos mensajeros, factores de transcripción, enzimas y algunas como parte de complejos de regulación.

El análisis proteico comparativo entre dos situaciones contrastantes, se realiza a través de la proteómica de expresión, que tiene como objetivo la descripción del proteoma total de un tejido, las mediciones cuantitativas de los niveles de expresión proteínica y las diferencias en el contenido proteico celular entre dos situaciones distintas. En un primer paso se separan las proteínas de un extracto complejo y luego se identifican las proteínas individuales con el objeto de determinar la “firma proteómica” o conjunto de proteínas cuya alteración de su expresión es característica de la respuesta a una condición definida o cambio genético. Esta firma proteómica se puede determinar por presencia/ausencia de “spots” en los geles electroforéticos. (Mojica *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2010; Pando & Ferreira, 2015).

1.1. Justificación

Debido a la importancia cultural, agrícola y comercial de *V. planifolia*, la problemática que se presenta derivada de la abscisión prematura de sus frutos requiere de la búsqueda de una solución que atienda las necesidades de los sectores que se ven afectados. Previo a identificar y relacionar agentes causales, es necesario comprender el mecanismo natural que estimula la abscisión de frutos en *V. planifolia* y compararlo con las situaciones en las que el evento se lleva a cabo de manera prematura, esto con el propósito de obtener a mediano plazo una metodología que permita controlar el proceso de caída de fruto para incrementar así la productividad del cultivo a nivel nacional (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012).

El presente estudio se incorpora como parte de un proyecto, cuyo objetivo es realizar una comparación diferencial a nivel global de expresión genética en los tejidos relacionados con la abscisión de frutos en dos genotipos de *V. planifolia* con comportamiento contrastantes frente a la caída prematura de fruto, donde CH I muestra un bajo porcentaje de caída, mientras que CH VI presenta el mayor porcentaje de caída. Por tal motivo, este trabajo se concentró en el estudio del proteoma expresado de manera diferencial durante el proceso de abscisión, relacionado con la respuesta a etileno, auxinas y la degradación de pared celular en la zona de abscisión.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de *Vanilla planifolia*

2.1.1. Género *Vanilla*

El género *Vanilla* Plumier ex Miller, con 110 especies aproximadamente, pertenece a la Subfamilia Vanilloideae de la Familia Orchidaceae (Cameron *et al.*, 1999, Lubinsky *et al.*, 2008). Este género presenta una distribución pantropical, sus caracteres diagnósticos son: plantas hemiepífitas con crecimiento monopodial vínico; raíces propias de cada internodo, frutos carnosos y semillas sin alas con una cubierta de la semilla dura. Pueden ser frondosas o no tener hojas. En el primer caso, las hojas son coriáceas-carnosas. Las inflorescencias están formadas sobre un eje especializado. Labios con o sin callo penicilado. La columna está unida al labio generalmente más de la mitad de su longitud (Soto & Cribb, 2010).

A pesar de la diversidad de especies encontrada dentro de este género, se cultivan solamente tres para alta producción comercial; *Vanilla planifolia* Andrews o *Vanilla fragans* Salisbury, *Vanilla pompona* Schiede y *Vanilla tahitensis* Moore (Castro, 2008).

2.1.2. *Vanilla planifolia* G. Jacks., ex Andrews, generalidades

Particularmente, *Vanilla planifolia* es una orquídea herbácea, perenne, hemiepífita y enredadera que trepa a los ápices superiores de los árboles, llamados tutores o soportes, hasta una altura de aproximadamente 10 m de largo (**Fig. 1, A**) (Lejerazo, 1992; Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010).

El tallo o bejuco, es carnoso, simple o ramificado, cilíndrico, liso, monopodial, con un diámetro de 1 a 2 cm, largo, flexible, frágil, suculento de color verde oscuro y fotosintético con presencia de estomas (Vivar, 2004; Baltazar, 2010; Soto & Dressler, 2010). Está formado por entrenudos de 8-11 cm de longitud, donde se desarrollan dos tipos de raíces; primarias o subterráneas, las cuales nacen de los nudos introducidos en la tierra y se localizan entre 5 y 10 cm de profundidad dentro de la materia orgánica del suelo en un radio de hasta 1.20 m alrededor del tallo principal; son pubescentes de 1.4-1.6 mm de ancho. Las secundarias o aéreas, de 2.5 a 3.0 mm de grosor, son blanquecinas, brotan de los nudos de la parte aérea de los tallos de manera opuesta a las hojas y con éstas la planta se adhiere a los árboles tutores (Vivar, 2004; Castro, 2008; Soto & Dressler, 2010).

Las hojas son alternas, largas, planas, largas (9.5- 23 cm de largo y 3.5-7.6 cm de ancho; 1.3- 2.4 mm de grosor), suculentas, subsésiles, oblongas- elípticas a lanceoladas; las puntas son agudas a acuminadas y la base redondeada, provistas de un peciolo corto, grueso y canalizado (**Fig. 1, A; Fig. 2**). Presentan numerosas venas, paralelas, indistintas y las nervaduras comienzan en el peciolo para terminar en punta, contiene un jugo viscoso, que al igual que el tallo, es caústico. Su superficie es lustrosa y cutinizada en el haz. Generalmente están dirigidas hacia abajo, excepto las de la punta del bejuco (Arditti *et al.*, 2009; Baltazar, 2010; Soto & Dressler, 2010).

Las inflorescencias son racimos axilares simples, también conocidos como macetas, de más de 26.5 cm de longitud. Cada planta produce de 10-20 racimos y éstos a su vez, soportan de 7- 18(-70) botones florales, los cuales abren de uno a dos simultáneamente y de manera ascendente, es decir, primero los de la base y después hacia la parte apical (Vivar, 2004; Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010). La maduración de los botones es de manera secuencial, esto consiste en que las flores abren de una o dos en las primeras horas de la mañana y sólo perduran hasta medio día; al siguiente día abren nuevas flores (**Fig. 1, B; Fig. 2**) (Vivar, 2004; Castro, 2008).

Las flores de la vainilla son hermafroditas, efímeras, largas, ligeramente fragantes, de color blanco con tonalidades ligeras de amarillo-verdoso y miden aproximadamente 5 cm. Florecen de manera sucesiva, (1 o 2 abiertas al mismo tiempo). Esta especie florece generalmente por primera vez a los tres años de plantada y después anualmente durante un periodo aproximado de dos meses (Lejerazo, 1992). Las flores están compuestas de tres sépalos, tres pétalos y un órgano central llamado columna o ginostemo (Soto, 1999; Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010).

Los sépalos son de elípticos a oblanceolados, con ápices subagudos, subcaliptrados; canaliculado y semicuniformes en la base. El sépalo dorsal es estrecho (55-60 por 10-2 mm), ligeramente cóncavo, redondeado, y presenta 9 venas; mientras que los sépalos laterales de 54-60 por 12-13.5 mm y de 10 venas, son planos generalmente, con márgenes ligeramente involutos. Los pétalos (13 venas, 55-58.5 por 10-11 mm) presentan una forma oblanceolada y algo arqueada; el ápice ligeramente reflexo, obtuso-redondeado, oblicuo, con muescas, base cóncava y canaliculada; en la superficie abaxial presenta una quilla plana, muy conspicua y axialmente elevada terminada en cilindro (2 mm). Uno de los pétalos está modificado y se le denomina labelo, mide aproximadamente 1.5 cm de ancho, tiene forma de trompeta, muy cóncavo (para ser cymbiforme), ligeramente sigmoide, con márgenes muy ondulados y 36 venas ramificadas en el tercio distal. (Soto, 1999; Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010).

La columna o ginostemo (3 cm de largo) (**Fig. 1, C; Fig. 2**), es una estructura muy delgada y alargada donde se fusionan los órganos sexuales (estambres y pistilos); dichos órganos están separados por una membrana llamada rostelo, la cual dificulta o impide la autopolinización (**Fig. 1, D; Fig. 2**). El ovario (57 por 4 mm) es cilíndrico, suave; arqueado y blanco en la base, pero recto y verde en la parte superior y presenta nectarios extraflorales (Soto, 1999; Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010).

En el sentido botánico, los frutos no son vainas sino cápsulas casi cilíndricas, miden 15- 25 cm y 8.5 mm de ancho, silicuiformes, tricarpelares, largas, carnosas, suculentas, ligeramente triangulares y dehiscentes de sección transversal (**Fig. 1, D**) (Vivar, 2004; Baltazar, 2010; Soto & Dressler, 2010). En su interior contiene varios miles de pequeñas semillas (0.24 a 0.33 mm) negras y subglobosas (**Fig. 2**). La testa es sólida de olor suave y balsámico sabor ocre y aromático (Baltazar, 2010). En la naturaleza no se presenta germinación de semillas de vainilla, debido al endurecimiento de la testa y la secreción de aceites que inhiben la germinación (Castro, 2008; Parra, 1987).

2.1.3. Distribución de *Vanilla planifolia*

En México, se han localizado individuos silvestres de *Vanilla planifolia* en Oaxaca, Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y zonas limítrofes de Veracruz, Chiapas y San Luis Potosí. (Soto, 1999; Soto & Dressler, 2010). De la producción nacional de vainilla, el 90% es producido en la región de Totonacapan, la cual comprende nueve municipios veracruzanos y tres poblanos; el resto se produce en Hidalgo, Oaxaca, Tabasco y Quintana Roo (Morales *et al.*, 2001).

2.1.4. Hábitat y ecología de *Vanilla planifolia*

Vanilla planifolia crece en bosques tropicales; es raramente encontrada en forma silvestre en selvas perennifolias sobre terrenos cársticos muy accidentados desde el nivel del mar y hasta 750 m de altitud y con precipitaciones mayores a 2500 mm. A pesar de las altas precipitaciones, las selvas de cimas donde se encuentra la vainilla, son achaparradas, muy ventiladas y edáficamente secas (Soto, 1999).

La vegetación dominante en estas cimas incluye las especies *Bernoullia flammea* (Oliver.), *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) (Dugand.), *Dendropanax arboreus* (L.) Decne & Planch., *Bursera simaruba* (L.) Sarg., *Gaussia gomezpompae* (H. Quero.), *Cedrela mexicana* (Roem.), *Robinsonella sp.*, *Ficus tecolutensis* (Liebm.), *Dracaena americana* (Donn.), *Trichospermum mexicanum* (DC.) K. Schum., *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn., *Dioon spinulosum* (Dyer & Eichler) y *Chamaedorea metallica* (O.F. Cook ex H. E. Moore). Se ha encontrado en selvas *Liquidambar*, *Clethra*, *Podocarpus* y *Quercus* aunque con crecimiento menos vigoroso (Soto, 1999).

2.1.5. Importancia de *Vanilla planifolia*

La importancia de *Vanilla planifolia* incluye los aspectos económico, cultural, social y ecológico. En primer lugar, económico, al ser la vainilla la segunda especia más cara del mundo después del azafrán (Osorio, 2012; Azofeifa et al., 2014).

La parte de la vainilla que principalmente tiene usos comerciales es el fruto, el cual requiere pasar por el proceso de beneficiado, el cual consiste en un constante “sudado” y secado de los frutos mediante el calor del sol, lo cual propicia una reacción enzimática y una ligera fermentación, que permite la eliminación del 80% y la obtención del principal compuesto activo, la vainillina de la humedad mediante la exposición al sol u horneado (Morales et al., 2001; Osorio, 2012).

Este condimento es utilizado por la industria alimentaria y cosmética para dar sabor y perfume en la preparación de helados, confitería, bebidas, licores, panificación, repostería, derivados lácteos, cremas, perfumes, jabones, cigarros y otros productos de cuidado personal. Con el fruto beneficiado también se realizan artesanías como, aretes, pulseras, collares, rosarios y otras figuras (Lejerazo, 1992; Morales et al., 2001, Osorio, 2012).

También es utilizada por la industria farmacéutica para la síntesis de fármacos tales como Aldomet (antihipertensivo), L-DOPA y trimetaprim. La vainillina posee propiedades bacteriostáticas mientras que las hidrazonas de vainillina tienen acción herbicida. Un uso potencial de la vainillina es como agente madurador en la caña de azúcar además de ser un potente agente antioxidante en alimentos complejos que contienen ácidos grasos poli-insaturados. Otros usos incluyen la prevención de espuma en aceites lubricantes, atrayente en insecticidas y como agente solubilizante para la riboflavina (Lejerazo, 1992).

Los usos de este condimento se remontan a la época prehispánica, ya que, esta especie que tiene como origen Mesoamérica (Rodolphe et al., 2011), fue utilizada por los totonacas como pago de tributo a los aztecas, quienes la usaban a su vez, para dar sabor y perfume al chocolate (Correll, 1953).

Cómo lo demuestran los registros de Fray Bernardino de Sahagún y de Fray Diego Durán, los usos de la vainilla fueron conocidos por los españoles a su llegada a América, (Correll, 1953). Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XIX cuando comenzaron las exportaciones de la vainilla a Europa (Castro, 2008).

Durante mucho tiempo la exportación de vainilla constituyó una fuente de divisas importante para México, siendo Papantla, Veracruz, la región vainillera más importante del país. No obstante debido a varios problemas meteorológicos y sociales su producción casi desapareció (Castillo & Engleman, 1993; Soto, 2006). Actualmente, el mayor productor de vainilla es Madagascar, con un porcentaje de producción mundial del 58%, mientras que México produce sólo el 3%. Esto se logró a partir de que la los franceses trasladaron la vainilla a la Isla de Madagascar y después de que lograron polinizar la planta, ésta isla se convirtió en su principal exportadora (Castro, 2008).

Son diversas las razones por las cuales los rendimientos promedios de vainilla en México son bajos. Entre ellas está la introducción al mercado del saborizante artificial que es más barato; el descubrimiento de campos petroleros en el norte de Veracruz justo en los vainillales (Soto, 2006) y, a que los productores artesanales desconocen la tecnología de producción y además carecen de recursos económicos suficientes (Hernández, 2011). Esto, referente al aspecto socio- económico, y por otro lado, está la abscisión prematura del fruto que ha sido un problema de producción en los últimos años.

La caída prematura del fruto de *Vanilla planifolia* ha provocado una disminución en la producción de vainilla mexicana un 90% aproximadamente, lo que a su vez ha generado pérdidas económicas en todos los eslabones que integran el sistema producto vainilla a nivel nacional. Según el SIACON (Sistema de Información Agropecuaria de Consulta) y la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), en 2005 la superficie nacional cultivada con esta planta fue de 1,106.75 ha, con una producción de 189 ton de vainilla verde, de las cuales se obtuvieron aproximadamente 30 t de vainilla beneficiada. En contraste, de acuerdo al volumen acopiado en la cosecha del año 2010/11, se estima que la producción de vainilla verde fue menor de 20 ton, de los cuales se obtuvieron menos de 5 ton de vainilla beneficiada, debido principalmente al incremento en los eventos de abscisión de frutos inmaduros y al abandono de los vainillales (Hernández, 2011; De Giorgio, 2012).

La importancia ecológica de esta especie radica en la posibilidad de ser establecida en bosques y zonas de reserva forestal, contribuyendo así a la conservación y valorización de éstos y otros recursos naturales (Osorio, 2012). Por otro lado, es importante la relación entre la vainilla y sus polinizadores respectivos, ya que presenta fenómenos ecológicos, conductuales, de co-evolución y a través de ellos se pueden entender relaciones filogenéticas relacionadas con el éxito evolutivo de las especies involucradas (Gigant *et al.*, 2011; Azofeifa *et al.*, 2014).

Desde el punto de vista social, el cultivo de la vainilla es una alternativa de agricultura sustentable debido a que no requiere de grandes extensiones de terreno para obtener altos ingresos económicos empleando mano de obra familiar). Además, la cadena de producción de la vainilla incluye la comercialización del fruto verde y el beneficiado, esto proporciona valor agregado a la cadena de producción, disminuyendo el papel de los intermediarios agrícolas e incrementando los beneficios directos para los pequeños productores (Cruz, 2004; Azofeifa *et al.*, 2014).

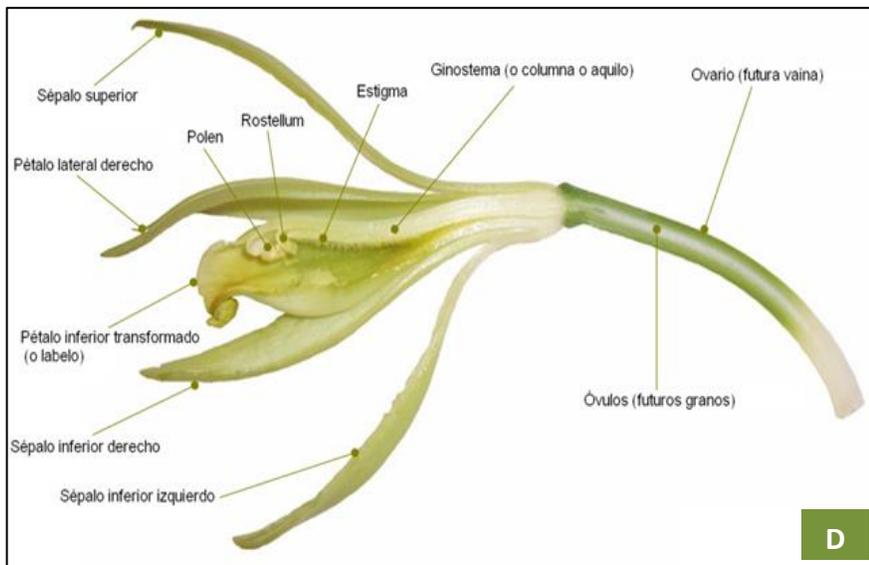
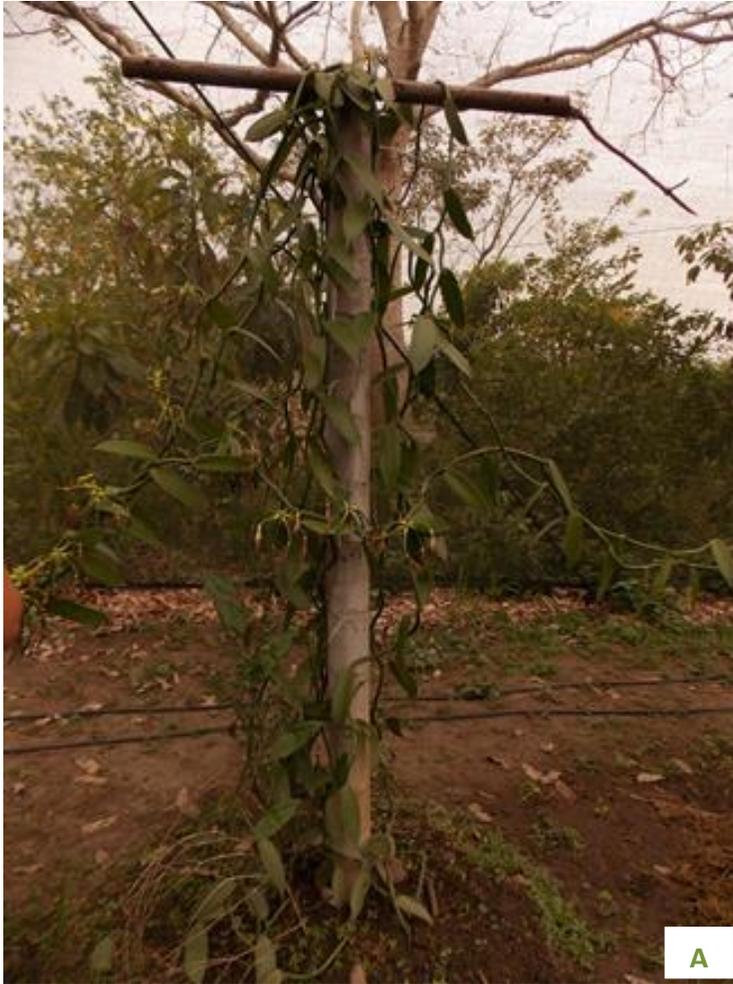


Figura 1. *Vanilla planifolia*. A. Planta, B. Inflorescencia, Raquis y fruto polinizado. C. Flor, D. Corte longitudinal de flor, E. Fruto

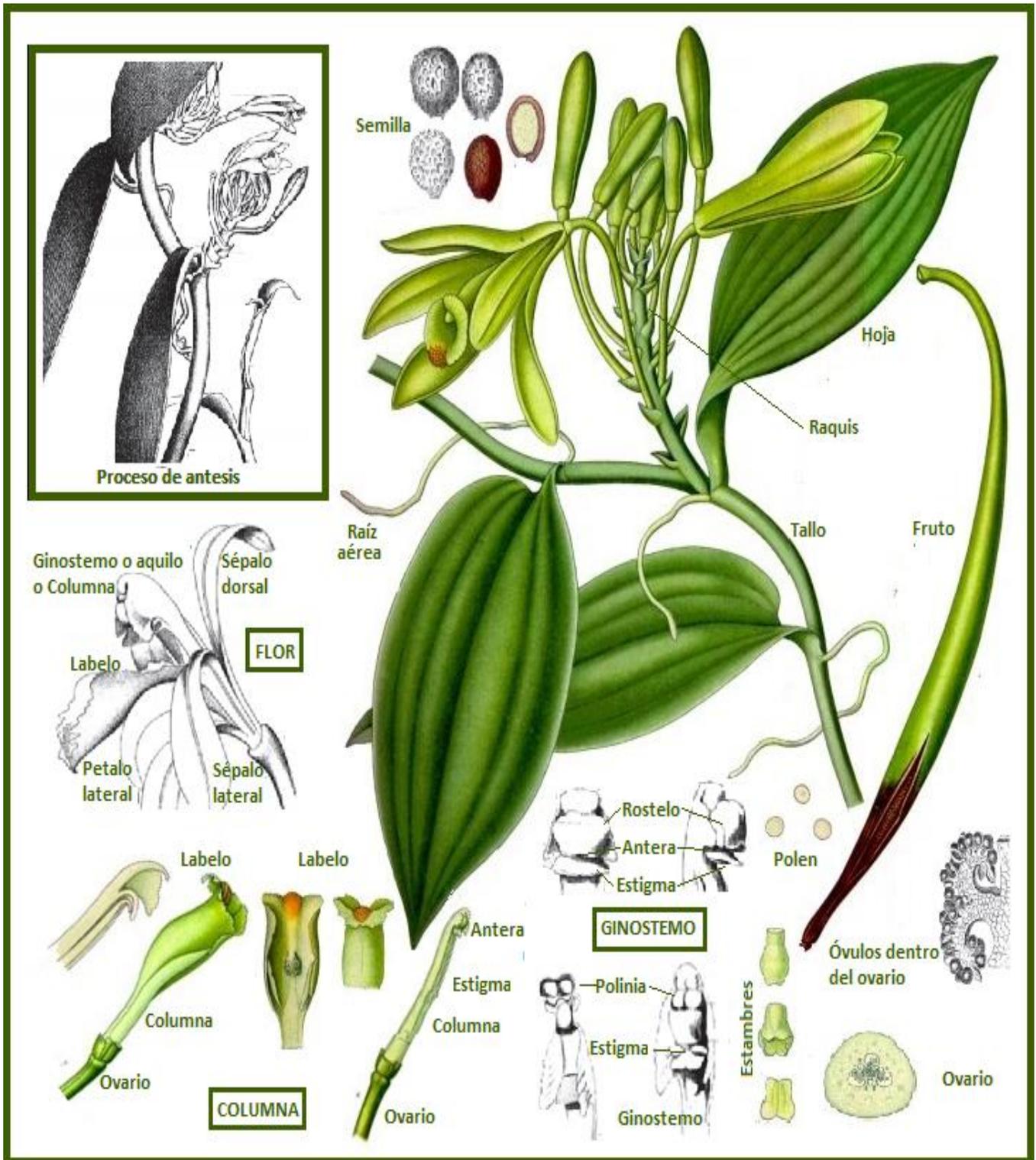


Figura 2. *Vanilla planifolia*. Modificada de Köhler, 1887 y Arditti, 2009

2.2. Quimiotipos y genotipos en *Vanilla planifolia*

En plantas medicinales y en plantas aromáticas, como es el caso de *Vanilla planifolia*, se han detectado subpoblaciones en una misma especie o población con variaciones en la composición y concentración típica de los principales metabolitos secundarios que determinan la calidad fitoquímica de sus individuos (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

Estas subpoblaciones son denominadas polimorfismos químicos o quimiotipos; los cuales son definidos como adaptaciones fitoquímicas locales que son genéticamente controladas y están relacionadas con la interacción de las especies con su hábitat (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

El aroma característico de la vainilla es resultado de una serie de reacciones bioquímicas a partir de compuestos glucósidos contenidos en la vaina verde, estos glucósidos son precursores de los compuestos volátiles (Ranadive, 1992; Dignum *et al.*, 2004). De los cinco precursores que se han encontrado, el más importante es la glucovainillina, ya que, a partir de él y mediante una reacción de hidrólisis enzimática catalizada por una β -glucosidasa, se produce un aldehído fenólico denominado vainillina (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

La vainillina es el compuesto más abundante de los más de 170 presentes en la vaina de la vainilla. Entre estos compuestos se encuentran ácidos, éteres, alcoholes, heterocíclicos, ésteres y compuestos fenólicos y carbonílicos (Klimes & Lamparasky, 1976; Shamina, 2008; Salazar-Rojas *et al.*, 2011; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012).

La concentración de los aldehídos vainillina (4-hidroxy-3-metoxibenzaldehído) y p-hidroxibenzaldehído y sus respectivos ácidos, el ácido vainílico (ácido 4-hidroxy-3-metoxibenzaldehído) y el ácido p-hidroxibenzaldehído, en vainas beneficiadas es utilizada como indicador de calidad aromática para propósitos comerciales (Ranadive, 1992; Odoux, 2003; Pérez-Silva *et al.*, 2006; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012).

Salazar-Rojas y col., en el 2011, estudiaron el polimorfismo químico de los cuatro fenoles principales antes mencionados presentes en el fruto de *Vanilla planifolia*. Basados en la concentración de dichos fitoquímicos, los autores distinguieron seis quimiotipos diferentes, algunos con características aromáticas silvestres (baja participación de vainillina), relacionados con el material menos cultivado en la región y quimiotipos domesticados con alta participación de vainillina. Los resultados muestran que la diversificación de los quimiotipos de *V. planifolia* no está relacionada con la variación ambiental.

El Quimiotipo I está caracterizado por tener la mayor concentración de ácido p-hidroxibenzóico, alta concentración de p-hidroxibenzaldehído y ácido vainílico, con baja concentración de vainillina y aroma dulce con notas florales. Este Quimiotipo se distribuye en zonas con precipitaciones fluviales anuales de 1,751 mm y climas húmedos y calientes de temperatura anual de 22 °C-; 18°C en el mes más frío del año (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

En cambio, el Quimiotipo II presenta contenido medio de ácido p-hidroxibenzóico, alta concentración de ácido vainílico y p-hidroxibenzaldehído y el más alto contenido de vainillina de todos los Quimiotipos, lo que le da predominancia en el aroma. Dicho Quimiotipo se encuentra en zonas con clima caliente y húmedo, con temperaturas entre 22°C y 18°C (el mes más frío) y precipitaciones fluviales anuales de 1,351 mm (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

Respecto a la composición del Quimiotipo III, contiene una concentración de media a alta de ácido p-hidroxibenzóico, alta de ácido vainílico y vainillina, media a baja de p-hidroxibenzaldehído; en su aroma, predominan ligeramente notas de vainillina. Está distribuido en zonas con climas húmedos, calientes y tibios, de temperaturas mayores a 18°C hasta en el mes más frío y precipitaciones fluviales entre 1,351 y 1,751 mm al año. El Quimiotipo IV se caracteriza por su contenido medio-bajo de ácido p-hidroxibenzóico, concentración baja de ácido vainílico, media a alta de p-hidroxibenzaldehído y media-baja de vainillina. En este aroma hay una participación media a alta de compuestos menores dándole notas sutiles de canela. Se distribuye en las zonas de clima caliente y húmedo con temperaturas mayores a 22°C y en el mes más frío por arriba de los 18°C; con un promedio de precipitación fluvial anual de 1,000 a 2,751 mm (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

En el Quimiotipo V se encontró una concentración de media a alta de ácido p-hidroxibenzóico, una proporción similar de ácido vainílico y p-hidroxibenzaldehído y una concentración de media a baja de vainillina. Se perciben dulces notas a chocolate en el aroma debido a la alta participación de compuestos menores. La distribución de este Quimiotipo está en las zonas húmedas de calientes a tibias de 18 °C o por debajo en el mes más frío y con promedio de precipitaciones fluviales anuales entre 1,351 y 3,501 mm. Por su parte, el Quimiotipo VI se distingue por su bajo contenido de ácido p-hidroxibenzóico y contenido variable de vainillina (de bajo a alto), predominando así notas intensas de vainillina en el aroma. Está distribuido en zonas calientes y húmedas con una temperatura promedio arriba de los 18°C y menor a los 18°C en el mes más frío. El rango de precipitación fluvial anual es amplio para este Quimiotipo, de 1,000 a 4,000 mm (**Cuadro 1**) (Salazar-Rojas *et al.*, 2011).

Los Quimiotipos IV y VI tienen importancia comercial, mientras que el Quimiotipo V es genéticamente relevante. El Quimiotipo I presenta una importancia biológica y los Quimiotipos II y III son comercialmente significativos (Salazar, 2011).

Cuadro 1. Principales componentes aromáticos de los quimiotipos de *V. planifolia* en la región Totonacapan, Puebla-Veracruz y localidades complementarias. C1: ácido p-hidroxibenzóico, C2: ácido vainílico, C3: p-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina (Salazar-Rojas *et al.*, 2011)

Quimiotipos	C1 (ppm)	C2	C3	C4	$\sum MC/C4$ (%)
<i>V. planifolia</i> CH I	127	794	703	12,684	13
<i>V. planifolia</i> CH II	86	716	733	18,657	8
<i>V. planifolia</i> CH III	85–100	782–861	344–498	16,727–17,004	8
<i>V. planifolia</i> CH IV	66–90	391–580	497–600	10,407–14,344	9
<i>V. planifolia</i> CH V	84–112	528–565	413–675	11,056–12,998	10
<i>V. planifolia</i> CH VI	58–81	411–755	219–497	10,698–17599	7

La existencia de estos seis grupos fitoquímicos para el germoplasma de *V. planifolia* fueron confirmados como grupos genéticos (genotipos) mediante el análisis de microsatélites. La utilización de loci microsatélites permitió identificar variación a nivel infraespecífico en *V. planifolia*, de los cuales 13 loci resultaron polimórficos para los quimiotipos de *V. planifolia*, y definieron cinco genotipos cultivados en la región Totonacapan (**Fig. 3**). Estos datos indican que en el posible centro de origen de vainilla, existe una variación genética y fitoquímica del germoplasma en dicha especie, generado por un proceso de domesticación (Salazar, 2011).

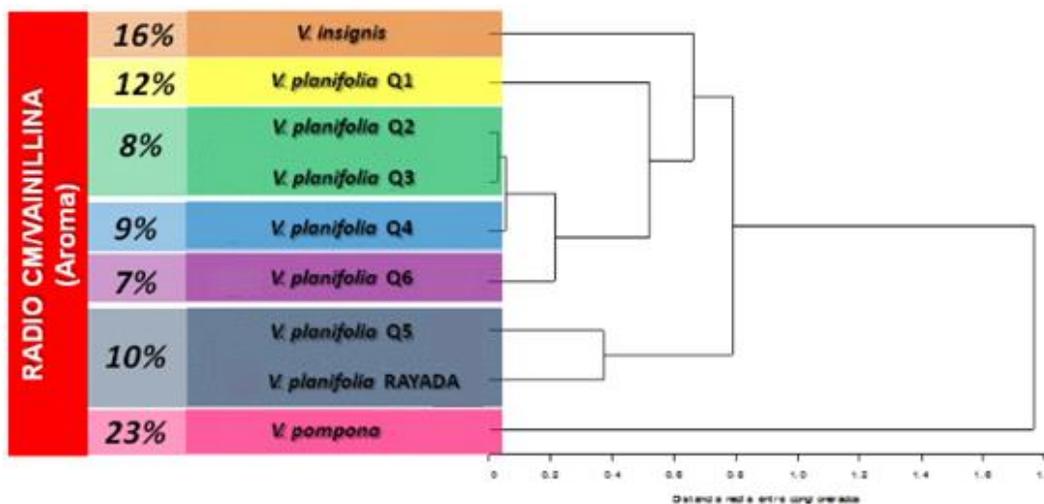


Figura 3. Dendrograma de colectas de *Vanilla planifolia* J. en la región Totonacapan, Puebla-Veracruz, México, con base en el promedio de 13 loci microsatélites y agrupamiento por distancias de similitud (Salazar, 2011; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012)

2.3. El proceso de abscisión

La abscisión es el proceso de la degradación de la pared celular y separación tisular mediante el cual las plantas pierden sus hojas senescentes, órganos florales y frutos o semillas maduras. Esta separación se produce dentro de un tejido específico denominado zona de abscisión (ZA), conformado por varias capas pequeñas de células densamente citoplasmáticas ubicadas en la unión del órgano y el cuerpo principal de la planta (**Fig. 4**) (Van Doorn & Stead, 1997; Roberts *et al.*, 2000; Patterson, 2001; Lewis *et al.*, 2006).

A nivel celular, la abscisión consiste en la hidrólisis de la lámina media y las paredes de las células que constituyen la ZA, por ello, este proceso está relacionado con el incremento en la actividad de enzimas (glucanasas, celulasas, poligalacturonasas, expansinas) que hidrolizan los polisacáridos estructurales. El etileno induce significativamente la expresión de estas enzimas en la ZA. Se ha sugerido la posibilidad de que otras familias de enzimas participan en la degradación de la lámina media y la pared celular durante el proceso, como las xiloglucano, las endotransglicosilasas, las pectin metilesterasas o las pectato liasas (Merelo, 2011).

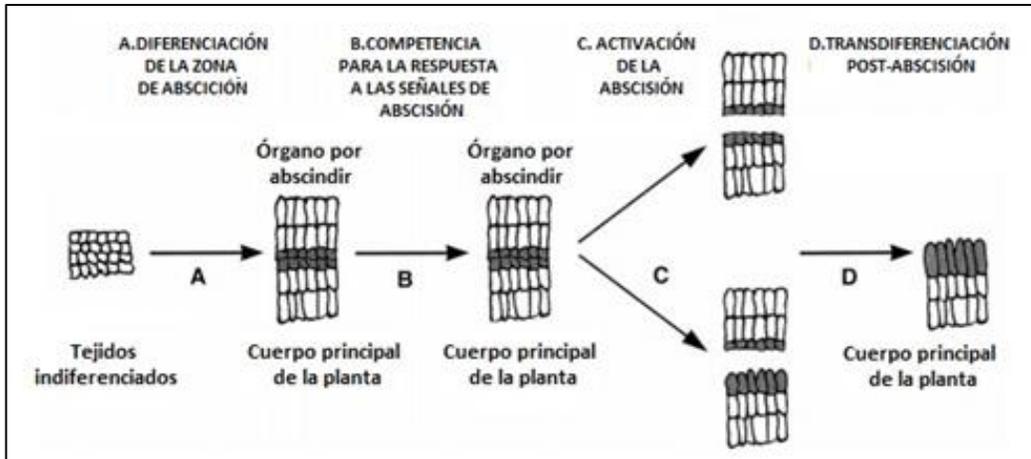


Figura 4. Modelo de abscisión. Modificada de Patterson, 2001

El proceso de abscisión está regulado hormonalmente debido a que la presencia de altas concentraciones de auxinas en el receptáculo al inicio de la floración y de la fructificación, está relacionada con el retardo de la abscisión. La síntesis de auxinas establece un gradiente de concentración, lo cual impide el desarrollo de la zona de abscisión, al mantener las células de la región en un estado no receptivo para que esta se forme (Figura 5). Las llamadas proteínas PIN es la familia de proteínas encargadas del transporte y exportación de IAA (ácido indolacético) o auxinas y promueven el cambio de gradiente de concentración de estas dentro de la célula (Van Doorn & Stead, 1997; Taiz & Zeiger, 2006).

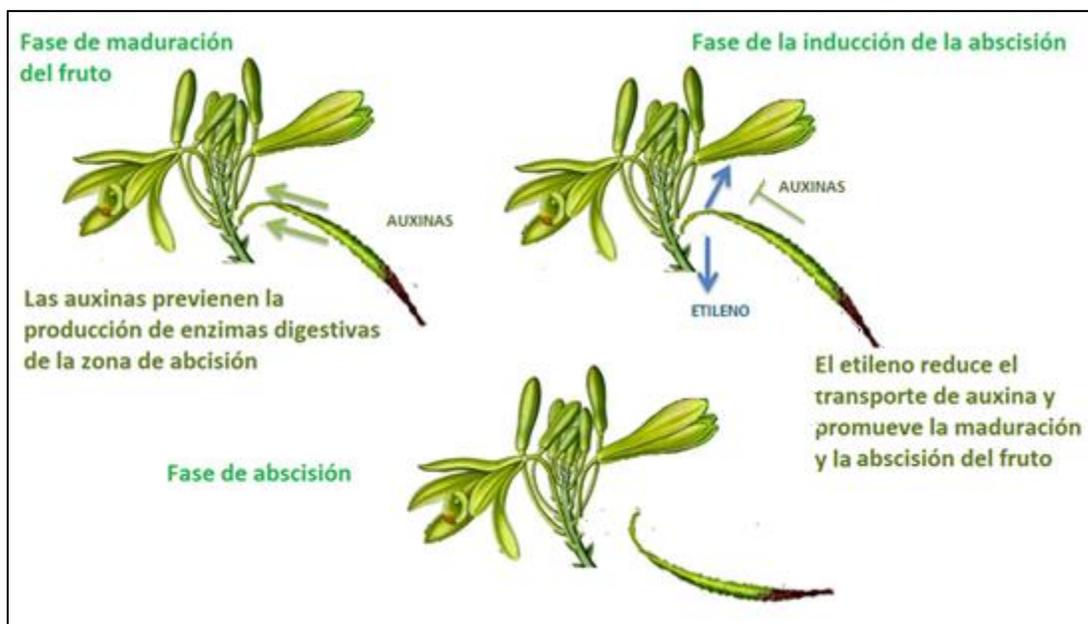


Figura 5. Proceso de abscisión del fruto

Además de las auxinas, otros actores contribuyen a impedir la abscisión, por ejemplo, luz, nutrición adecuada y citoquininas. Una disminución o alteración de este gradiente, ya sea por factores naturales (senescencia de la hoja) o provocado (daños por insectos, daños mecánicos, estrés lumínico, térmico o hídrico) estimula la síntesis de etileno, el cual sensibiliza las células para formar la capa de abscisión (Van Doorn & Stead, 1997; Herrera *et al.*, 2006).

La biosíntesis de etileno inicia con la metionina, molécula que se une a la adenosina conformando la S-adenosilmetionina (AdoMet). El paso siguiente es la conversión de este intermediario en ACC (ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico). De esta conversión se libera 5 metil-tio-adenosina que puede disociarse en adenina y ribosa (metil-tio-ribosa) pasando por varias reacciones para constituir nuevamente metionina y así continuar el ciclo. Las tres reacciones principales están sintetizadas por las enzimas: AdoMet sintetasa (síntesis de AdoMet); la ACC sintasa (síntesis de ACC) y la ACC oxidasa (síntesis de etileno) (**Fig. 6**) (Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006).

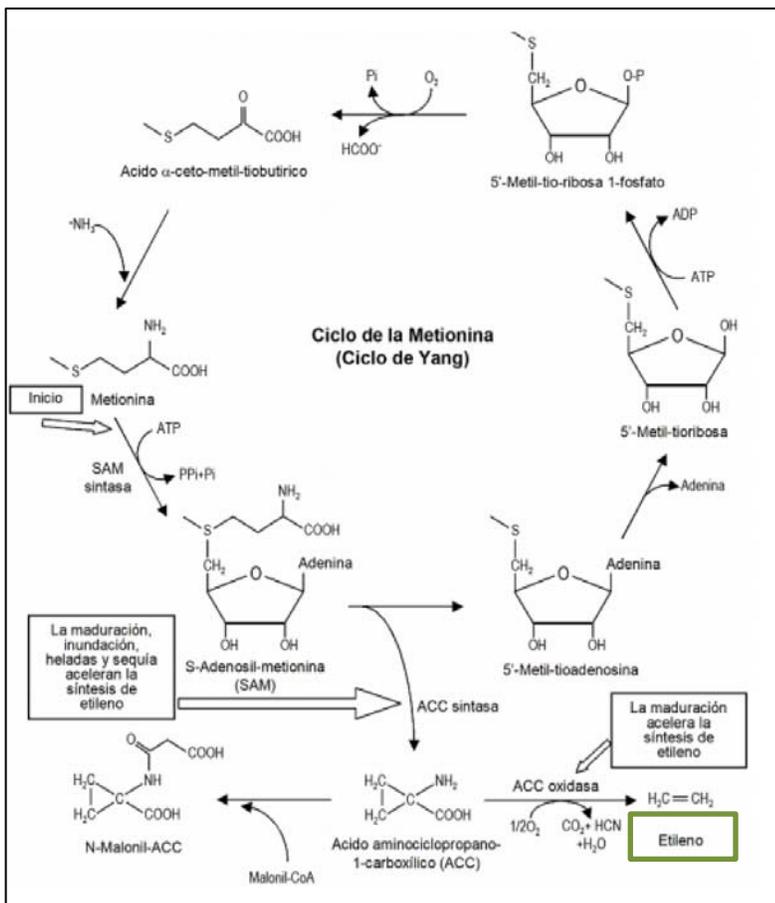


Figura 6. Biosíntesis del etileno y ciclo de Yang (Jordán & Casaretto, 2006)

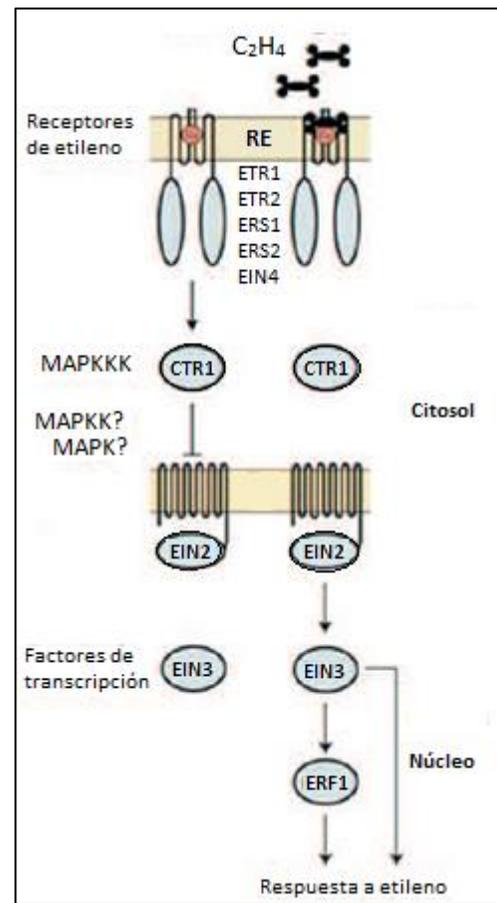


Figura 7. Modelo para la transducción de señales del etileno (Barrera-Ortiz *et al.*, 2012)

Las proteínas involucradas en el reconocimiento del etileno son los receptores ETR(1 y 2), ERS (1 y 2) y EIN4; mientras que el segundo mensajero CTR1, el receptor intracelular EIN2, los factores de transcripción EIL(1,2 y 3), EIN3, ERF(1), el regulador transcripcional EDF y el transportador de Cobre RAN1 componen la ruta señalización del etileno (**Fig. 7**). (Kushad *et al.*, 1985; Raven *et al.*, 1992; Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006; Lin *et al.*, 2009; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012; Ju & Chang, 2012; NCBI, 2015).

2.4. Proteínas

Las proteínas son cadenas polipeptídicas constituidas por un gran número de residuos de aminoácidos unidos entre sí covalentemente por enlaces amidas también conocidos como enlaces peptídicos. Existen 20 aminoácidos L- α utilizados para la formación de proteínas; los aminoácidos contienen un grupo amino (básico) y un grupo carboxilo (ácido), esta disposición permite que los aminoácidos se unan formando las cadenas peptídicas; en enlace se da entre el grupo amino de un aminoácido (-NH₂) y el carboxilo (-COOH) de otro y sus características químicas están dadas por las cadenas laterales que los componen (Zhang, 2002; Freeman, 2009).

Las proteínas mantienen una conformación dependiendo de las interacciones entre los aminoácidos que las componen; a esta conformación natural que es más estable *in situ*, se le llama “nativo”; este estado puede ser interrumpido por factores tales como la temperatura, el pH, hidrólisis, la presencia de las superficies hidrófobas y de iones metálicos entre otros. La pérdida de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria debido a la exposición a un factor de estrés se llama desnaturalización (González- Andrade *et al.*, 2005; Benítez *et al.*, 2008).

Las proteínas ejecutan la mayor parte de las funciones vitales de las células como el reconocimiento molecular, protección, almacenamiento, señalización, el transporte de moléculas, la función estructural, la catálisis de las reacciones químicas, inclusive la regulación de la expresión de los genes está determinada por proteínas que interactúan con el ADN (González- Andrade *et al.*, 2005; Lodish *et al.*, 2005).

2.4.1. Degradación de las proteínas mediante el Sistema Ubiquitin-proteosoma (UPS)

La degradación de proteínas a través del UPS es un proceso complejo y estrictamente regulado que degrada numerosas proteínas intracelulares. La célula marca a las proteínas a degradar de manera altamente específica, mediante la fijación de una “etiqueta” de proteínas llamada ubiquitina. Este proceso implica una serie de etapas sucesivas (Reinstein, 2006; Rocha-Sosa, 2013).

2.4.1.1. Cascada de Ubiquitinación

El primer paso es la conjugación de varias moléculas de ubiquitina, catalizada por tres enzimas que actúan en conjunto: E1 (enzima de activación de ubiquitina), E2 (enzima de conjugación de ubiquitina) y E3 (ubiquitin-proteína ligasa específica al sustrato) (**Fig. 8**). Esta cascada de conjugación de Ub puede entonces repetirse múltiples veces hasta formar una cadena de poli-Ub (Reinstein, 2006; Rocha-Sosa, 2013).

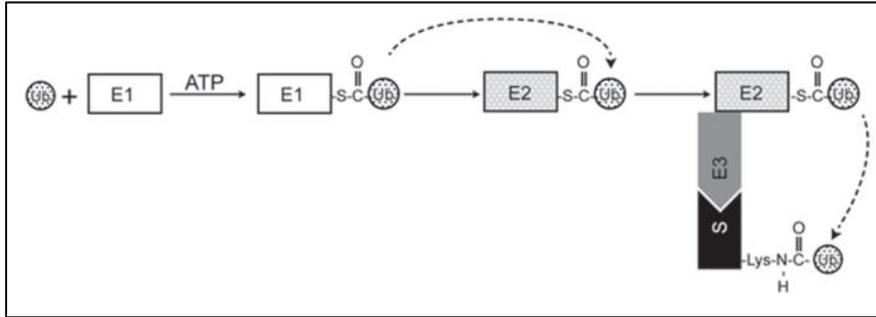


Figura 8. Cascada de Ubiquitinación (Rocha-Sosa, 2013). La Ub es unida al grupo -NH₂ de una lisina interna de las proteína blanco en una cascada de conjugación. 1) La Ub es activada por E1 en una reacción dependiente de ATP. 2) Una cisteína catalítica en E1 es usada para formar un intermediado Ub-S-E1 con un enlace tioéster de alta energía entre la cisteína y el grupo carboxilo de la glicina del C-terminal de la Ub. Mediante una reacción de *trans*-esterificación, el complejo Ub-S-E1 transfiere la Ub a la cisteína del sitio activo de E2. Finalmente, E2-S-Ub transfiere la Ub a la proteína sustrato (S) en una reacción facilitada por E3.

Existen tres clases principales de unión E3s: RING (Really Interesting New Gen), HECT (Homology to E6-Associated Carboxyl-Terminus) y la de tipo caja U (Figura 18b.). Además de sus características estructurales estas E3 se diferencian por el mecanismo de transferencia de Ub al sustrato (Rocha-Sosa, 2013).

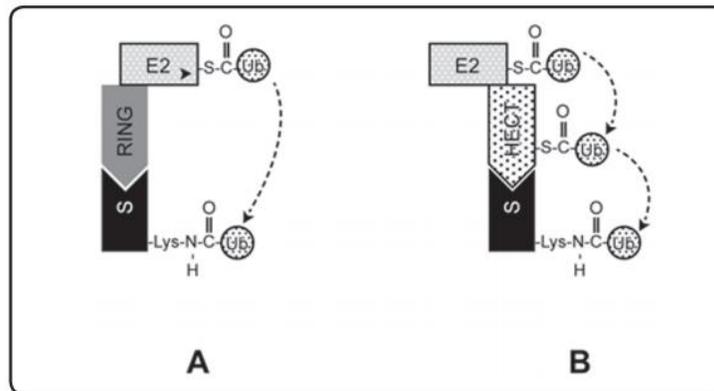


Figura 9. Diferentes formas de transferencia de Ub al sustrato. A. Tipo RING y tipo caja U. Sirven sólo como puentes para la transferencia de la Ub de E2 a proteína sustrato. B. Tipo HECT. Primero reciben a la Ub de E2 y posteriormente la transfieren a la proteína sustrato (Rocha-Sosa, 2013).

Un tipo de E3 clase RING lo conforman las llamadas multiméricas o también ligasas Culina-RING (CRLs por su nombre en inglés: Cullin-RING ligases). Éstas reciben este último nombre porque además de una proteína con dominio RING, poseen alguna de las diferentes culinas descritas. La culina es una especie de andamio que permite el ensamblaje del complejo E3 (Rocha-Sosa, 2013).

Existen distintos complejos CRLs formados, por al menos una proteína con el dominio RING, una culina y por una proteína adaptadora capaz de dar especificidad al complejo por un sustrato particular. El complejo BTB, antes mencionado, está formado por culina 3, una proteína adaptadora del tipo BTB/POZ y Rbx1 (Christians *et al.*, 2009; Rocha-Sosa, 2013).

Otro complejo CRL unido a E3 e involucrado con el UPS-Proteosoma 26S, es el denominado SCF y está constituido por cuatro proteínas: SKP1 (ASK1 en *Arabidopsis*), culina 1, una proteína con caja F y Rbx1 (la proteína con el dominio RING). La proteína con caja F es la adaptadora y por lo tanto, la responsable de reclutar a la proteína que será ubiquitinada. La función de la proteína SKP1 es de servir de puente entre culina 1 y la proteína con caja F (Rocha-Sosa, 2013).

2.4.1.2. Degradación del producto (proteína)

En seguida de la cascada de ubiquitinación, ocurre la degradación del sustrato marcado mediante el complejo proteosoma 26S, que reconoce únicamente las proteínas conjugadas con la ubiquitina, y las desintegra en pequeños péptidos liberando la ubiquitina que posteriormente puede reutilizarse. Para desdoblar y transportar a la proteína que será degradada se requiere energía proporcionada por el ATP (Adenosin trifosfato). Los péptidos derivados de este paso se degradan aún más en aminoácidos individuales por acción de proteasas citosólicas (**Fig. 10**).

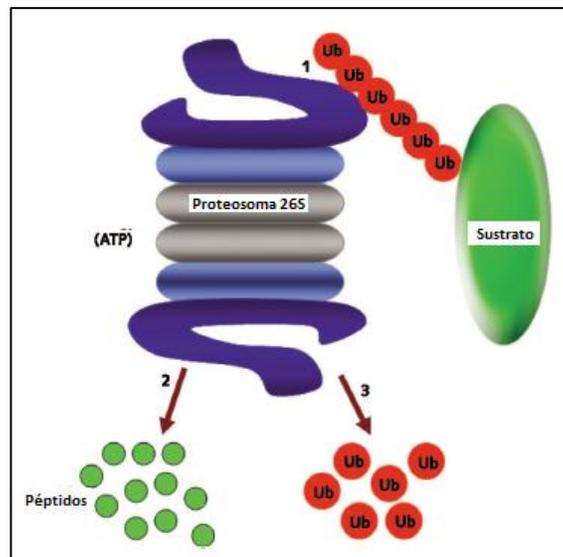


Figura 10. Degradación de la proteína en el proteosoma 26S.
Modificada de Reinstein 2006.

El proteasoma 26S es un enorme complejo que se localiza en el núcleo y el citoplasma de todas las células eucariontes y su estructura (**Fig. 11**) se encuentra altamente conservada entre estos. El proteasoma 26S está compuesto por dos subcomplejos: una partícula central 20S (CP) en donde se lleva a cabo la proteólisis, y una partícula reguladora 19S (RP) que prepara al sustrato para ser internado y degradado en la CP. La CP es una estructura con forma de barril compuesta por cuatro anillos heptaméricos apilados que forman una cámara proteolítica.

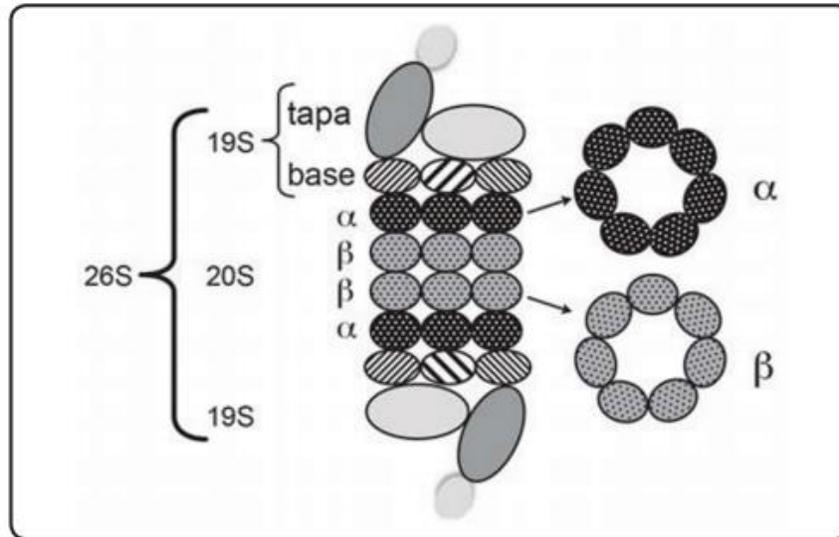


Figura 11. Estructura del Proteosoma 26S (Rocha-Sosa, 2013). El proteasoma 26S está formado por 2 subunidades 19S y una 20S. La subunidad 19S a su vez está formada por una base y una tapa. La subunidad 20S está formada por 4 anillos, los α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) y los internos 7. Las proteínas a degradar primero son desubiquitinadas y desdobladas por la subunidad 19S para posteriormente llegar a la cavidad central formada por los cuatro anillos de la subunidad 20S en donde son degradadas.

2.5. Transcriptoma y Proteoma

El producto inicial de la expresión del genoma se denomina transcriptoma y se refiere al conjunto de moléculas ARNm derivadas de los genes que codifican proteínas, cuya información biológica es requerida por la célula en un determinado momento. El segundo producto de la expresión del genoma es el proteoma y se define como el conjunto de proteínas presentes en una célula, tejido u órgano, en un estado de diferenciación, desarrollo y condiciones intra y extracelulares determinados que especifica el carácter de las reacciones bioquímicas que la célula puede llevar a cabo. A diferencia del genoma, el proteoma de un organismo es dinámico, con cambios espacio-temporales a lo largo de su ciclo vital. Las proteínas que forman el proteoma son sintetizadas por traducción de las moléculas individuales de ARN presentes en el transcriptoma (Mojica *et al.*, 2003; Brown, 2008; Pando & Ferreira, 2015).

2.6. Proteómica

Al estudio de los proteomas se denomina proteómica y es el conjunto de técnicas o tecnologías encaminadas a la obtención de información funcional de las proteínas, a través de la separación, identificación, caracterización y análisis proteico a gran escala para la caracterización del proteoma celular. Además define niveles celulares, funciones, interrelaciones y caminos metabólicos de las proteínas e investiga complejos de proteínas (Mojica *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2010).

La proteómica puede dividirse en dos ramas, la proteómica funcional, que se encarga del estudio de la función de proteínas dentro de sistemas biológicos (relaciona cambios de expresión con una función determinada) y la regulación de su expresión, incluyendo las interacciones proteína-proteína, proteínas-ADN, proteínas-ARN y las modificaciones post-traduccionales (Pando & Ferreira, 2015).

La segunda rama es la proteómica de expresión, que tiene como objetivo la descripción del proteoma total de un tejido, fluido, tipo celular u organelo y las mediciones cuantitativas de los niveles de expresión proteínica y las diferencias en el contenido proteico celular entre dos situaciones distintas. En un primer paso se separan las proteínas de un extracto complejo y luego se identifican las proteínas individuales con el objeto de determinar la “firma proteómica” o conjunto de proteínas cuya alteración de su expresión es característica de la respuesta a una condición definida o cambio genético. Esta firma proteómica se puede determinar por presencia/ ausencia de “spots” en los geles electroforéticos (Pando & Ferreira, 2015).

2.7. Electroforesis como técnica de separación de proteínas

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, donde las partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Los métodos electroforéticos sirven como método de separación de mezclas complejas de proteínas y otras biomoléculas para determinar parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (García, 2000; Yábar, 2003).

2.7.1. Electroforesis de una dimensión (1D)

La velocidad de migración electroforética de una molécula depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. Las biomacromoléculas poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas, así el pH influye sobre la velocidad de migración de éstas (García, 2000; Pláteník, 2009).

2.7.2. Electroforesis de dos dimensiones (2D)

Se le denomina electroforesis de dos dimensiones cuando, en una primera dirección, las proteínas se separan por isoelectroenfoque y posteriormente se resuelven en una segunda dimensión, perpendicular a la primera, según su masa molecular. Este procedimiento electroforético bidimensional permite separar en un único gel diversas proteínas, que pueden ser detectadas con reactivos de coloración por fluorescencia o radiomarcaje (García, 2000; Bañó *et al.*, 2007; Pláteník, 2009).

Cada proteína posee un pH isoelectrocaracterístico donde su carga neta es 0 y deja de desplazarse en el campo eléctrico; por debajo del punto isoelectrocaracterístico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrocaracterístico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo, esta separación se realiza por medio del isoelectroenfoque (IEF). El IEF se basa en la características de los aminoácidos como moléculas anfotéricas (cargas positivas y negativas). Las proteínas son separadas en un gradiente de pH y una diferencia potencial eléctrico (el ánodo (+), es ácido y el cátodo (-), es alcalino) hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero (forma zwitterion), lo que define su punto isoelectrocaracterístico (Abel, 2008; Santos, 2008; Pláteník, 2009).

La primera dimensión de la electroforesis de dos dimensiones consta de cuatro etapas, la rehidratación de la muestra, el isoelectroenfoque (IEF), el equilibrio de las tiras y la SDS-PAGE. En la rehidratación, la muestra debe ser resuspendida en un buffer que permita desnaturalizar y solubilizar las muestras de proteína y rehidratar las tiras IPG. El tampón contiene típicamente un agente desnaturalizante (urea o urea / tiourea), un agente reductor el cual abre y une los puentes disulfuro presentes y mantiene a las proteínas en estado reducido (DTT) y un agente solubilizante que ayuda a mantener las proteínas en solución durante la rehidratación y IEF. Como agentes solubilizantes se utilizan detergentes como CHAPS que permite la solubilización y agregación mediante interacciones hidrofóbicas, y acarreadores o anfólitos no iónicos o de ion híbrido (IPGs), que permiten unión a proteínas y facilitan su solubilización, minimizando la agregación con sus interacciones carga-carga (www.thermofisher.com).

3. ANTECEDENTES

En plantas medicinales y en plantas aromáticas, como es el caso de *Vanilla planifolia*, se han detectado subpoblaciones en una misma especie o población con variaciones en la composición y concentración típica de los principales metabolitos secundarios que determinan la calidad fitoquímica de sus individuos. Estas subpoblaciones son denominadas polimorfismos químicos o quimiotipos; los cuales son definidos como adaptaciones fitoquímicas locales que son genéticamente controladas y están relacionadas con la interacción de las especies con su hábitat. Salazar-Rojas y colaboradores en el 2011, estudiaron este polimorfismo químico de los cuatro fenoles principales presentes en el fruto de *Vanilla planifolia* (vainillina, ácido vainílico, p-hidroxibenzaldehído y ácido p-hidroxibenzoico) por análisis de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) en 25 colecciones de genotipo desconocido, que se cultivan en la región Totonacapan Puebla-Veracruz, México.

Basados en la concentración de dichos fitoquímicos, los autores distinguieron seis quimiotipos diferentes, algunos con características aromáticas silvestres (baja participación de vainillina), relacionados con el material menos cultivado en la región y quimiotipos domesticados con alta participación de vainillina. La existencia de estos seis grupos fitoquímicos para el germoplasma de *V. planifolia* fueron confirmados como grupos genéticos (genotipos) mediante el análisis de microsatélites. Así, los resultados muestran que la diversificación de los quimiotipos de *V. planifolia* no está relacionada con la variación ambiental.

El método más utilizado para la propagación de *V. planifolia* es mediante estacas, sin embargo, esta técnica puede causar lesiones a las plantas madre, por lo que, se ha propuesto como alternativa la regeneración y la multiplicación masiva *in vitro* a través de brotes y yemas axilares. Las plantas cultivadas son genotípicamente idénticas, pero la variación somaclonal puede ser inducida si la regeneración incluye cultivo de callos embriogénicos.

Palama y col. (2010) establecieron un protocolo nuevo para la regeneración de plantas de vainilla y estudiaron los mecanismos bioquímicos y moleculares iniciales que desencadenan el disparo de la organogénesis de callo embriogénico y protocormo. Mediante la aplicación de electroforesis bidimensional para la separación de proteínas y MALDI-TOF-TOF-MS se identificó varias proteínas cuya expresión difiere durante los primeros acontecimientos del disparo de la organogénesis. El análisis reveló que expresaron significativamente 15 "spots" de proteínas en las primeras etapas de la diferenciación de brotes. Con ayuda de la base de datos Swiss-Prot se pudieron encontrar algunas características supuestas de las proteínas como su nombre, el organismo de la planta donde la proteína fue identificada, el número de aminoácidos emparejados, el porcentaje de confianza, el porcentaje de identificación, la secuencia de los péptidos identificados y los valores de masa molecular experimental y teórica. Según este estudio, a mayoría de las proteínas encontradas están implicadas en el inicio de la fotosíntesis, la glucólisis y la síntesis de compuestos fenólicos; la síntesis de aminoácidos y proteínas, y la estabilización de proteínas; la degradación del azúcar y respuesta al estrés.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Realizar una comparación diferencial del proteoma expresado durante la abscisión de frutos en los genotipos CH I y CH VI de *Vanilla planifolia*, los cuales presentan comportamiento contrastante ante dicho proceso.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Caracterizar mediante el Peso Molecular relativo y punto isoeléctrico, algunas de las principales proteínas identificadas como expresadas diferencialmente durante el proceso de abscisión.
- 2) Identificar el patrón de expresión diferencial de proteínas relacionadas con la abscisión del fruto de *V. planifolia* en los genotipos CH I y CH VI.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Caracterización de las principales proteínas expresadas diferencialmente durante el proceso de abscisión del fruto de *V. planifolia*.

5.1.1. Material biológico

El presente estudio se realizó en dos genotipos de *V. planifolia* (CH I y CH VI), los cuales difieren de forma contrastante en comportamiento frente al fenómeno de caída prematura de fruto, variación genética y aromática (Salazar-Rojas *et al.*, 2012).

La colecta de material biológico se realizó en el mes de Junio de 2014. Los frutos fueron muestreados al momento de la expresión del fenómeno de caída de fruto (45 días); para la condición sin caída los frutos aún adheridos a la planta fueron colectados a los 45 días después de la polinización). Se etiquetaron y se introdujeron tanto en nitrógeno líquido como en la solución de preservación RNA later (QIAGEN) y transportados al laboratorio.

5.1.2. Extracción de ARN total y proteínas

Se emplearon 100 mg de tejido fresco de los individuos seleccionados al azar de cada genotipo, del tejido en la zona de abscisión del fruto (ZAF) (Fig. 12 y 13). La extracción de ARN total y proteínas se realizó mediante el Ensayo AllPrep (QIAGEN).

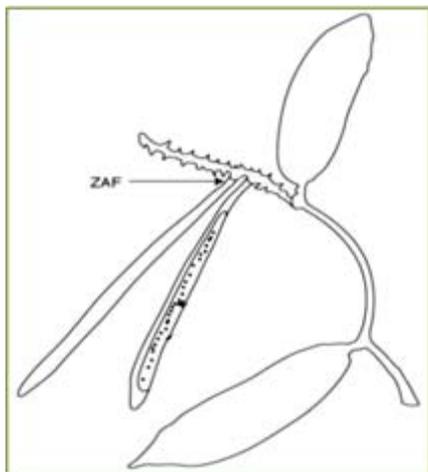


Figura 12. Tejido que se muestreará para el análisis transcriptómico de la abscisión prematura de frutos de *V. planifolia*: zona de abscisión del fruto (ZAF)



Figura 13. Fruto de *V. planifolia*.

5.1.3. Cuantificación de proteínas

La concentración proteica fue cuantificada a 562 nm mediante curvas de calibración con el Kit (Sigma) de Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando como estándar Albúmina de Suero Bovino (BSA).

5.1.4. Electroforesis unidimensional (1D)

La proteína obtenida de la extracción se visualizó por electroforesis (1D), en geles de acrilamida y condiciones desnaturizantes: 0.1% dodecil sulfato de sodio (SDS-PGE), la concentración de poliacrilamida en el gel separador fue del 10% y en el gel concentrador de 4% (Shagger & Von-Jagow, 1987). Se utilizaron marcadores de peso molecular de 15 - 175 kDa (PiNK Prestained Protein MarkerTM).

La corrida de electroforesis se realizó en una cámara BioRad Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (150 Volts, 90 mins). Para la tinción de geles se utilizó el método rápido de Coomassie (Phast Blue R 0.02%), 5 minutos a 90°C en agitación y desteñidos en solución desteñidora (de metanol, ácido acético y agua en relación 3:1:6), durante 5 minutos a 90°C en agitación (dos repeticiones) y 20 minutos a temperatura ambiente, en agitación. Posteriormente se tiñeron en plata con el kit SilverQuestTM Silver Staining (Life technology).

5.1.5. Electroforesis bidimensional (2D)

5.1.5.1. Primera dimensión

En esta dimensión se separan las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) por medio del isoelectroenfoque (IEF). El IEF se basa en las características de los aminoácidos como moléculas anfotéricas (cargas positivas y negativas). Las proteínas son separadas en un gradiente de pH y una diferencia potencial eléctrico (el ánodo (+), es ácido y el cátodo (-), es alcalino) hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero (forma zwitterion), lo que define su punto isoeléctrico (Abel, 2008; Santos, 2008; Pláteník, 2009). Para el IEF se utilizaron tiras de 7 cm (IPG strips) de amplio rango de pH continuo (3-10), las cuales se hidrataron en aceite mineral durante 24 h. La cantidad de muestra colocada en las tiras fue de 100 μ g de proteína, disuelta en 125 μ l de buffer de rehidratación. Las tiras fueron previamente embebidas en buffer de rehidratación. Se utilizó el equipo IPGphor 3, programado en los siguientes pasos:

- 1) 1 hora a 250 volts
- 2) 30 minutos a 500 volts
- 3) 30 minutos a 1000 volts
- 4) 2 horas a 8000 volts

Las tiras se equilibraron en un buffer de SDS, adicionado con 0.01 g/ml de DTT, posteriormente las tiras se reequilibraron en nuevo buffer SDS adicionado con 0.025 g/ml de iodoacetamina (IAA). Cada equilibrio se efectuó en agitación suave durante 15 minutos.

5.1.5.2. Segunda dimensión

En la segunda dimensión las proteínas se separan según su masa molecular aparente mediante electroforesis en presencia de SDS (Abel, 2008). Para esto se preparó un gel vertical de 80 x 90 x 1mm, en matriz de SDS- policacrilamida con una concentración de 10% (6.1 ml agua, 3.5 ml Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8; 140 μ l SDS 10% p/v; 4.2 ml acrilamida 30%; 50 μ l persulfato de amonio y 10 μ l TEMED). Se colocaron las tiras (IPG strips) anteriormente equilibradas, en forma horizontal sobre el gel SDS-PAGE al 10%. Se utilizaron 3 μ l de marcador de peso molecular (15 - 175 kDa) sobre papel filtro, en un extremo del gel SDS-PAGE al 10%. Este gel se selló, junto con la tira (IPG strip), con un tapón delgado de agarosa al 0.5% (**Fig. 14**).

La corrida de electroforesis se realizó en una cámara BioRad Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (150 Volts, 50 mins). Para la tinción de geles se utilizó el método rápido de Coomassie (Phast Blue R 0.02%), 5 minutos a 90°C en agitación y desteñidos en solución desteñidora (de metanol, ácido acético y agua en relación 3:1:6), durante 5 minutos a 90°C en agitación (dos repeticiones) y 20 minutos a temperatura ambiente, en agitación. Posteriormente se tiñeron en plata con el kit SilverQuest™ Silver Staining (Life technology). En este gel se visualizaron puntos, en los cuales coincidió el pI con el peso molecular relativo (PMr) de las diferentes proteínas.

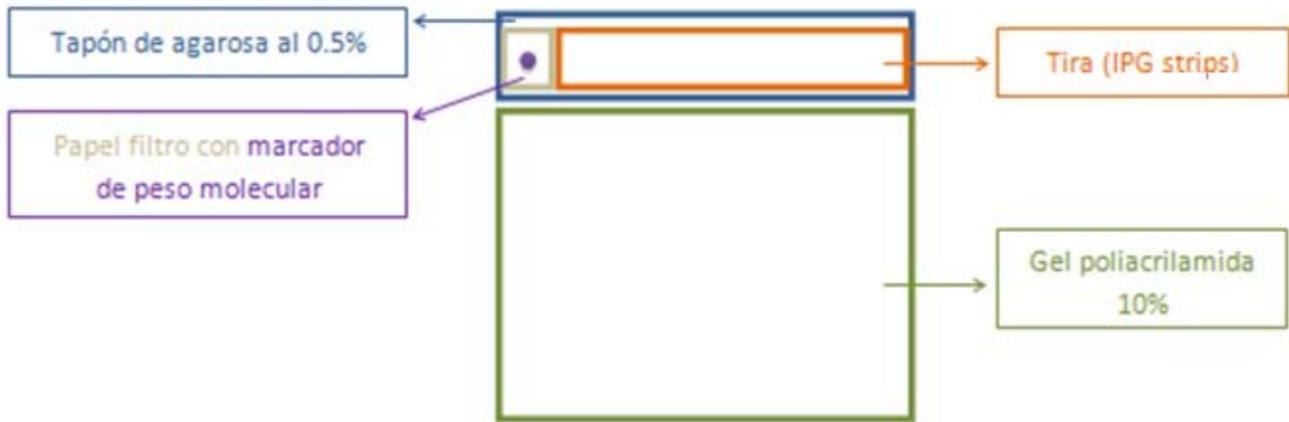


Figura 14. Electroforesis dimensional

La comparación de expresión de las proteínas se determinó por presencia/ ausencia de “spots” en los geles electroforéticos de segunda dimensión.

5.1.6. Determinación de Punto isoeléctrico (pI) y Peso Molecular relativo (PMr)

5.1.6.1. Punto isoeléctrico (pI)

Se obtuvo por interpolación de los puntos medidos en la graduación de la tira de pH (3-10), a escala en el gel 2D.

5.1.6.2. Peso Molecular relativo (PMr)

Se estimó a partir de una gráfica ($y=mx+b$) del logaritmo (\log_{10}) del Peso Molecular de los estándares (15 - 175 kDa) contra su movilidad relativa (R_f) en los geles 2D. El R_f es la relación entre la distancia de migración de la banda proteica y la longitud de corrida total del gel, o sea la distancia desde el borde superior del gel hasta el frente de corrida. La migración de los derivados proteína-SDS hacia al ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ($\log PM$) (García, 2000).

Al realizar un ploteo del $\log PM$ de la proteína patrón como función del valor de R_f , se obtuvo un gráfico ligeramente sigmoideo y el peso molecular desconocido se estimó por el análisis de regresión lineal o por interpolación en la curva del \log de PM contra R_f . A través de la ecuación $\log(PM)=m \times R_f+b$ (m =pendiente; b =ordenada al origen) se calculó el R_f de la proteína incógnita y se extrapoló en la curva el $\log (PM)$. Por último, el PM de proteína incógnita se obtuvo aplicando el antilogaritmo (García, 2000).

5.1.7. Búsqueda de proteínas en la Base de datos TagIdent (Swiss-Prot)

A partir de los geles de electroforesis, se eligieron las proteínas (“spots”) que se expresaban de manera diferencial, y con los valores de *pI* y de *PMr* obtenidos, se realizó una búsqueda empleando la herramienta TagIdent (<http://web.expasy.org/tagident/>), la cual es una base de datos de secuencias de proteínas que provee información de las proteínas como función, dominios, estructuras, entre otros (Bairoch & Apweiler, 2000). El servidor ExPASy (Expert Protein Analysis System) analiza secuencias de proteínas, estructuras y electroforesis 2 D PAGE. Para la búsqueda de datos se empleó la herramienta TagIdent, que despliega una lista de proteínas con su respectivo punto isoeléctrico y Peso Molecular aparente; identifica proteínas por apareamiento de secuencias cortas hasta 6 aminoácidos con proteínas registradas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL proporcionando el *pI* y el *PMr* y la posible identificación de proteínas por su masa (Gasteiger *et al.*, 2005).

De la lista desplegada por la herramienta TagIdent, se eligieron las proteínas relacionadas con la señalización y biosíntesis del etileno; exportación de auxinas y degradación de pared celular (incluyendo ubiquitinación), con un rango de 20%.

5.2. Identificación del patrón de expresión diferencial de las proteínas relacionadas con la abscisión del fruto de *V. planifolia*.

5.2.1. Búsqueda de secuencias de las proteínas en la Base de datos GenBank (NCBI)

Una vez obtenida la lista de posibles proteínas, se encontró la secuencia de cada una de ellas en el GenBank de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) y también se buscaron secuencias de estas mismas proteínas de la familia Orchidaceae a través del programa BLAST.

El Centro Nacional de Información Biotecnología (NCBI) fue creado para desarrollar sistemas de información en el campo de la biología molecular. Además del mantenimiento del GenBank, una base de datos de ácidos nucleicos, el NCBI provee análisis de datos y la recuperación y recursos para el análisis de datos e información. El conjunto de estos recursos puede agruparse en las categorías: sistema de bases de recuperación de datos; programas de búsqueda de similitud entre secuencias; recursos de secuencias cromosomales; análisis de la expresión génica y fenotipos; análisis del genoma a escala y herramientas de modelado y estructura de proteínas (Wheeler *et al.*, 2000).

La herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) encuentra regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con las bases de datos de secuencias y calcula la significación estadística de los alineamientos. También puede utilizarse para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para identificar a los miembros de las familias de genes (Wheeler *et al.*, 2000; www.ncbi.nlm.nih.gov). Los datos de expresión de las proteínas se analizaron y graficaron con el programa Excel.

5.2.2. Comparación de secuencias y de expresión de las proteínas mediante el Sistema Software Geneious

Otra herramienta importante en el estudio de la biología molecular es el programa Geneious, el cual es un motor de búsqueda multi-plataforma para la recuperación, organización y análisis de los datos. Con dicho sistema de software se pueden realizar funciones avanzadas, tales como el análisis filogenético y de restricciones de secuencias, acceso a bases de datos tales como NCBI, ya que combina todas las herramientas principales del análisis de la secuencia de la ADN y de proteínas (Kearse *et al.*, 2012; www.geneious.com). Este programa, mediante la herramienta “Align/Assamble; Map to reference” (Geneious, Versión 6.1.3, <http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012), se utilizó para comparar las secuencias obtenidas en el GenBank-NCBI con el transcriptoma de ambos genotipos, en ambas situaciones respectivamente (CH I sin abscisión, llamado **V1**; CH I con abscisión, **V3**; CH VI sin abscisión, denominado **V4** y CH VI con abscisión, **V2**).

El transcriptoma utilizado en este trabajo fue previamente secuenciado por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA del Instituto de BioTecnología, UNAM (UUSMD, IBT-UNAM) mediante Secuenciación Masiva de Última Generación (NGS). En este tipo de secuenciación, la ADN polimerasa cataliza la incorporación de desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTP) marcados a la hebra de ADN templado durante ciclos secuenciales de síntesis de ADN. Durante cada ciclo, en el momento de la incorporación, los nucleótidos son identificados por la excitación de fluoróforos (Illumina, 2015). A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, estas plataformas son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación en cuatro pasos básicos: preparación de la biblioteca, amplificación de “clusters”, secuenciación y alineamiento y análisis de datos (Illumina, 2015).

Para determinar si existe una expresión diferencial entre genotipos y entre condiciones, se calculó una relación del número de copias de las secuencias que se emparejaron a la secuencia de referencia respecto al otro genotipo o condición, según fuera el caso (el que presenta mayor número de secuencias/ el de menor número de secuencias). Así se pudo evidenciar cuantas veces se sobre-expresó un genoma respecto a otro. El criterio utilizado para determinar si existe una expresión diferencial fue a partir del 10% de disimilitud se consideró sobre-expresión. Las secuencias encontradas a través de BLAST de la familia Orchidaceae fueron tomadas como repeticiones de su secuencia homóloga.

5.2.3. Búsqueda de ubicación celular de las proteínas, en la Base de datos COMPARTMENTS

La información sobre la localización subcelular de las proteínas es importante para comprender las funciones celulares de éstas. Con el fin de obtener esta visión completa de la ubicación física de una proteína, es necesario consultar varias bases de datos y herramientas de predicción, una de ellas es COMPARTMENTS (<http://compartments.jensenlab.org/>). Este recurso integra los datos consultados de la literatura, otras bases de datos, así como los resultados de la extracción automática de texto (Binder *et al.*, 2014).

5.2.4. Búsqueda de localización de las proteínas en las vías metabólicas, en la Base de datos_KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

Para identificar las proteínas en las rutas metabólicas se utilizó la base de datos KEGG, sección KEGG PATHWAY Database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). KEGG es una base de datos para el análisis sistemático de las funciones los genes en términos de redes de genes y moléculas. El componente principal de KEGG es la base de datos PATHWAY, que consiste en diagramas gráficos de vías bioquímicas incluyendo la mayor parte de las rutas metabólicas conocidas y algunas otras de regulación. La información de las rutas es representada también en las tablas resumen de grupos de genes ortólogos y parálogos encontradas entre los diferentes organismos.

KEGG contiene la base de datos GENES (catálogos de genes de todos los organismos con genomas completos y algunos con genomas parciales) y la base de datos LIGAND de compuestos químicos y enzimas (Ogata *et al.*, 1999). Cada catálogo de genes se asocia con el mapa gráfico del genoma para su ubicación cromosómica. Además de la recolección de datos, KEGG desarrolla y proporciona diversas herramientas computacionales, como la reconstrucción de rutas bioquímicas de la secuencia completa del genoma y de la predicción de redes de genes de regulación de los perfiles de expresión génica (Ogata *et al.*, 1999).

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se caracterizaron las proteínas expresadas de forma diferencial durante el proceso de abscisión prematura de fruto de dos genotipos de *V. planifolia*, con características contrastantes en este proceso. Esta caracterización consistió en determinar tanto su peso molecular como su punto isoeléctrico, además de llevar a cabo una validación de esta información, comparando las proteínas identificadas con la información obtenida del análisis del transcriptoma de *V. planifolia* obtenido previamente.

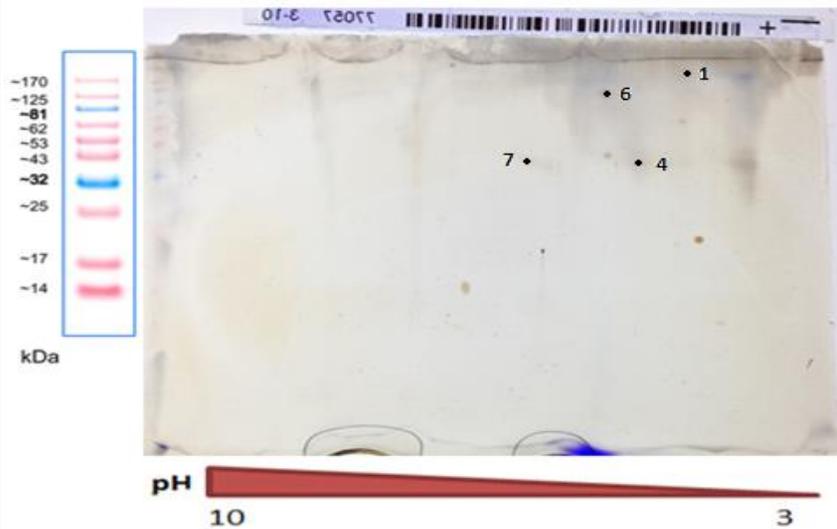


Figura 15. Proteínas con expresión diferencial ("Spots"), en genotipo CH I, visualizadas en geles de Electroforesis (2D-SDS-PAGE).

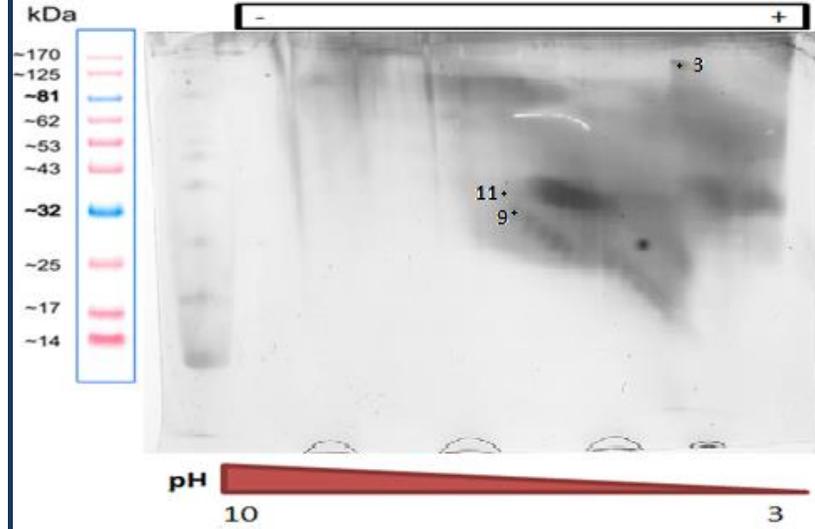


Figura 15b. Proteínas con expresión diferencial ("Spots"), en genotipo CH I, visualizadas en geles de Electroforesis (2D-SDS-PAGE).

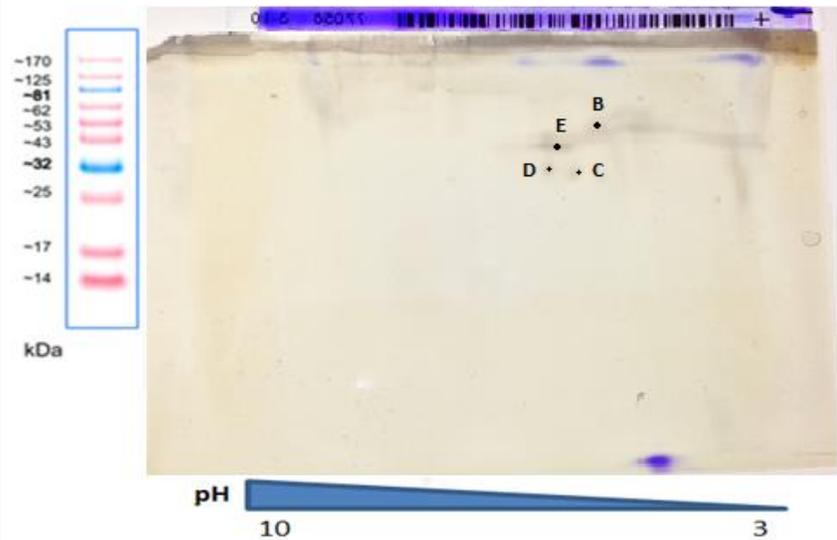


Figura 16. Proteínas con expresión diferencial ("Spots"), en genotipo CH VI, visualizadas en geles de Electroforesis (2D-SDS-PAGE).

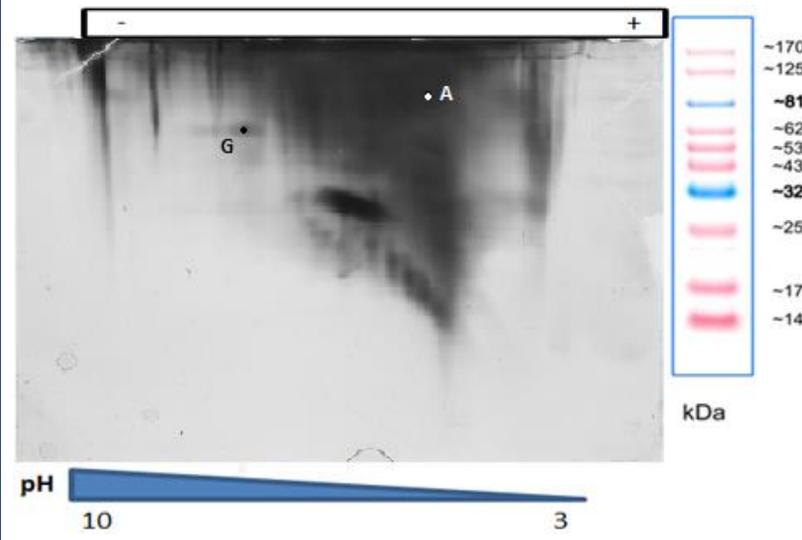


Figura 16b. Proteínas con expresión diferencial ("Spots"), en genotipo CH VI, visualizadas en geles de Electroforesis (2D-SDS-PAGE).

6.1. Caracterización de las principales proteínas expresadas diferencialmente durante el proceso de abscisión del fruto de *V. planifolia*.

6.1.1. Electroforesis bidimensional (2D)

Para obtener el Peso Molecular relativo y el punto isoelectrico de las proteínas, estas se visualizaron en geles de electroforesis 2D-SDS-PAGE. Los geles resultantes de dicha electroforesis mostraron una expresión diferencial de proteínas entre genotipos: Genotipo CH I: **Fig. 15 y 15b**; genotipo CH VI: **Fig. 16 y 16b**).

6.1.2. Valores de Punto isoelectrico (*pl*) y Peso Molecular relativo (*PMr*)

Los valores de *pl* y de *PMr* obtenidos a partir de las proteínas con expresión diferencial (“spots”) visualizadas en 2D-SDS-PAGE se muestran en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Valores de *pl* y de *PMr* de las proteínas con expresión diferencial, obtenidos a partir de los geles de electroforesis (2D-SDS-PAGE)

CH I				CH VI			
No.	<i>pl</i>	<i>PMr</i> (Da)	Rango (20%)	Letra	<i>pl</i>	<i>PMr</i> (Da)	Rango (20%)
1	4.3-4.7	130,517	10,4408 – 15,6612	A	4.5-5.4	19,000	15,200 – 22,800
2	4.3-4.7	171,000	136,800 – 20,5200	B	4.7-5.3	69,210	55,368 – 83,052
3	4-5	168,000	134,400 – 201,600				
4	5-5.5	3,7000	29,600 – 44,400	C	5.8-6.2	36,000	28,800 – 43,200
5	5-5.5	46,200	36,960 – 55,440				
6	5.6-6	10,3000	76,220 – 129,780	D	6.3-6.7	38,000	30,400 - 45,600
7	6.6-7.1	38,000	30,400 – 45,600				
8	6.6-7.1	48,240	38,592 – 57,888	E	6-6.8	47,000	37,600 - 56,400
9	6-6.5	20,000	16,000 – 24,000				
10	6-6.5	28,700	19,840 – 29,760	F	6-6.8	63,450	50,760 - 76,140
11	6.6-7.6	41,000	3,2800 – 4,9200	G	7.5-8.2	68,000	54,400 - 81,600

6.1.3. Búsqueda de proteínas en la Base de datos TagIdent (Swiss-Prot)

A partir de la lista anterior (**Cuadro 2**) se realizó la búsqueda de proteínas en la base de datos TagIdent, la cual arrojó alrededor de 660 proteínas relacionadas con el proceso de abscisión, de las cuales se eligieron 107 (sus valores de *pI* y de *PMr* más cercanos a los encontrados en la base de datos). De las 107 proteínas elegidas hubo 28 coincidencias en al menos un genotipo o en una condición (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Proteínas extraídas de TagIdent, relacionadas con el proceso de abscisión.

Señalización y Biosíntesis de Etileno									
No.	Proteína	Gen	<i>pI</i>	PM (Da)	No.	Proteína	Gen	<i>pI</i>	PM (Da)
1	AIL1 Factor de transcripción AIL1 de respuesta a Etileno, Tipo AP2	AIL1	6.59	47,133	9	ERS2 Sensor de respuesta a etileno 2	ERS2		72,192
2	AIL6 Factor de transcripción AIL6 de respuesta a Etileno, Tipo AP2	AP2-1	6.33	65,342	10	EIN4 Insensible a etileno 4	EIN4		86,250
3	ERF022 Factor de transcripción ERF022 de respuesta a Etileno	ERF022	5.16	21,086	11	ER4 Sensor de respuesta a etileno 4	ER4		63,789
4	ERF038 Factor de transcripción ERF038 de respuesta a etileno	ERF038	6.22	21,617	12	EIL Proteína tipo Insensible a etileno 3 (EIN3)	EIL1		68,333
5	RAP2-7 Factor de transcripción RAP2-7 de respuesta a etileno	RAP2-7	6.77	49,429	13	EIN3 Insensible a etileno 3	EIN3		71,421
6	RAP2-13 Factor de transcripción RAP2-13 de respuesta a etileno	RAP2-13	6.00	29,138	14	ACO1 ACC oxidasa/ Aminociclopropano carboxilato oxidasa	CyACO1		36,652
7	ETR1 Receptor de etileno 1	ETR1		82,566	15	ACO3 ACC oxidasa 3/ Aminociclopropano carboxilato oxidasa 3	EFE	5.09	36,532
8	ERS1 Sensor de respuesta a etileno	ERS1		68,333	16	MTN2 5'-metiltioadenosin/S-adenosilhomocistein nucleosidasa 2	MTN2		27,462

Cuadro 3. CONTINUACIÓN. Proteínas extraídas de TagIdent, relacionadas con el proceso de abscisión.

Auxina					Degradación de proteínas				
No.	Proteína	Gen	<i>pl</i>	PM (Da)	No.	Proteína	Gen	<i>pl</i>	PM (Da)
17	ARF6 Factor de respuesta a auxina	ARF6	5.97	103,057	19	ETO1 Proteína de sobre producción de etileno 1	ETO1		107,040
18	IAA30 Proteína sensible a auxina	IAA30	4.65	19,238	20	UBLCP1 Ubiquitina con dominio Tipo CDT fosfatasa		6.35	38,956
					21	UPE3 Probable Ubiquitin-protein ligasa E3		6.24	47,143
Degradación de pared celular					Síntesis de lignina				
No.	Proteína	Gen	<i>pl</i>	PM (Da)	No.	Proteína	Gen	<i>pl</i>	PM (Da)
22	β GLU46 Beta glucosidasa 46	BGLU46	6.63	43,479	26	OMT3 O-metiltransferasa- 3	OMT-3		38,596
23	HGL1 Heteroglicano glucosidasa 1	At3g23640	5.72	107,456					
24	MPZ Metaloproteasa dependiente de zinc FTSH4, mitocondrial	FTSH4	7.71	73,934	Metabolismo basal				
25	XTH3 Xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa 3	XTH3	6.00	30,702	No.	Proteína	Gen	<i>pl</i>	PM (Da)
					27	<i>rbcl</i> Subunidad mayor de la enzima RuBisCO	<i>rbcl</i>		
					28	Actividad total del Cloroplasto	---		

6.2. Identificación del patrón de expresión diferencial de las proteínas relacionadas con la abscisión del fruto de *V. planifolia*.

6.2.1 Comparación de secuencias y de expresión de las proteínas mediante el Sistema Software Geneious

Posteriormente, las secuencias de estas proteínas fueron comparadas con el transcriptoma de ambos genotipos, en ambas condiciones y se realizaron las siguientes comparaciones para su posterior análisis.

6.2.1.1. Expresión total de las proteínas por genotipos (total de CH I respecto al total de CH VI)

Para determinar esta expresión se sumó el número de secuencias emparejadas por proteína en CH I (sin y con abscisión) y se comparó con la suma de secuencias emparejadas de CH VI sin y con abscisión. De todas las proteínas analizadas, las que presentaron la mayor expresión total, es decir, alta expresión en ambos genotipos fueron: **RAP2-13, ACO1, ERS1, EIN3** y **EIL1**. La **Figura 17** nos muestra el número total de secuencias empatadas por genotipo, lo que nos da una visión general de la expresión total de las proteínas sin considerar la diferencia de expresión en las dos diferentes condiciones (con y sin abscisión) y será tomado en cuenta para discusión sólo en algunas proteínas. En su lugar, para analizar la expresión diferencial del proceso de abscisión, se tomarán en cuenta las **Fig. 18, 19 y 20**.

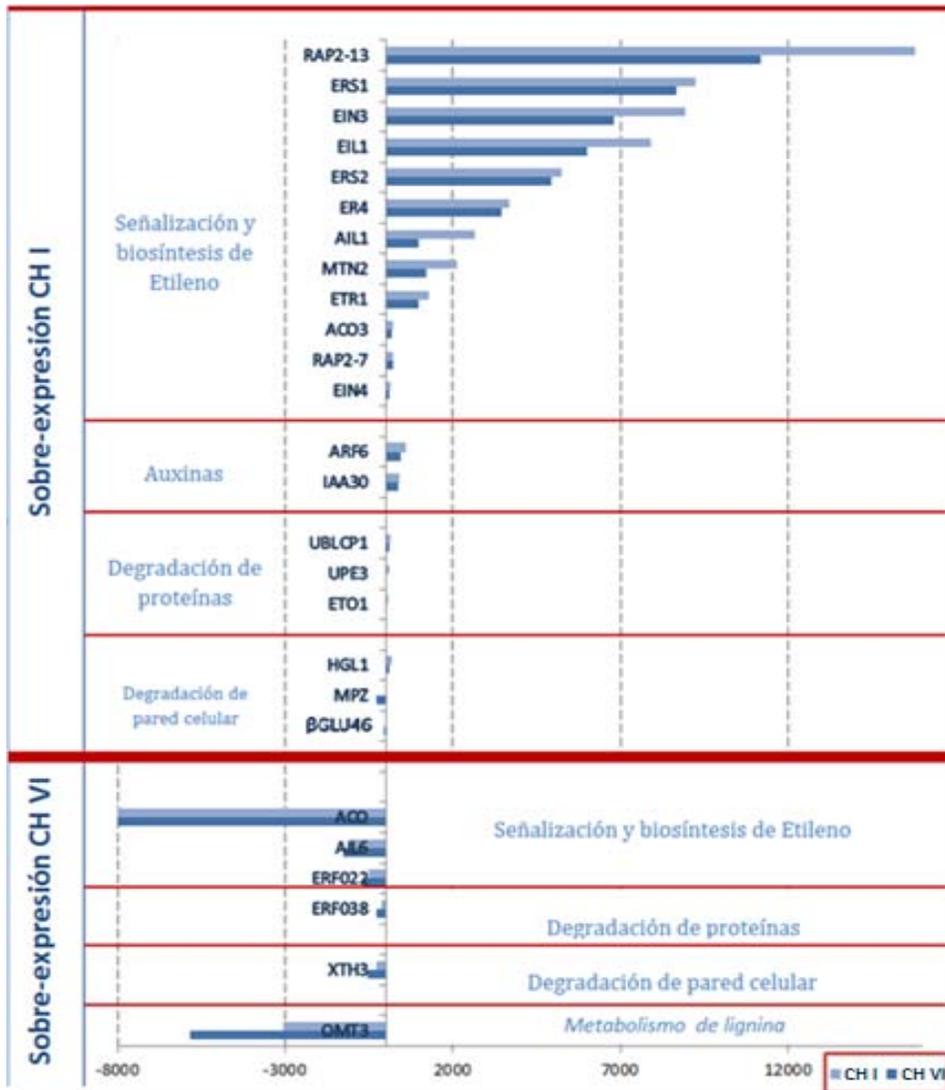


Figura 17. Expresión total de las proteínas por genotipos. Las proteínas que presentaron mayor expresión en CH I se muestran arriba a la derecha mientras que las proteínas que presentaron mayor expresión en CH VI se muestran abajo a la izquierda. Cada barra representa un genotipo, CH I: barra clara; CH VI: barra oscura. **RAP2-13:** Factor de transcripción RAP2-13 de respuesta a etileno; **ERS1:** Sensor de respuesta a etileno 1; **EIN3:** Insensible a etileno 3; **EIL1:** Proteína tipo EIN3; **ERS2:** Sensor de respuesta a etileno 2; **ER4:** Sensor de respuesta a etileno 4; **AIL1:** Factor de transcripción AIL1 de respuesta a Etileno, Tipo AP2; **MTN2:** 5'-metiltioadenosin/S-adenosilhomocistein nucleosidasa 2; **ETR1:** Receptor de etileno 1; **ACO3:** Aminociclopropanocarboxilato oxidasa 3; **FRAP2-7:** Factor de transcripción RAP2-7 de respuesta a etileno; **EIN4:** Insensible a etileno 4; **ETO1:** Proteína de sobre producción de etileno 1; **ARF6:** Factor de respuesta a auxina; **IAA30:** Proteína sensible a auxina; **UBLCTD1:** Fosfatasa tipo Ubiquitina dominio CTD; **UPE3:** Probable Ubiquitin-protein ligasa E3; **HG1:** Heteroglucano glucosidasa 1; **MPZ:** Metaloproteasa dependiente de zinc FTSH 4, mitocondrial; **βGLU46:** Beta glucosidasa 46; **ACO:** Aminoácido oxidasa 46; **ERF022:** Factor de transcripción ERF022 de respuesta a Etileno, Tipo AP2; **ERF038:** Factor de transcripción ERF038 de respuesta a etileno; **XTH3:** Xiloglucano endotransglucosilasa/ hidrolasa 3; **OMT3:** O-metiltransferasa-3.

Con el número de secuencias que coincidieron, también se calculó la relación de la expresión entre genotipos. La relación calculada expresa el número de veces que la proteína está sobre-expresada en un genotipo respecto al otro (**Cuadro 4 y 5**).

Cuadro 4. Proteínas sobre expresadas en el genotipo CH I, respecto a CH VI. Se presenta el número de lecturas (“reads”) de las secuencias que coincidieron con la secuencia referencia. Entre paréntesis se presentan los géneros a los cuales corresponden las secuencias referencia; los asteriscos (*) indican aquellos géneros pertenecientes a la familia Orchidaceae. La relación expresa el número de veces que la proteína se sobre-expresó en CH I respecto a CH VI (Columna Relación CHI/CHVI).

Señalización y Biosíntesis de Etileno							
No.	Proteína	Género	V1 CHI sin abscisión	V3 CHI con abscisión	V4 CHVI sin abscisión	V2 CHVI con abscisión	Relación CHI/CHVI
1	AIL1	(<i>Morus</i>)	208	171	76	90	2.76
		(<i>Erythranthe</i>)	1,257	1,028	262	537	
5	RAP2-7	*(<i>Erycina</i>)	110	85	49	126	1.11
		(<i>Brassica</i>)	27	0	25	0	
6	RAP2-13	*(<i>Cymbidium</i>)	8,234	7,559	5,403	5,774	1.41
10	EIN4	(<i>Coffea</i>)	68	63	48	51	1.32
12	EIL1	*(<i>Oncidium</i>)	2,813	2,476	1,938	2,055	1.31
		(<i>Nicotiana</i>)	1,650	946	731	1,258	
13	EIN3	*(<i>Phalaenopsis</i>)	4,341	4,049	2,939	3,438	1.31
		(<i>Nicotiana</i>)	525	0	0	421	
15	ACO3	(<i>Arabidopsis</i>)	130	97	74	120	1.17
16	MTN2	(<i>Morus</i>)	1,207	923	486	724	1.76
Auxina							
18	ARF6	(<i>Arabidopsis</i>)	322	281	224	233	1.31
Degradación de proteínas							
21	UBLCP1	(<i>Arabidopsis</i>)	86	57	72	56	1.39
22	UPE3	(<i>Arabidopsis</i>)	96	0	0	0	96.00
19	ETO1	(<i>Arabidopsis</i>)	37	22	14	24	1.55
Proteínas degradadoras de pared celular							
24	HGL1	(<i>Arabidopsis</i>)	102	66	83	31	1.90

Cuadro 5. Proteínas sobre expresadas en el genotipo CH VI, respecto a CH I. Se presenta el número de lecturas (“reads”) de las secuencias que coincidieron con la secuencia referencia. Los géneros a los cuales corresponden las secuencias referencia se anotan entre paréntesis; los asteriscos (*) indican aquellos géneros pertenecientes a la familia Orchidaceae. La relación expresa el número de veces que la proteína se sobre-expresó en CH VI respecto a CH I (Columna Relación CHVI/CHI).

Señalización y Biosíntesis de Etileno							
No.	Proteína	Género	V1 CHI sin abscisión	V3 CHI con abscisión	V4 CHVI sin abscisión	V2 CHVI con abscisión	Relación CHVI/CHI
2	AIL6	*(<i>Erycina</i>) (<i>Arabidopsis</i>)	685 0	0 404	450 45	541 229	1.16
3	ERF022	(<i>Vitis</i>)	379	142	269	427	1.33
4	ERF038	(<i>Elaeis</i>)	75	39	220	43	2.30
Proteínas degradadoras de pared celular							
25	XTH3	(<i>Arabidopsis</i>)	153	107	226	327	2.12
Metabolismo de lignina							
26	OMT3	<i>Vanilla planifolia</i>	1,634	1,402	1,699	4,140	1.92

Derivado de este primer análisis, se observó que algunas proteínas presentaban mayores valores de expresión en condiciones de abscisión respecto a la condición normal (sin abscisión) por lo que se analizaron de manera separada en la sección **6.3.2.3**.

6.2.1.2. Expresión diferencial de ambas situaciones en un mismo genotipo (CH I sin abscisión respecto a CH I con abscisión y CH VI sin abscisión respecto a CH VI con abscisión)

Otro valor que se obtuvo con el número de secuencias emparejadas fue la relación de la expresión entre condiciones en un mismo genotipo. La relación calculada indica la diferencia de expresión de cada genotipo entre ambas situaciones (sin y con abscisión) (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Expresión de las proteínas en relación al proceso de abscisión por genotipo. Los géneros a los cuales corresponden las secuencias referencia se anotan entre paréntesis., los asteriscos (*) indican aquellos géneros pertenecientes a la familia Orchidaceae. La relación expresa el número de veces que la proteína está sobre-expresada en el proceso de abscisión en un mismo genotipo (columnas Relación CHI y Relación CHVI El signo negativo (-) significa que se redujo la expresión de la proteína durante la abscisión y el signo positivo (+) que hubo un aumento de expresión durante dicho proceso.

Señalización y Biosíntesis de Etileno								
No.	Proteína	Género	V1 CHI sin abscisión	V3 CHI con abscisión	V4 CHVI sin abscisión	V2 CHVI con abscisión	Relación CHI	Relación CHVI
1	AIL1	(<i>Morus</i>) (<i>Erythranthe</i>)	208 1,257	171 1,028	76 262	90 537	-1.22	+1.85
2	AIL6	*(<i>Erycina</i>) (<i>Arabidopsis</i>)	685 0	541 229	0 404	450 45	-1.69	+1.55
3	ERF022	(<i>Vitis</i>)	379	427	142	269	-2.66	+1.58
4	ERF038	(<i>Elaeis</i>)	75	43	39	220	-1.92	-5.11
5	RAP2-7	*(<i>Erycina</i>) (<i>Brassica</i>)	110 27	85 0	49 25	126 0	-1.29	+1.70
6	RAP2-13	*(<i>Cymbidium</i>)	8,234	7,559	5,403	5,774	-1.08	+1.06
10	EIN4	(<i>Coffea</i>)	68	63	48	51	+1.07	-1.06
12	EIL1	*(<i>Oncidium</i>) (<i>Nicotiana</i>)	2,813 1,650	2,476 946	1,938 731	2,055 1,258	-1.30	+1.24
13	EIN3	*(<i>Phalaenopsis</i>) (<i>Nicotiana</i>)	4,341 525	4,049 0	2,939 0	3,438 421	-1.20	+1.31
15	ACO3	(<i>Arabidopsis</i>)	130	97	74	120	-1.34	+1.62
16	MTN2	(<i>Morus</i>)	1,207	923	486	724	-1.30	+1.48
Auxina								
17	ARF6	(<i>Arabidopsis</i>)	322	281	224	233	-1.14	+1.04

Cuadro 6. CONTINUACIÓN. Expresión de las proteínas en relación al proceso de abscisión por genotipo. Los géneros a los cuales corresponden las secuencias referencia se anotan entre paréntesis; los asteriscos (*) indican aquellos géneros pertenecientes a la familia Orchidaceae. La relación expresa el número de veces que la proteína está sobre expresada en el proceso de abscisión en un mismo genotipo (columnas Relación CHI y Relación CHVI) El signo negativo (-) significa que se redujo la expresión de la proteína durante la abscisión y el signo positivo (+) que hubo un aumento de expresión durante dicho proceso.

Degradación de proteínas								
No.	Proteína	Género	V1 CHI sin abscisión	V3 CHI con abscisión	V4 CHVI sin abscisión	V2 CHVI con abscisión	Relación CHI	Relación CHVI
19	ETO1	(<i>Arabidopsis</i>)	37	22	14	24	-1.68	+1.71
20	UBLCP1	(<i>Arabidopsis</i>)	86	57	72	56	+1.19	+1.01
21	UPE3	(<i>Arabidopsis</i>)	96	0	0	0	-96.00	---
Proteínas degradadoras de pared celular								
23	HGL1	(<i>Arabidopsis</i>)	102	66	83	31	-1.22	+2.12
25	XTH3	<i>Arabidopsis</i>)	153	327	107	226	-1.42	+1.44
Metabolismo de lignina								
26	OMT-3	<i>Vanilla planifolia</i>	1,634	4,140	1,402	1,699	-1.16	+2.43

Aunque el genotipo CH I presentó mayor número total de expresión de proteínas y con mayor cantidad respecto a CHVI (Ver Fig. 17, Cuadros 4 y 5), si comparamos la expresión de estas proteínas en las dos situaciones de un mismo genotipo (Ver Cuadro 6), podemos apreciar que en CH I disminuye la expresión de proteínas durante el proceso de abscisión (Ver Fig. 18 y 19, barras: azul y rojo), mientras que en CH VI aumenta (Ver Fig. 18 y 19, barras: morado y verde). Esto sucede en todas las proteínas exceptuando **ERF038**, **EIN4**, **UBLCP1** y **UPE3** y las estudiadas en la **sección 6.2.2.3.**, lo puede atribuirse a la función de estas proteínas que a continuación se discutirá. Los siguientes gráficos muestran el número de secuencias expresadas en cada genotipo en ambas condiciones; en otras palabras es una comparación de un mismo genotipo en presencia y ausencia de abscisión.

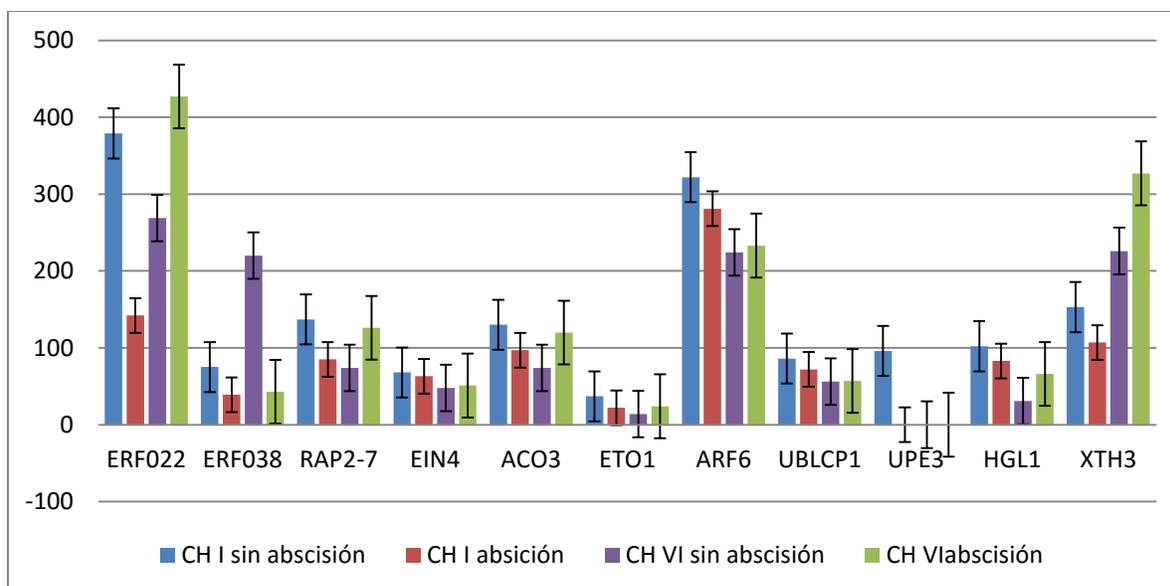


Fig. 18. Número de secuencias expresadas en cada genotipo en ambas condiciones. Proteínas que presentaron de 10-430 secuencias emparejadas. Se muestran además las barras de error típico. **ERF022:** Factor de transcripción ERF022 de respuesta a Etileno; **ERF038:** Factor de transcripción ERF038 de respuesta a etileno; **RAP2-7:** Factor de transcripción RAP2-7 de respuesta a etileno; **EIN4:** Insensible a etileno EIN4; **ACO3:** Aminociclopropanocarboxilato oxidasa 3; **ETO1:** Proteína de sobre producción de etileno 1; **ARF6:** Factor de respuesta a auxina; **UBLCP1:** Fosfatasa tipo Ubiquitina dominio CTD; **UPE3:** Probable Ubiquitin-protein ligasa E3; **HGL1:** Heteroglucano glucosidasa 1; **XTH3:** Xiloglucano endotransglucosilasa/ hidrolasa 3.

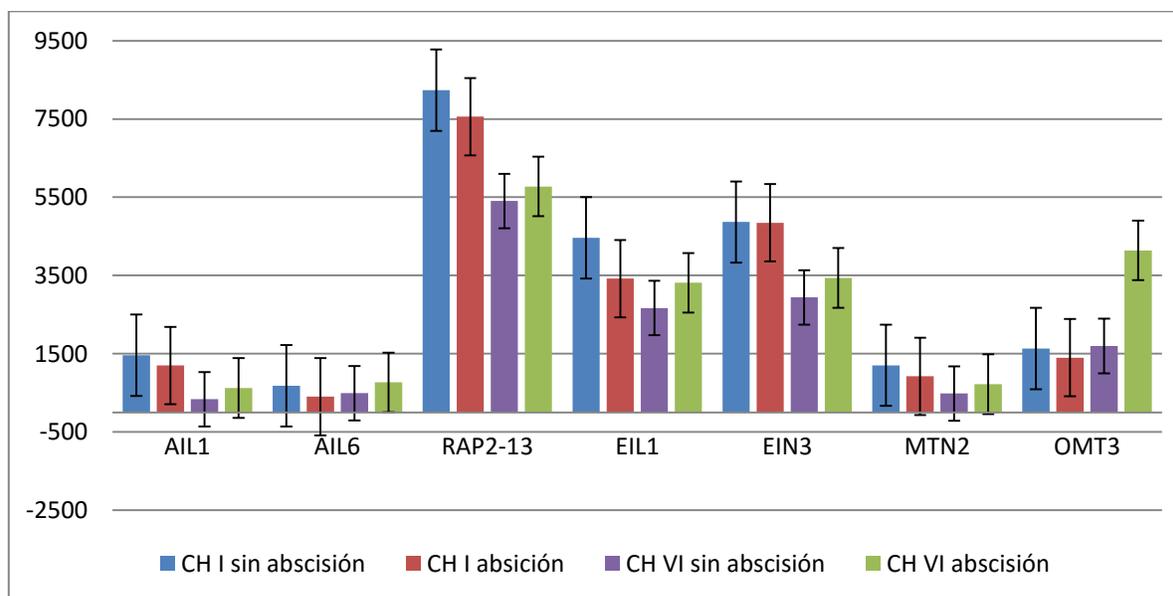


Fig. 19. Número de secuencias expresadas en cada genotipo en ambas condiciones. Proteínas que presentaron de 330- 8,240 secuencias emparejadas. Se muestran además las barras de error típico. **AIL1:** Factor de transcripción AIL1 de respuesta a Etileno, Tipo AP2; **AIL6:** Factor de transcripción AIL6 de respuesta a Etileno, Tipo AP2; **RAP2-13:** Factor de transcripción RAP2-13 de respuesta a etileno; **EIL1:** Proteína tipo EIN3; **EIN3:** Insensible a etileno 3; **MTN2:** 5'-metiltoadenosin/S-adenosilhomocistein nucleosidasa 2; **OMT3:** O-metiltransferasa- 3.

6.2.1.3. Expresión diferencial de CH I y CH VI sin abscisión, comparada con CH I y CH VI en presencia de abscisión

De los análisis anteriores, surgió otro grupo de proteínas, las cuales presentan mayor expresión en la condición de abscisión, es decir, ambos genotipos presentaron aumento en su expresión en condición de abscisión (**Ver Cuadro 7**).

Cuadro 7. Proteínas que presentan mayor expresión en ambos genotipos bajo la condición de abscisión.

V1: CH I sin abscisión; **V2:** CH VI con abscisión; **V3:** CH I con abscisión; y **V4:** CH VI sin abscisión. La relación V2+V3/V1+V4 indica el número de veces que se sobre expresa la proteína en el proceso de abscisión, es la suma de ambos genotipos con abscisión entre la suma de su condición normal. Las columnas V2/V3 y V3/V2 muestran la relación entre los dos genotipos y muestran en cuál hay una mayor expresión.

Señalización y Biosíntesis de Etileno									
#	Proteína	Género	V1 CHI sin abscisión	V3 CHI con abscisión	V2 CHVI con abscisión	V4 CHVI sin abscisión	Relación V2+V3/V1+V4	Relación V2/V3 (Mayor en CHVI)	Relación V3/V2 (Mayor en CHI)
7	ETR1	<i>(Arabidopsis)</i>	286	438	369	297	1.59		1.08
		<i>*(Dendrobium)</i>	288	286	300	0			
8	ERS1	<i>*(Phalaenopsis)</i>	1,629	1,645	1,834	1,554	1.17	1.07	
		<i>(Persea)</i>	897	1,163	1,133	742			
		<i>*(Dendrobium)</i>	1,800	1,785	1,959	1,446			
9	ERS2	<i>*(Oncidium hyb)</i>	1,949	2,037	2,235	1,346	1.31	1.13	
		<i>(Pyrus pyrifolia)</i>	570	673	842	528			
11	ER4	<i>*(Oncidium cv)</i>	1,788	1,885	2,036	1,422	1.22	1.08	
14	ACO1	<i>*(Cymbidium hyb)</i>	5,558	7,120	9,548	3,543	1.83	1.34	
Auxina									
18	IAA30	<i>(Arabidopsis)</i>	200	225	214	171	1.18		1.05
Proteínas degradadoras de pared celular									
22	βGLU46	<i>*(Oncidium hyb)</i>	0	0	17	12	1.41	29.00	
		<i>(Arabidopsis)</i>	0	0	0	0			
24	MPZ	<i>(Arabidopsis)</i>	0	0	259	0	259		259.00

En la **Figura 20**, al comparar la expresión en los genotipos sin abscisión respecto a la condición contraria (**barra azul respecto a la roja y barra morada respecto a la verde**), podemos observar un aumento en la condición de abscisión en ambos genotipos (**barra roja y verde**).

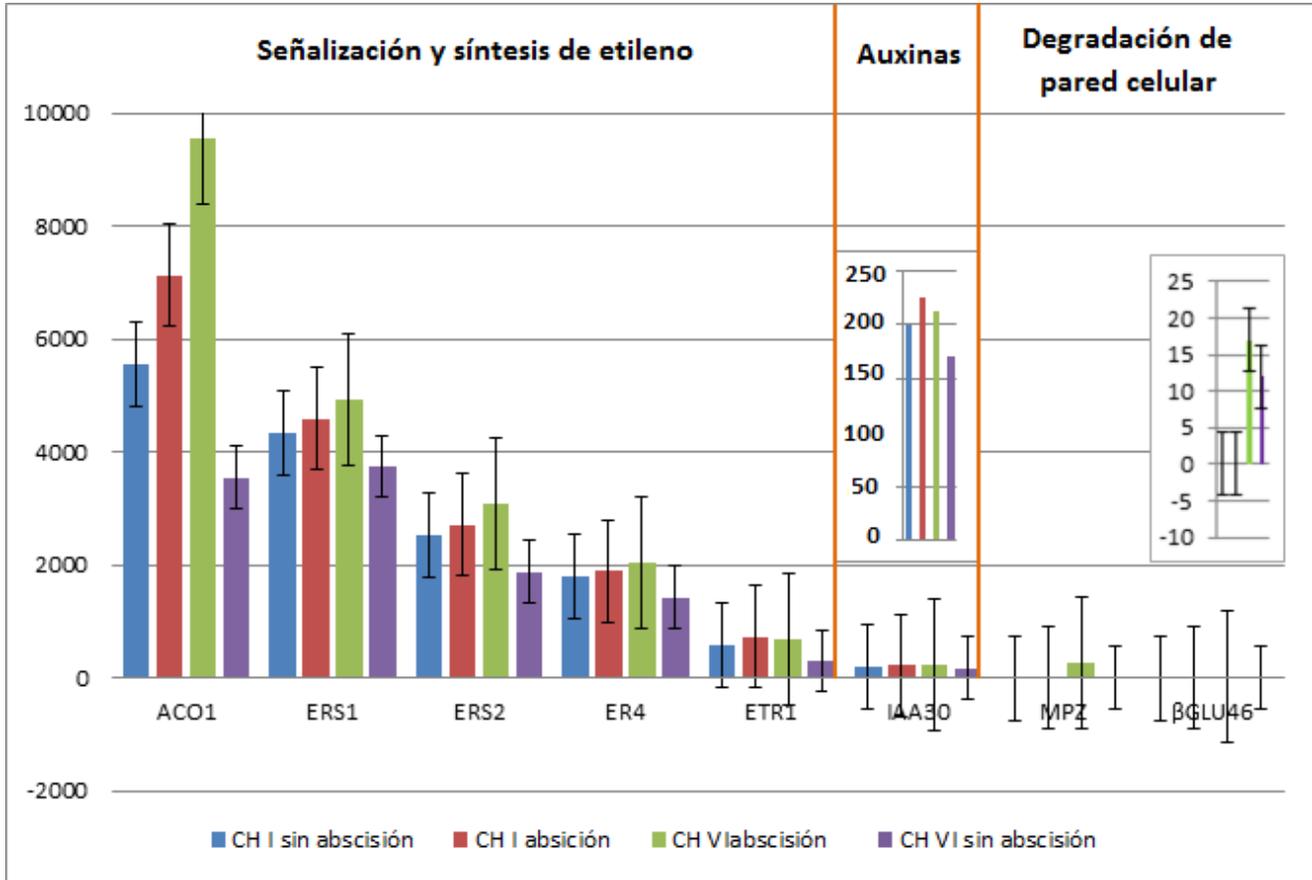


Figura 20. Proteínas que presentan mayor expresión en ambos genotipos bajo la condición de abscisión.

Se muestran las barras de error típico. **ACO**: Aminociclopropanocarboxilato oxidasa; **ERS1**: Sensor de respuesta a etileno 1; **ERS2**: Sensor de respuesta a etileno 2; **ER4**: Sensor de respuesta a etileno 4; **ETR1**: Receptor de etileno **IAA30**: Proteína sensible a auxina **MPZ**: Metaloproteasa dependiente de zinc FTSH 4, mitocondrial; **βGLU46**: Beta glucosidasa 46- Al tener valores muy pequeños para la escala del gráfico principal, sobre este se incluyó uno de β-G46.

6.2.1.4. Ubicación celular de algunas de las proteínas expresadas en el fruto de *V. planifolia* durante el proceso de abscisión

Con ayuda de la herramienta COMPARTMENTS (<http://compartments.jensenlab.org/Search>), se obtuvo la ubicación física de las proteínas en la célula (**Fig. 22**) y los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía (**Fig.7**) (Kushad *et al.*, 1985; Raven *et al.*, 1992; Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006; Lin *et al.*, 2009; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012; Ju & Chang, 2012; NCBI, 2015).

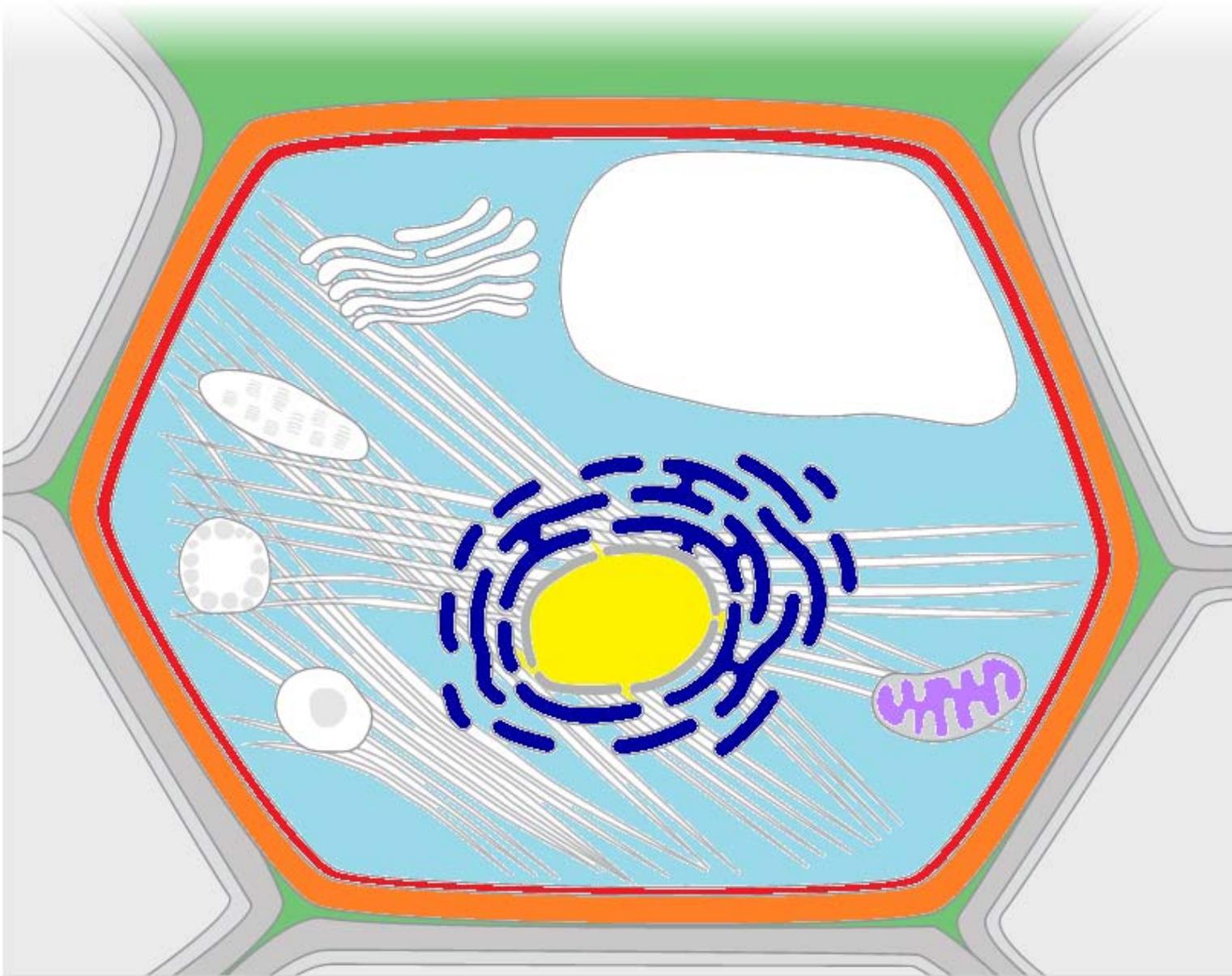


Figura 21. Ubicación celular de algunas de las proteínas expresadas en el fruto de *V. planifolia* durante el proceso de abscisión. **NUCLEO** (amarillo): ERS2, AIL1, EIL1, AIL6, ERF022, ERF038, RAP2-7, RAP2-13, ARF6, IAA30, UBLCP1, UPE3. **RETÍCULO ENDOPLÁSMICO** (azul oscuro): ETR1, ERS1, EIN4, ERS2, EIN3. **MITOCONDRIA** (lila): MPZ. **CITOSOL** (azul claro): UPE3, Bglu46. **MEMBRANA CELULAR** (rojo): ETR1, ETO1. **PARED CELULAR** (anaranjado): ETR1, XTH3. **APOPLASTO/ESPACIO INTERCELULAR** (verde): XTH3.

6.2.1.5. Función de las proteínas encontradas en relación al proceso de abscisión y su localización en las vías metabólicas

Entre las proteínas estudiadas algunas están involucradas en la señalización y biosíntesis de etileno, y otras están relacionadas con las auxinas, la degradación de pared celular o la biosíntesis de lignina. Cabe destacar que en el presente estudio se trabajó a partir de proteínas visualizadas en geles electroforéticos, las secuencias de estas posibles proteínas fueron comparadas con el transcriptoma de dos genotipos de *Vanilla planifolia* en las dos condiciones antes mencionadas.

Mediante la herramienta KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>), se localizaron dentro de las rutas metabólicas, algunas de estas proteínas. De manera general, la distribución de estas en las vías bioquímicas coincide con la literatura.

Señalización y biosíntesis del etileno

1) Receptores de etileno

Los receptores **ERS1** y **ETR1** tienen un papel preponderante en el control de las respuestas de etileno. El **ERS1** es un receptor y regulador negativo de etileno; estos receptores reprimen las respuestas de etileno en ausencia de etileno. También se ha encontrado que **ERS1** promueve la respuesta del etileno en presencia del receptor **ETR1** (Wang *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). **ETR1** es una metaloproteína con un ión de cobre en el sitio de unión a etileno (Theologis, 1998), y su sobreexpresión provoca alteraciones en el proceso de abscisión y en la respuesta a etileno y auxinas, así como en la expresión de genes inducibles por estas hormonas (Merelo, 2011).

Por su parte, los receptores **ERS2** y **EIN4** actúan como reguladores negativos redundantes en la señalización de etileno (Hua *et al.*, 1998; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012). Ambos receptores se encontraron expresados en el presente estudio, aunque **EIN4** en menor medida (**Ver Fig. 17**), y a diferencia de la mayoría de proteínas, presenta una disminución de expresión en CH VI en condición de abscisión respecto al mismo genotipo sin abscisión y un aumento en CH I en la condición de abscisión.

Por lo tanto, **EIN4** y **ERS2**, junto con **ETR1**, **ETR2**, y **ERS1**, son miembros de la familia de receptores relacionados al etileno de *Arabidopsis*. Los patrones de expresión de transcritos de los miembros de esta familia sugieren que poseen funciones redundantes en la percepción de etileno (Hua *et al.*, 1998; Theologis, 1998; Ju & Chang, 2012).

Respecto a lo encontrado en este trabajo, **ETR1**, **ERS1** y **ERS2** se encuentran dentro de la **sección 6.2.2.3.**, en la cual fueron clasificadas aquellas proteínas que, sin importar el genotipo, aumentaban su expresión durante la abscisión. **ERS1** se encuentra dentro de las proteínas que presentan mayor expresión total (**Ver Fig. 17**).

Liu *et al.*, en el 2000 registraron en el EMBL/Gen Bank, una serie de receptores de etileno homólogos del género *Oncidium* (Orchidaceae); entre ellos se encuentra **ER4**. Realizando una búsqueda en el NCBI/ GenBank, se encontró que su secuencia empata con otras de los géneros *Phalenopsis*, *Dendrobioum* y *Papilionanthe*, pertenecientes también a la familia Orchidaceae. Su función es la catálisis de la fosforilación de un residuo de histidina en respuesta a la detección de una señal extracelular, ya sea un ligando químico o un cambio en el entorno, para iniciar la actividad celular para dar respuesta al estímulo (www.ebi.ac.uk). En el actual estudio se encontró que dicha proteína se expresó en mediana medida en *V. planifolia* (**Ver Fig. 17**) y pertenece al grupo catalogado como de mayor expresión en presencia de abscisión (**Ver sección 6.2.2.3.**).

La mayoría de los receptores encontrados están asociados a la membrana del Retículo Endoplásmico Rugoso (**ETR1, EIN4, ERS1 y ERS2**), sólo dos a la membrana plasmática (**ETR1 y ER4**) y uno a la pared celular (**ETR1**). Sin embargo, no podemos decir con exactitud que la señalización del etileno en el interior de la célula sea mayor, debido a que, aún no se conoce si varios de los receptores reportados únicamente en la membrana del RER pueden estar presentes también en el núcleo.

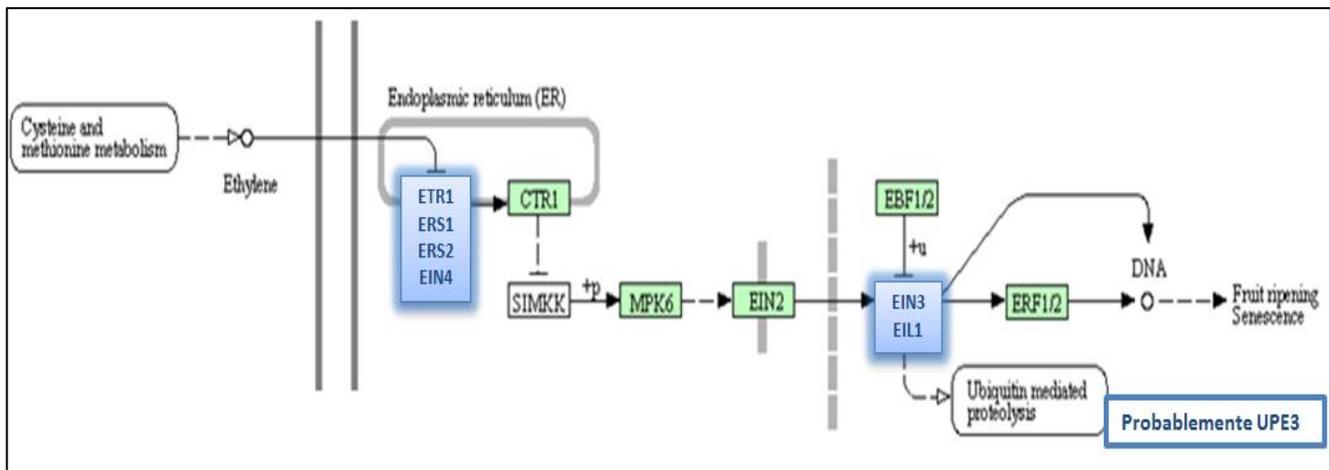


Figura 22. Localización de ETR1, ERS1, ERS2 y EIN4 en la ruta de transducción de señales de hormonas vegetales.

2) Factores de transcripción asociados a la síntesis de etileno

Los dos principales factores de transcripción del etileno son **EIN3** y el factor de transcripción tipo EIN3 (**EIL1**). **EIN3** funciona como un regulador positivo de la transducción de señales del etileno, ya que activa directamente la expresión del factor de transcripción **ERF1**, que a su vez activa la expresión de otros genes sensibles al etileno (Chao *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1998; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012). Ambos factores de transcripción presentaron alta expresión total (**Ver Fig. 17**).

De todas las proteínas, la que presentó mayor expresión fue el factor de transcripción **RAP2-13** (Ver Fig. 17), que por similitud se ha identificado como integrante de la familia AP2/ERF (al igual que **AIL**, **AIL6** y **RAP-7** que también fueron encontrados en este trabajo. La familia de proteínas AP2/ERF actúan como activadores transcripcionales y están involucradas en la regulación de la expresión génica de los factores de estrés y son componentes de las vías de transducción de activación por señales de estrés y activan una cascada de señalización de síntesis de etileno. También participan en otros procesos celulares como la transducción de señales hormonales y regulación del metabolismo entre muchas otras (Solano *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2006; Weber & Hellmann, 2009; Ju & Chang, 2012).

Las anteriores proteínas muestran una alta expresión en contraste **ERF022** y **ERF038** que tienen una expresión muy baja. Ambas fueron clasificadas por similitud, como integrantes de la familia AR2/ERF y actúan como un activadores transcripcionales. Pueden estar involucradas en la regulación de la expresión génica de los factores de estrés y de las vías de transducción de señales de estrés (Nakano *et al.*, 2006). **ERF038** es una de las pocas proteínas que no presentó aumento de su expresión en CH VI en condición de abscisión, al contrario, redujo su expresión.

3) Síntesis de etileno

En *Vanilla planifolia* se encontraron tres enzimas que participan en el ciclo de la metionina o de síntesis de etileno (**MTN2**, **ACO**, **ACO3**). La **5'-metiltioadenosin/S-adenosilhomocistein nucleosidasa 2** o **MTA nucleosidasa (MTN2)**, es la enzima que cataliza la escisión irreversible del enlace glicosídico entre el 5'-metiltioadenosina (MTA) y S-adenosil (SAH / AdoHcy) y la adenina. Es decir, degrada la MTA en los tejidos vegetales por una escisión nucleosídica a MTR y adenina y contribuye al mantenimiento de la homeostasis del S-Adenosil metionina (SAM/AdoMet), la cual se requiere para sostener altas tasas de síntesis de etileno (Mosbah *et al.*, 1985; Bürstenbinder *et al.*, 2007). Mientras que la 1-Aminociclopentano-carboxilato oxidasa (**ACC oxidasa/ACO**) es la enzima que cataliza el paso final de la síntesis del etileno a partir de 1-Aminociclopentano-carboxilato (ACC) (Raven *et al.*, 1992; Jordán & Casaretto, 2006).

La síntesis del etileno es inducida por numerosos procesos del desarrollo y por estrés ambiental, en todos los casos existe un aumento de ARNm de la ACC sintasa y de la **ACC oxidasa** (Taiz & Zeiger, 2006). En el caso de la **ACC oxidasa**, el fenómeno de maduración y el estrés térmico, estimulan la conversión de 1-Aminociclopentano-carboxilato (ACC) a etileno (Jordán & Casaretto, 2006).

En este análisis se encontraron dos isoformas de ACC oxidasa, **ACO1** y **ACO3**. Por su parte, Zou y col. (2014), estudiaron la relación entre la expresión de genes relacionados con el etileno y el trastorno en la maduración del fruto de papaya (*Carica papaya* L.) causado por daño por frío. Estos autores encontraron que ambas isoformas tenían un patrón diferencial de expresión. Se observó un aumento de ARNm de **ACO1** a 12 ° (que es considerada baja temperatura) y una inhibición a 7 °C, mientras que la expresión **ACO3** fue suprimida en ambas temperaturas. Concluyeron que los patrones de expresión sugieren que los genes de **ACO1** están más estrechamente asociados con la maduración anormal del fruto de papaya bajo estrés, lo cual es consistente con los resultados aquí presentados.

Cuadro 8. Resumen de las proteínas que participan en la señalización y síntesis del etileno.

El asterisco (*) indica las proteínas que se encontraron en el presente estudio.

Proteína o producto	Función
ETR(*1 y 2)	Familia de metaloproteínas, receptores de membrana que inician la síntesis de etileno. Tiene un dominio de unión a etileno con un ión de cobre y es activo cuando etileno no está presente. El receptor ETR se dimeriza (por presencia de una proteína RAN citosólica mediante enlaces disulfuro y con fijación de un ión de Cu ²⁺) iniciando así señales de fosforilación y transferencia del fosfato desde el dominio histidina al dominio receptor anexo de ETR. El ETR interactúa con otra cinasa (CTR1) presente en el citosol y la activación de ésta inicia una cascada de MAP cinasas. Cuando etileno es percibido, el receptor ETR se inactiva desacoplándose la interacción entre ETR y CTR1.
ERS(*1 y* 2)	Familia de receptores de membrana que inician la síntesis de etileno.
*ER4	Cataliza la fosforilación de un residuo de histidina en respuesta a la detección de una señal extracelular, ya sea un ligando químico o un cambio en el entorno, para iniciar la actividad celular para dar respuesta al estímulo.
*EIN4	Receptor de membrana que inicia la síntesis de etileno.
CTR1	Segundo mensajero presente en el citosol. Proteína MAP cinasa que dispara una cascada de fosforilación resultante en la activación del receptor intracelular EIN2. Regulador negativo. ETR interactúa éste citosol, la activa e inicia una cascada de MAP cinasas que culmina con la desactivación de la proteína de transmembrana EIN2. Cuando etileno es percibido, el receptor ETR se inactiva desacoplándose la interacción entre ETR y CTR1. La desactivación de la cascada de quinasas resulta en una proteína EIN2 activa la cual regula la activación de factores de transcripción EIN3 y EIL1, los que inducen la expresión de genes específicos de respuesta al etileno.
EIN2	Receptor intracelular que activa los factores de transcripción EIN3 y EIL1. Intermediario.
*EIL(1)	Factor de transcripción activado por EIN2. Al unirse a secuencias blanco en ADN, induce la transcripción de genes relacionados con el etileno.
EIL(2 y 3)	Factor de transcripción.
*EIN(3)	Factor de transcripción activado por EIN2. Al unirse a secuencias blanco en ADN, induce la transcripción de genes relacionados con el etileno.
ERF(1,* 038,* 022)	Factor de transcripción. Al unirse a secuencias blanco en ADN, induce la transcripción de genes relacionados con el etileno.
EDF	Regulador transcripcional involucrado en la señalización del etileno. Promotor unido a EIN3.
RAN 1	Tipo-P ATPasa (transportador de Cobre). Proporciona el cofactor de cobre requerido para la unión de etileno con el receptor. También es importante para la biogénesis de los receptores.
SAM	Biosíntesis del etileno. La biosíntesis de la hormona etileno comienza con la conversión del aminoácido metionina en S-adenosil-L-metionina (SAM, también llamada AdoMet). Co-sustrato que sirve como donador de metilos.
SAM sintetasa	Biosíntesis del etileno. Enzima catalizadora de la formación de SAM a partir de metionina.
ACC sintetasa	Biosíntesis del etileno. Enzima catalizadora de la formación de ACC a partir de SAM. La actividad de ACC sintetasa es reguladora en la producción de etileno.
ACC	Biosíntesis del etileno. Precursor inmediato del etileno. Se produce junto con 5'-metiltioadenosina (MTA) a partir de SAM.

ACC oxidasa (*1,*3)	Biosíntesis del etileno. Enzima que cataliza el paso final de la síntesis del etileno. Utiliza ACC como sustrato y genera Dióxido de carbono y cianuro. Antes era conocida como la enzima formadora de etileno (en inglés, <i>ethylene forming enzyme</i> o EFE).
MTA	Biosíntesis del etileno. Es el co-producto, junto con ACC generado por la ACC sintetasa. Se recicla a metionina, conserva el grupo metilto. Es capaz de mantener una concentración constante de metionina en las células incluso cuando etileno se sintetiza rápidamente y la reserva de metionina es pequeña.
ACC N-malonil-transferasa	Biosíntesis del etileno. Enzima encargada de la malonización de ACC a malonil-ACC (MACC).
MACC	Biosíntesis del etileno. Disminuye la concentración de ACC y reduce la producción de etileno.
MTA nucleosidasa	Biosíntesis del etileno. Degrada la MTA en los tejidos vegetales por una escisión nucleosídica a MTR y adenina.
MTR cinasa	Biosíntesis del etileno. Enzima que cataliza la fosforilación dependiente de ATP de MTR a MTR- 1 –P.

La acción de las auxinas en el proceso de abscisión

La síntesis del etileno es inducida por numerosos procesos del desarrollo, por las auxinas y también por estrés ambiental. En todos los casos hay un aumento el nivel de ARNm de la ACC sintasa y en algunos además de ACC oxidasa (Taiz & Zeiger, 2006).

Las proteínas de las familias IAA y ARF, están estrechamente relacionadas para regular la expresión génica inducida por auxinas y funcionan de las siguiente manera: los Factores de Respuesta Auxina (ARFs) son factores de transcripción que se unen específicamente a la secuencia de ADN 5'-TGTCTC-3 encontrada en los promotores AuxREs (promotores de elementos de respuesta a auxina). La formación de heterodímeros de proteínas Aux / IAA puede alterar la capacidad de la célula para modular la expresión de genes de respuesta temprana a auxina. En este estudio se encontró también la proteína **IAA30** y se incluyó dentro de la **sección 6.2.2.3.**, no obstante, además de las funciones antes mencionadas, no se encontraron referencias de su función específica.

Los factores de la familia ARF, por su lado, promueven la floración, el desarrollo de estambres, la abscisión de órganos florales y la dehiscencia del fruto (Reed, 2001; Nagpal *et al.*, 2005; Liscum & Reed, 2011). **ARF6**, encontrado también en este estudio, pertenece a estos factores de transcripción y parece actuar como activador transcripcional; tiene una actividad parcialmente redundante con ARF8, ambos promueven la producción de ácido jasmónico (Nagpal, 2005). Este ácido actúa sobre la **ACC oxidasa**, promoviendo la biosíntesis del etileno y la maduración, coloración y dehiscencia de frutos (Jordán & Casaretto, 2006; Patterson, 2001).

Se cree que las auxinas inducen la transcripción de los genes de respuesta temprana promoviendo la degradación proteolítica de las proteínas inhibitoras AUX/IAA de manera que pueden formar dímeros ARF activos y que tanto la ubiquitinación por una ubiquitin ligasa, como la proteólisis por proteosoma 26S pueden estar implicadas (Taiz & Zeiger, 2006).

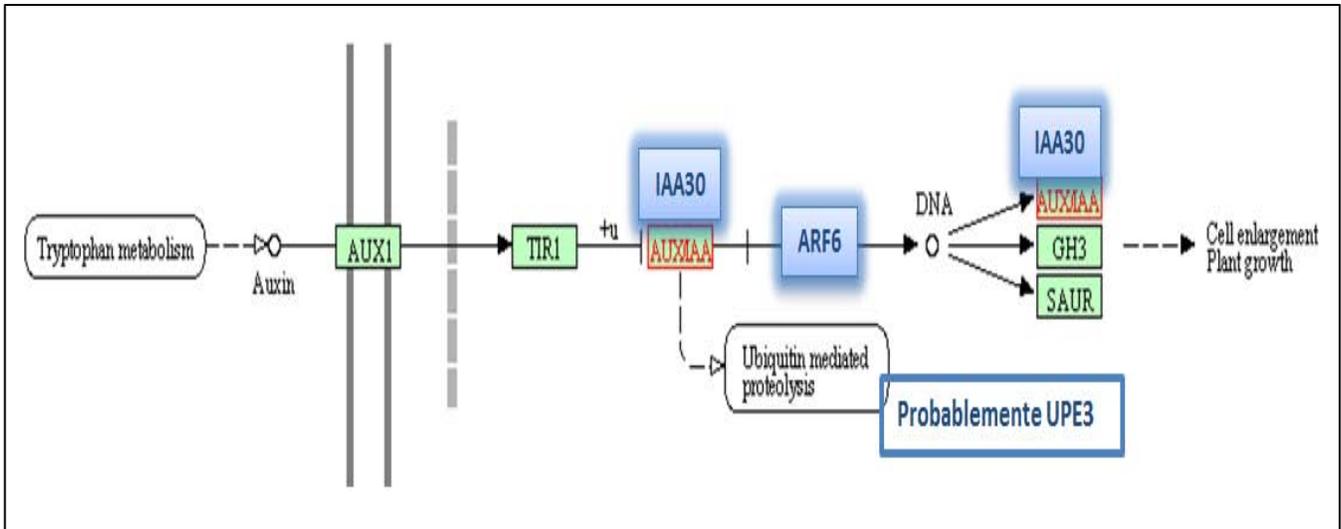


Figura 24. Localización de IAA30 y ARF6 en la ruta de transducción de señales de hormonas vegetales.

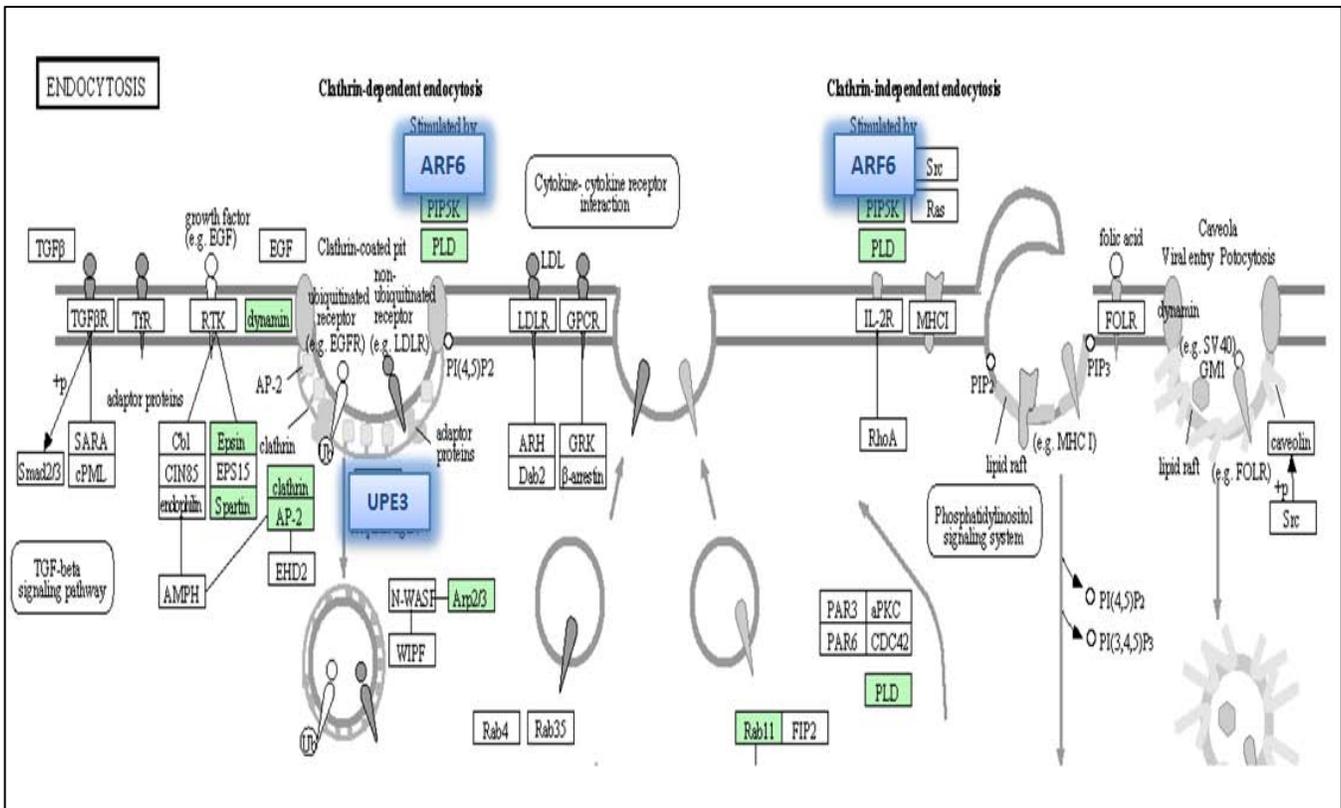


Figura 25. Localización de ARF6 y UPE3 en la ruta de endocitosis.

Degradación de las proteínas mediante el Sistema Ubiquitin-proteosoma (UPS)

Como se revisó anteriormente, la biosíntesis de etileno está dirigida por la familia de proteínas ACC Oxidasas (**ACOs**) y ACC sintasas (**ACSs**), estas últimas convierten la SAM o AdoMet en ACC, el precursor inmediato del etileno. En *Arabidopsis*, la producción de estas enzimas está mediada por el Sistema Ubiquitin-Proteosoma 26S (**Ver sección 2.4.1**), utilizando el complejo BTB-**E3** (Broad Complex/ Tramtrack / Bric-a-Brac-**Ubiquitin ligasa**) unido con la proteína de sobre producción de Etileno 1 (**ETO1**) (Christians *et al.*, 2009). Tanto **ETO1** como **E3 (UPE3)** se encontraron en este análisis aunque con muy poca expresión.

El complejo BTB-**E3** y **ETO1** trabajan de manera conjunta como regulador negativo de la producción de etileno, participando directamente en la ubiquitinación y en la degradación de ACS2 (ACC Sintasa, tipo 2), sin embargo, al ser altamente específico, no presenta unión con ACS1 ni ACS3 (Christians *et al.*, 2009).

Por otro lado, tanto las proteínas **EIN3** y **EIL1** se sintetizan continuamente; sin embargo, en ausencia de etileno se degradan rápidamente para evitar respuestas a etileno. El complejo SCF-**E3** (**Ver sección 2.4.1**) ensamblado con la proteína de unión de la caja F a **EIN3** (EBF1 y 2) coordina la ubiquitinación de **EIN3/EIL1** (Gagne *et al.*, 2004). En las plantas se han descrito varias proteínas con caja F que participan en el control de procesos importantes, entre ellos las respuestas de defensa ante el estrés, la respuesta a hormonas, así como a múltiples procesos de desarrollo (Rocha-Sosa, 2013).

Algunas isoformas de SCF ligado a **E3** que participan en la degradación de familias proteicas como **AUX/IAA**, **EIN3/EIL1** y Della por lo que, actúan como reguladores de la señalización de auxina, etileno y giberelinas, respectivamente (Christians *et al.*, 2009). Además de la degradación de **EIN3/EIL1** y **AUX/IAA**, se ha registrado la degradación de ACS3, **ERF** y **ACOs** mediante UPS-**E3**. Al igual que con **ETO1**, estos mecanismos de regulación se presentan desde las plantas terrestres primitivas, lo que indica que proceso de ubiquitinación apareció desde etapas tempranas de la evolución en plantas (Woodward & Bonnie, 2005; Chen *et al.*, 2007; Christians *et al.*, 2009).

En *V. planifolia*, **UPE3** (**E3**) únicamente se expresó en CH I sin abscisión y en poca cantidad y **ETO1** se expresó en poca cantidad en todos los genotipos y condiciones, pero mayormente en CH I sin abscisión. De acuerdo a este resultado y conforme al párrafo anterior, se esperaría una reducción de las proteínas **EIN3**, **EIL1**, **ERF022**, **ERF038** y **IAA30** en CH I sin abscisión respecto a CH I con abscisión, no obstante, los resultados de este estudio no coinciden con la hipótesis (**Ver Fig. 18 y 19, barra azul respecto a la roja**).

Se podría pensar que tal vez **UPE3** y **ETO1** están indirectamente relacionados con la disminución de abscisión de CH I en comparación con CH VI, ya que la proteólisis juega un papel fundamental en la regulación de la señalización del etileno y en menor medida en otras hormonas vegetales (Christians *et al.*, 2009; Rocha-Sosa, 2013). Sin embargo, no podríamos afirmar lo anterior debido a dos aspectos, en primer lugar ambas proteínas mostraron muy poca expresión como para interferir con la degradación de otras proteínas y en segundo lugar, la diversidad de **E3** en las plantas es enorme, contándose alrededor de 1,500 de éstas en el genoma de *A. thaliana* (Rocha-Sosa, 2013).

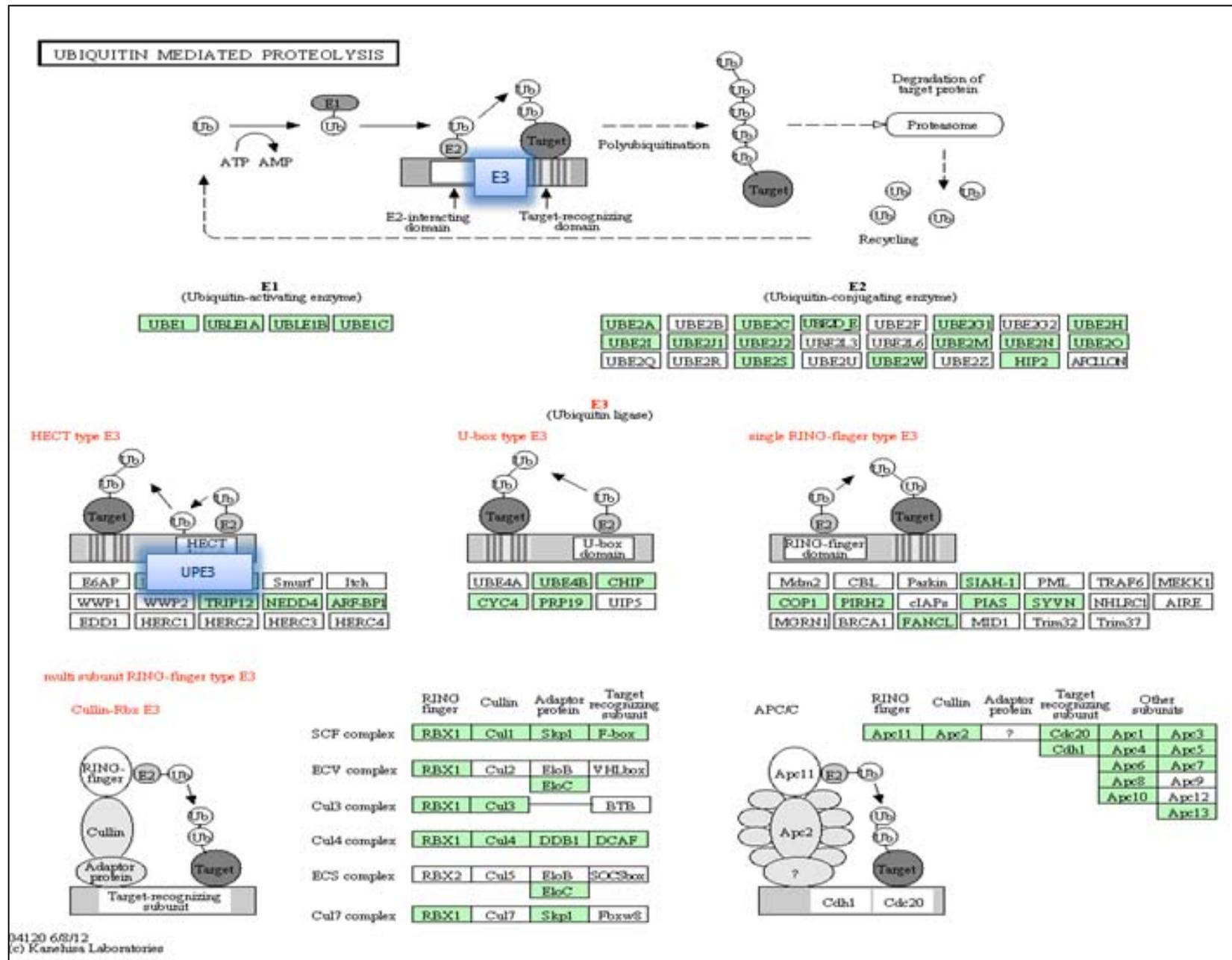


Figura 26. Localización de UPE3 en la ruta de ubiquitinación mediada por proteólisis.

En segundo lugar, la amplia diversidad de E3 en plantas, sugiere que éstas utilizan la ubiquitinación para regular un gran número de procesos durante su vida, y al ser E3 tan específica con su sustrato, no podemos asegurar que el tipo de E3 encontrada en este estudio sea la que reconozca a las proteínas de señalización y síntesis del etileno (Rocha-Sosa, 2013).

Por otro lado, una proteína reguladora del proteosoma es la **UBLCP1** (Ubiquitina con Dominio Tipo CDT Fosfatasa). Esta proteína desfosforila el dominio C-terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (Pol II) y desempeñan un papel crítico durante transcripción génica mediada por la Pol II (Guo *et al.*, 2011).

La **UBLCP1** se une directamente a la RP 19S (una región del proteosoma, **Ver Fig. 11**) a través del dominio UBL y desfosforila el proteosoma disminuyendo de ese modo su actividad proteolítica. La desfosforilación puede impedir el montaje del núcleo y las partículas reguladoras CP y RP (**Ver Fig. 11**) en proteasomas 26S maduros. La **UBLCP1** reprime selectivamente la actividad del proteosoma nuclear de una manera dependiente de la fosfatasa, lo que sugiere un mecanismo único para la regulación del proteosoma nuclear (Guo *et al.*, 2011). Como podemos observar en el **Cuadro 6** y el **Fig. 18 (barras roja y verde)**, se observó aumento de esta proteína en ambos genotipos durante la abscisión.

Zona de Abscisión

1) Formación de la Zona de Abscisión

Patterson (2011) realizó un esquema de la formación de la zona de abscisión en *Arabidopsis* que consta de cuatro etapas: la diferenciación de la zona de abscisión, la competencia para la respuesta de las señales de abscisión, activación de la abscisión y por último, la transdiferenciación post-abscisión (**Ver Fig. 4**). No obstante, Sandoval, Rojas & Guzmán (comunicación directa) observaron que en *Vanilla planifolia* no suceden las dos primeras etapas debido a que la zona de abscisión ya se encuentra presente antes de la maduración del fruto. Incluso existe una diferencia de tiempo de la formación de la zona de abscisión y del grado de lignificación entre genotipos, en la cual CH VI presenta la ZA días antes que CH I y con mayor contenido de lignina. También podemos observar que el genotipo CH VI, presenta células apoptóticas en la ZA (Sandoval y col., comunicación directa) (Fig. 27).

La resupinación es un giro de 180° que sufren el pedicelo y el ovario durante la antesis, de modo que el pétalo superior (labelo) se sitúa hacia abajo. Esta estrategia es utilizada por algunas especies de la familia Orchidaceae, lo que conlleva un reforzamiento con lignina (Stern, 2014). Esto lo podemos observar en *V. planifolia*, en genotipo CH I (**Fig. 27**). Sin embargo, en el presente estudio se encontró mayor expresión de OMT3; en algunas plantas, la acumulación de lignina en la ZA posibilita la rotura mecánica de las paredes celulares (Liljegren *et al.*, 2000; Merelo, 2011). Lo anterior puede deberse a que existen diferentes tipos de lignina.

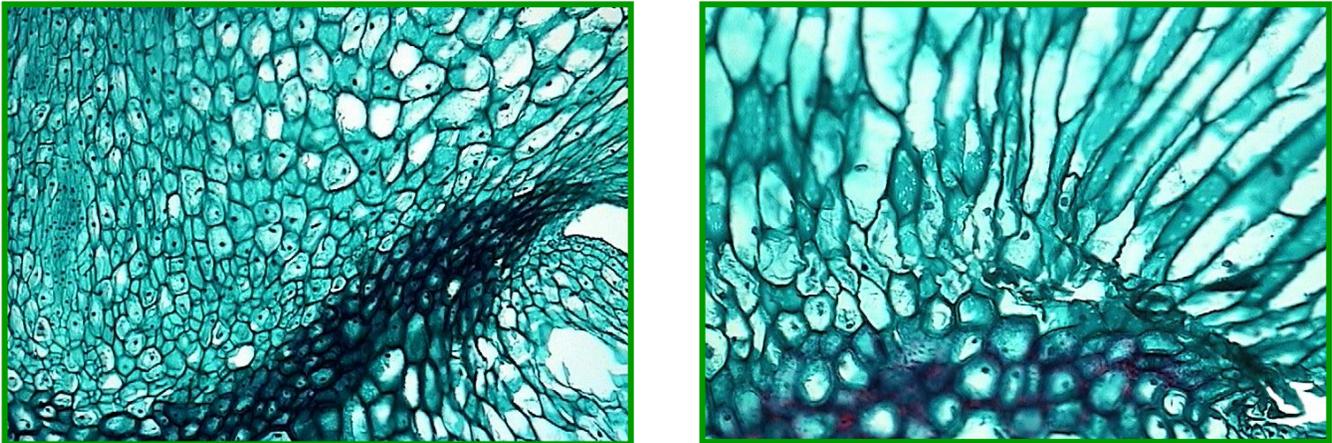


Figura 27. Zona de abscisión de fruto en *V. planifolia*.
Sandoval, Rojas & Guzmán, comunicación directa). Izquierda: CH I; Derecha: CH VI.

Otra razón es que los tejidos, tras la abscisión y después de experimentar la transdiferenciación, quedan expuestos a patógenos. Esto activa la maquinaria de defensa y remodelación de la pared celular, que permite la separación efectiva del órgano y cierre de herida sumado a la deposición de lignina en las paredes celulares de las nuevas capas protectoras como medida preventiva (Agustí *et al.*, 2008; 2009; Merelo, 2011).

Al igual que en la biosíntesis de muchos compuestos secundarios de plantas, la ruta metabólica de la síntesis de lignina, requiere de la metilación de uno o más grupos hidroxilo, catalizada por O-metiltransferasas (OMTs). Li y col (2006), presentaron la caracterización de dos OMTs, Van OMT-2 y **Van OMT-3**, de la orquídea *Vanilla planifolia* Andrews. Con base en el análisis de secuencias que realizaron, estas enzimas presentaron mayor similitud a ácido O-metiltransferasas caféico (COMTs), pero su actividad se relaciona mínimamente con los sustratos típicos de la COMT. Van OMT-2 y Van OMT-3 mostraron diferencias en siete de los doce residuos de unión al sustrato conservados en COMTs. El análisis filogenético de las secuencias indica que Van OMT-2 y **Van OMT-3** provienen de la de la *V. planifolia* COMT (proteína que fue previamente aislada por los autores).

Se han estudiado dos clases de OMTs (OMT1 y OMT2), ambas participan en la síntesis de lignina. OMT1 metila al precursor de la lignina, cafeoil-CoA y OMT2 está implicado en la síntesis de S-lignina. Aún no se conoce la función de OMT3, sin embargo, seguramente está involucrada en la biosíntesis de lignina (Li *et al.*, 2006).

El estudio con plantas transgénicas ha demostrado que al modificar genes como **ETR1**, **EIN2**, **EIN3** y **ERS2** disminuye la síntesis de etileno, y esta disminución provoca un retraso en la abscisión, maduración y senescencia. Aunado a esto, un análisis anatómico y morfológico de la expresión de una proteína degradadora de pared celular, la β -glucuronidasa (GUS), inducida por el promotor de la ACC sintasa muestra que dicha expresión está localizada dentro de la zona de abscisión (Patterson, 2011). Lasserre y col., en el 2008, reportaron que el factor de transcripción participa en la lignificación de las paredes celulares ya que se expresa con mayor intensidad en silicuas maduras (frutos) y tallos florales, está estrechamente relacionado con los tejidos que sufren modificaciones de la pared celular secundaria. El análisis histoquímico realizado por estos autores, reveló la actividad de GUS fuerte y específica en las células integumentarias exteriores de semillas maduras, células endodérmicas de las raíces en la etapa de desarrollo principal y algunas células escleróticas de los tallos de inflorescencias maduras. **ER038** fue relacionado con la suberización en células vegetales.

3) Degradación de la pared celular en la Zona de Abscisión

La abscisión de órganos vegetales es un proceso fisiológico activo, ya que conlleva la disolución de la pared celular y la participación de diversas proteínas. En tomate y tabaco se han observado de manera directa los cambios en zona de abscisión, estos incluyen la hinchazón celular, el aumento de tamaño del retículo endoplasmático rugoso y el número de ribosomas, tanto indica el aumento de la síntesis de proteínas. A continuación ocurre la degradación de la pared celular, particularmente en la lamela media, en ocasiones seguida por autólisis parcial o completa de los contenidos celulares (Van Doorn & Stead, 1997).

En el caso de *V. planifolia*, se encontraron tres proteínas relacionadas con la degradación de pared celular: **β - glucosidasa 46**, **Heteroglicano glucosidasa 1** y **Metaloproteasa dependiente de zinc (mitocondrial)**.

La enzima **β - glucosidasa** además de catalizar la formación de la vainillina (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004), está relacionada con la degradación de celulosa pues participa en la formación del celulosoma. Los celulosomas son complejos multienzimáticos cuyos componentes actúan de manera sinérgica para hidrolizar a la celulosa. En este estudio se encontró la **β - glucosidasa 46** que pertenece a la familia de las β -glucosidasas. Estas proteínas no son propiamente celulasas pero si son componentes muy importantes de los sistemas celololíticos, ya que completan la hidrólisis de cadenas pequeñas celooligosacáridos y de celobiosa, liberados por otras enzimas, hasta glucosa (Hernández, 1999).

La **Heteroglicano glucosidasa 1** también tiene actividad degradadora ya que cataliza la hidrólisis de los enlaces O- glicosílicos (entre monosacáridos) (www.ebi.ac.uk). A su vez las **Metaloproteasas dependientes de zinc** están involucradas en la proteólisis celular y aunque, para el caso de la encontrada en este trabajo no se conoce su función, en otros organismos se ha reportado actividad degradadora de la matriz extracelular, procesamiento de diversos mediadores bioactivos como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas, y receptores en superficies celulares modulando su

actividad, ya sea por corte directo de los enlaces peptídicos o por su liberación de la MEC donde se encuentran almacenados. De esta manera, los efectos de las MMPs son múltiples y contribuyen en la regulación de diversos procesos celulares como la proliferación, migración, diferenciación, y apoptosis. Esto indica que podría estar relacionada en la degradación de la pared celular (Pardo, 2008).

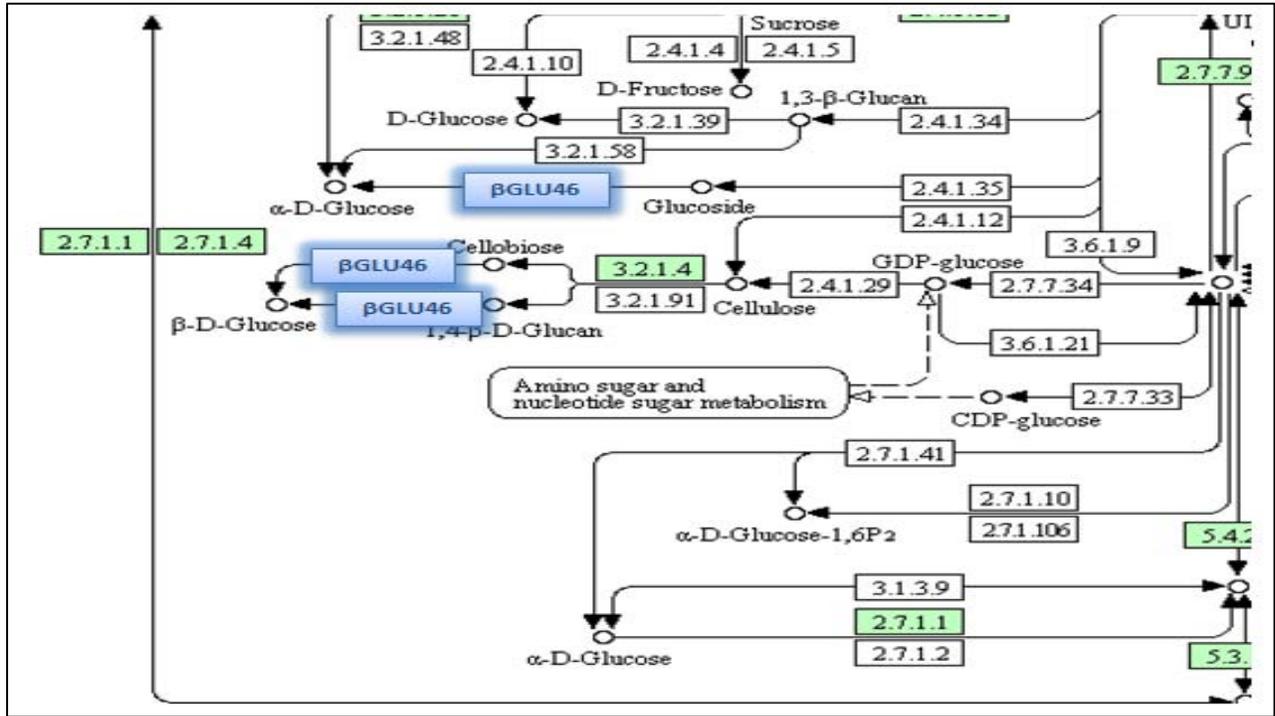


Figura 29. Localización de BGLU46 en la ruta del metabolismo del almidón y la sucrosa.

A continuación se muestra un modelo donde se resume la localización y la función de las proteínas encontradas y analizadas en el presente trabajo. Las proteínas se colorearon según su ubicación: **NUCLEO** (amarillo); **RETÍCULO ENDOPLÁSMICO** (azul oscuro); **MITOCONDRIA** (lila); **CITOSOL** (azul claro); **MEMBRANA CELULAR** (rojo); **PARED CELULAR** (anaranjado) y **APOPLASTO/ESPACIO INTERCELULAR** (verde). El marco punteado señala las proteínas involucradas en la degradación de la pared celular.

El esquema del mecanismo del receptor que se muestra es para **ETR1**, ya que para los otros receptores no se encontraron en la bibliografía. Las rutas metabólicas esquematizadas son el Ciclo de Yang (o dela metionina) y la síntesis de lignina. También se representa el proteosoma.

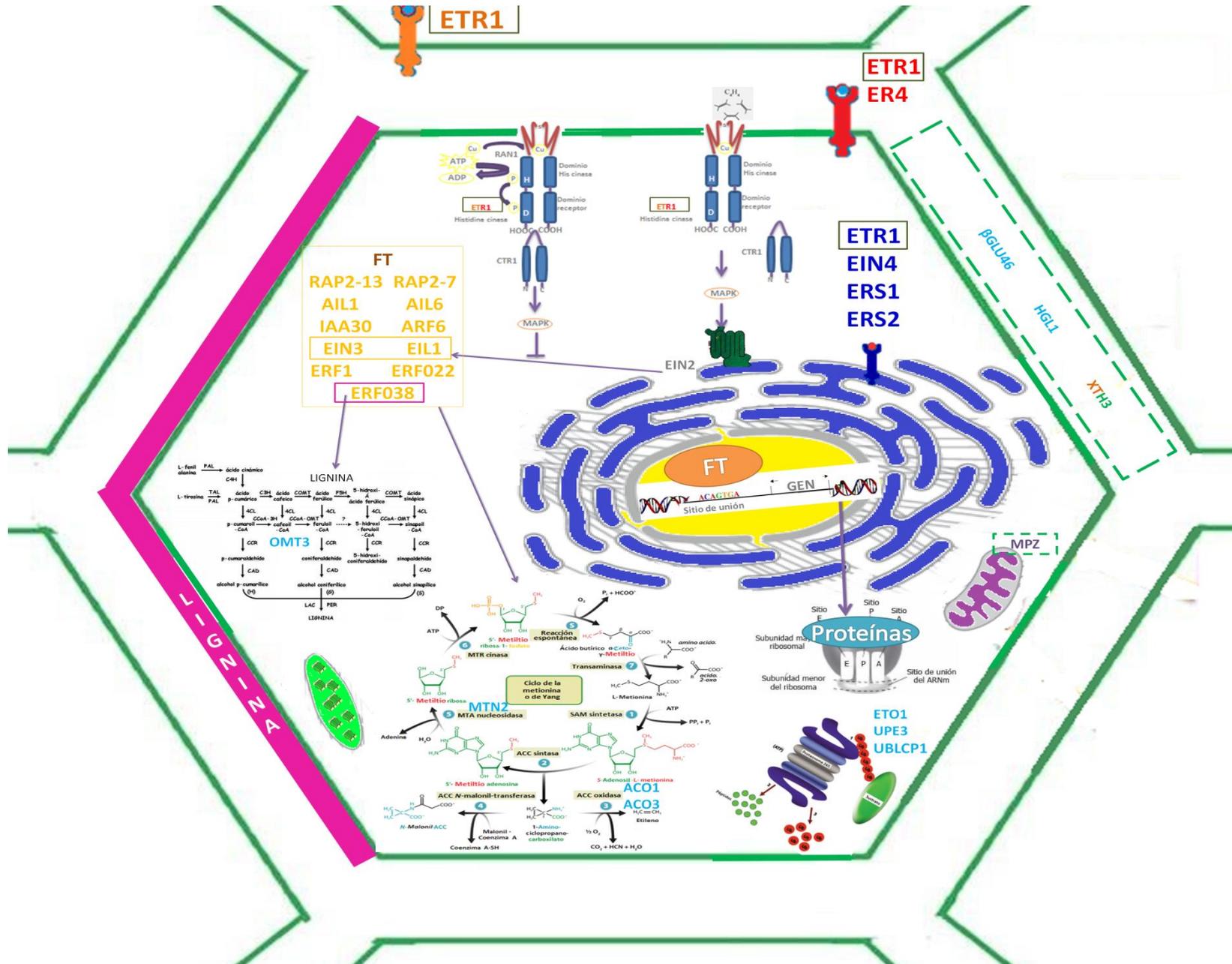


Figura 30. Modelo de la función y localización de las proteínas relacionadas con la abscisión del fruto en *Vanilla planifolia* encontradas en el presente estudio.

6.2.2.6. Expresión diferencial no relacionada directamente al proceso de abscisión

Actualmente, en nuestro grupo de trabajo, se está analizando el transcriptoma completo de *V. planifolia* de los genotipos CH I y CH VI en las condiciones de presencia y ausencia de abscisión y, tras el análisis de esta comparación, se ha descubierto una considerable reducción en el metabolismo durante el proceso de abscisión, a excepción del etileno y lignina donde existe la presencia de diferentes proteínas y productos de las rutas metabólicas entre condiciones (**Cuadro 9 y Fig. 31**).

Cuadro 9. Resumen de la actividad metabólica contrastante entre la condición sin abscisión y la condición de abscisión en el fruto *V. planifolia*.

METABOLISMO	Sin Abscisión	Con Abscisión
Biosíntesis de Metabolitos primarios	Normal	Disminuido
Auxinas	Normal	Ausente
Etileno	Ausente	Presente
Lignina	Normal	Disminuida
Células Adyacentes del fruto	Sin modificar	Modificada

Por este motivo, en este trabajo se analizó la expresión del cloroplasto y del gen funcional *rbcL* en ambos genotipos y en ambas condiciones, ya que por un lado, el *rbcL* es un gen del metabolismo basal ya que codifica para la subunidad mayor de la enzima RuBisCO quien participa en la fotorrespiración de las plantas (Portis, 2001). Por su parte, el cloroplasto es un organelo muy importante en la fotosíntesis, ya que convierte luz en energía utilizable por las plantas y participa en la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos (Hernández-Quezada, 2011).

En el caso de *rbcL*, se observó que esta proteína se expresa 7.5454 veces más en el genotipo CH I que en el CH VI y que hay una disminución en la expresión del cloroplasto en ambos genotipos durante la abscisión (**Fig. 32 y 33**), lo que concuerda con lo antes mencionado.

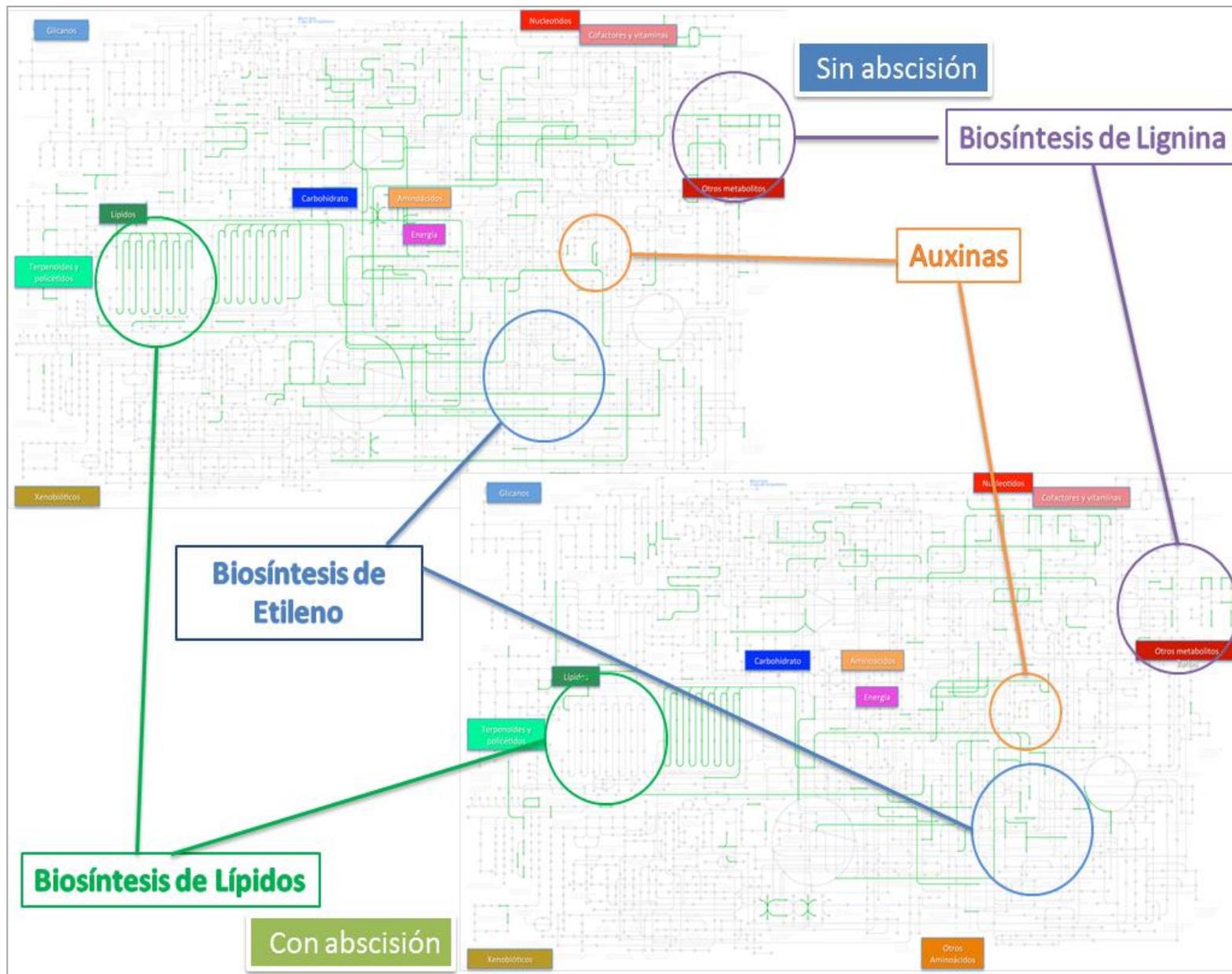


Figura 31. Rutas metabólicas encendidas en *V. planifolia* en ambas condiciones (sin y con abscisión). El mapa metabólico de arriba nos muestra las rutas encendidas en la condición sin abscisión, mientras que el de abajo nos muestra las rutas encendidas durante la abscisión.

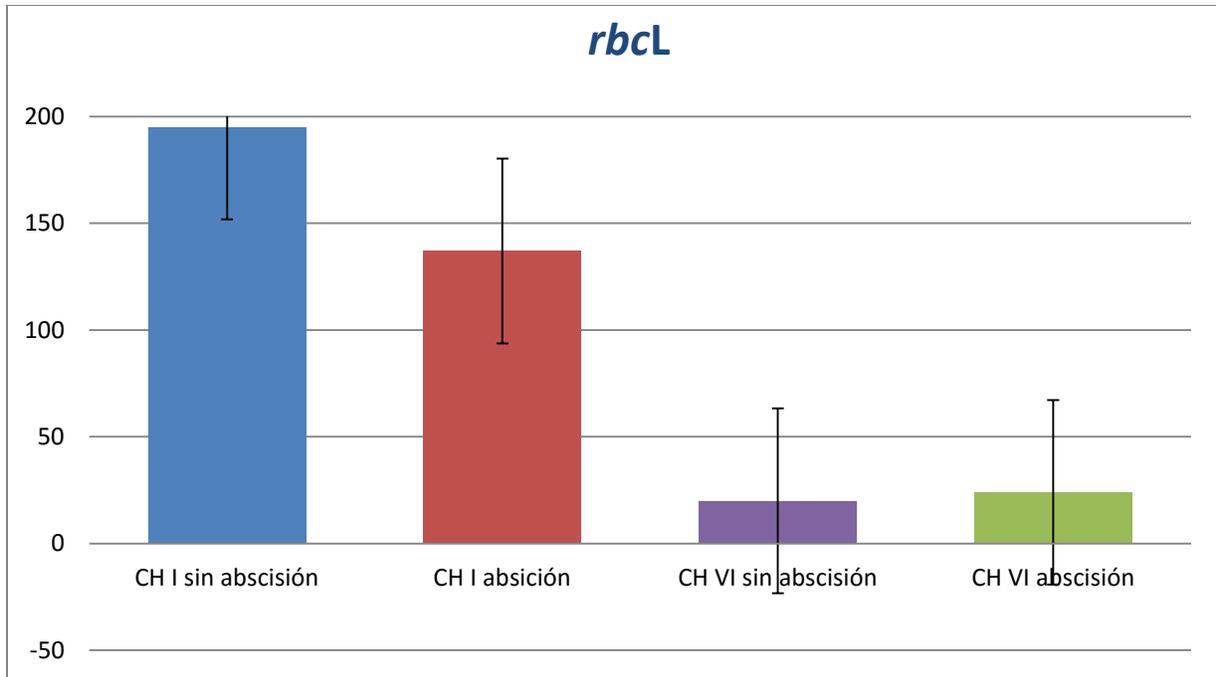


Fig. 32. Expresión de la proteína *rbcL* (metabolismo basal) en ambos genotipos y situaciones.
Se muestran las barras de error típico.

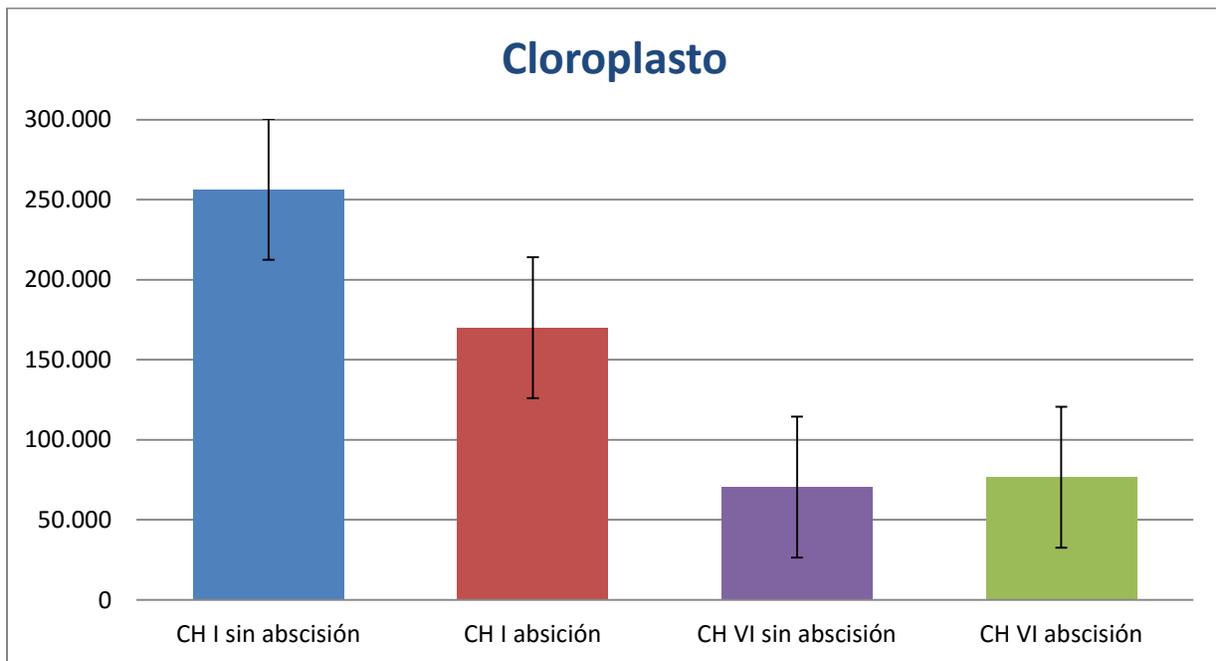


Fig. 33. Expresión total del cloroplasto (metabolismo basal) en ambos genotipos y situaciones.
Se muestran además las barras de error típico.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se encontró la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de abscisión en el fruto de *Vanilla planifolia*. Estas proteínas están relacionadas con la señalización de etileno (ETR1, ERS1, ERS2, EIN4 y ER4; los factores de transcripción: AIL1, AIL6, ERF022, ERF038, RAP2-7, RAP2-13, EIL1, EIN3); la biosíntesis de éste (ACO1, ACO3 y MTN2); la regulación de auxinas (ARF 6 y IAA30); la degradación de proteínas mediante ubiquitinación (ETO1, UBLCP1 y UPE3); lignificación de la zona de abscisión (OMT3) y degradación de pared celular (β GLU46, HGL1 y MPZ).

Se puede afirmar que la mayoría de estas proteínas están implicadas en el proceso de abscisión debido a la diferencia de su expresión en las condiciones contrastantes (con abscisión y sin abscisión) y la función que se les atribuye.

De las antes mencionadas, parece ser que los factores de transcripción son las proteínas que tienen mayor influencia en el proceso de abscisión, debido a la cantidad de proteínas de este tipo que se presentan y su alta expresión de algunas de ellas. En segundo lugar estaría ACO1 y en tercer lugar OMT3, por lo que podría asumirse que además del metabolismo del etileno, la formación de lignina en la zona de abscisión es importante en la abscisión del fruto.

También puede deducirse la acción del estrés en el proceso de abscisión, ya que, para la mayoría de las proteínas encontradas en este trabajo, existen funciones de respuesta al estrés reportadas en la literatura. Cuando las plantas se enfrentan a situaciones adversas del medio ambiente, responden activando diversos mecanismos mediante el control de la abundancia de ciertas proteínas y como consecuencia ocurre un cambio en los patrones de expresión de ciertos genes. Esto se observó analizando la expresión diferencial entre ambas condiciones.

Aún no se ha reportado la secuenciación del genoma completo de *Vanilla planifolia* y en general no existen muchos genes secuenciados de la familia Orchidaceae; por lo que el transcriptoma obtenido para este análisis se comparó con algunas secuencias de otros géneros de dicha familia, pero en su mayoría con secuencias de otros grupos de plantas. Esto influyó en el emparejamiento de las secuencias por el grado de similitud que presentan, por ejemplo las secuencias de RAP2-13, ER4 y ACO1 sólo empataron con secuencias de géneros de Orchidaceae, a pesar de que también fueron comparadas con secuencias de otras familias de plantas. Probablemente existen más proteínas relacionadas con la abscisión cuyas secuencias no fueron reconocidas debido a lo antes mencionado.

7.1. Perspectivas

El estudio más profundo de las proteínas de degradación celular, metabolismo de lignina, ubiquitinación y la inclusión de las proteínas relacionadas con la apoptosis. Así como la validación de la presencia de estas proteínas mediante PCR en tiempo real y Citometría de Flujo, y la medición del etileno *in situ*, intra y extra celular para hacer una comparación y establecer la actividad de esta fitohormona en el proceso de abscisión.

LITERATURA CITADA

Abel, S. A. M. (2008). *Validación de técnicas de electroforesis bidimensionales para el estudio del proteoma y complexoma de membrana externa de Neisseria*. Tesis de Doctorado. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. 218 p.

Agustí, J., Merelo P., Cercós M., Tadeo F.R. & Talón M. (2008). *Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves*. *Journal of Experimental Botany*. 19: 2717-2733.

Arditti, J., Rao A. N. & Nair H.(2009). *Hand-Pollination of Vanilla: How Many Discoverers? History-Pollination* Capítulo 7. En: Kull T., Arditti J. & Wong S. M. (Eds). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, X. E.U.A. Springer. 467 p.

Azofeifa ,B.J.B., Paniagua.V. & García G.J.A. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (ORQUIDACEAE) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 25(1):189-202.

Bairoch, A. & Apweiler R. (2000). *The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000*. *Nucleic Acids Research*. 28(1):45-48.

Baltazar, N. P. (2010). *Caracteres morfológicos de Vianilla (Vanilla planifolia J.) utilizados por el agricultor en la selección de material reproductivo en cuatro municipios del Totonacapan. México*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Puebla, Puebla. México. 128 p.

Bañó, C., Pamblanco M., Peretó J & Sendra R. (2007). *Fundamentos de bioquímica*. Ed. Universidad de Valencia. España. 376 p.

Barrera-Ortiz S., Ortiz-Castro R., López-Bucio J., & Beltrán-Peña E. (2012). *Bases moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas*. *Ciencia Nicolaita*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (56): 20-34.

Benítez R., Ibarz A. & Pagan J. (2008). *Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones*. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 42 (2): 227-36.

Binder, J., Pletscher-Frankild S., Tsaou K., Stolte C., O'Donoghue S.I., Schneider R. & Jensen L.J. (2014). *COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence*. *Database*. 1-9p.

Brown, T.A. (2008). *Genomas*. 3° edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 760 p.

Camacho, E. M.K., Peinado G.L.I., López V.J.A., Valdez O.A., Salinas P.R.A., Moreno H.C.G. & Medina G.S. (2010). *Caracterización Proteómica de granos de Frijol Azufrado (Phamseo lus Vulgaris) cultivados en el Estado de Sinaloa*. *Ra Ximhai*. 6(1): 23-36.

Cameron, K., Chase, M. W., Whitten, W. M., Kores P. J., Jarrell, D. C., Albert, V. A., Yukawa, T., Hills, H. G., & Goldman, D. H. 1999. *A Phylogenetic Analysis of the Orchidaceae: Evidence from rbcL Nucleotide Sequences*. American Journal of Botany 86:208–224.

Castillo, M.R. & Engleman M. E. (1993). *Caracterización de dos tipos de Vanilla planifolia*. Acta Botánica Mexicana. 25:49-59.

Castro, B. G. (2008). *Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México*. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología. A.C. Xalapa, Veracruz, México. 93 p.

Chao, Q.M., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W., Ecker J.R. (1997). *Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins*. Cell. 89:1133–1144.

Chen, Y.F., Shakeel, S.N., Bowers, J., Zhao, X.C., Etheridge, N. & Schaller, G.E. (2007). *Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in Arabidopsis*. J. Biol. Chem. 282, 24752–24758.

Correll, D. S. (1953). *Vanilla: It's Botany, History, Cultivation and Economic Import*. Economic Botany. 07:291-358.

Christians, M.J., Gingerich D.J., Hansen M., Binder B.M., Kieber J.J., Vierstra R.D. (2009). *The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in Arabidopsis by controlling type-2 ACC synthase levels*. Plant J. 2009; 57:332–345

De Giorgio, L. 2012. What-is-happening-to-the-world-s-vanilla-trade.

Consulta digital, Septiembre de 2015:

<http://www.thestar.com/news/world/article/1172433--what-is-happening-to-the-world-s-vanilla-trade>

Dignum, M.J.W., Van Der Heijden, R., Kerler, J., Winkel, C., & Verpoorte, R. (2004). *Identification of glucosides in green beans of Vanilla planifolia Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase*. Food Chemistry 85 (2): 199–205.

Freeman, S., (2009). *Biología*. 3° edición. Pearson Educación, S. A., Madrid. España. 1391p.

Gagne, J.M., Smalle, J., Gingerich, D.J., Walker, J.M., Yoo, S.D., Yanagisawa, S. & Vierstra, R.D. (2004). *Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.. 101:6803–6808.

García, P. H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG. 1(2):31-41.

Gasteiger, E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. & Bairoch A. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. Capítulo 52. En: Walker J. M. (Ed): The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press. 571-607.

Gigant, R., Bory, S., Grisoni M. & Besse P. (2011). *Biodiversity and evolution in the Vanilla genus*. En: Grillo O. & G. Venora (Eds). *The dynamical processes of biodiversity - case studies of evolution and spatial distribution*. InTech.

González-Andrade, M., Silva D.A., Hernández R. I., Vázquez C. E. & Sosa P. A. (2005). *La Estructura y la Visualización Molecular de Proteínas*. En: González-Andrade, M., Silva D.A., Hernández R. I., Vázquez C. E., Sosa P. A. Flores, H. O., Rendón H. E., Riveros R. H., Sosa P. A., Vázquez C. E. & Velázquez López (Eds). *Mensaje Bioquímico*. 29: 157-180.

Havkin-Frenkel, D., French, J.C., Graft, N.M., Pak, F.E., Frenkel, C. & Joel, D.M. (2004). *Interrelation of Curing and Botany in Vanilla (Vanilla planifolia) bean*. *Acta Hort* 629:93-102.

Hernández, H. J. (2011). *Vainilla_ establecimiento.pdf*.
Consulta digital, Septiembre 2015:
http://www.inifap.gob.mx/Documents/inicio/paquetes/vainilla_establecimiento.pdf

Hernández-Quezada D.I., Arévalo-Gallegos S., Betancourte-Guerra D.A., Aguado-Santacruz A., Siqueiros-Cendón T., Rivera-Chavira B., Nevárez Moorillon G. V. & Rascón-Cruz Q. (2011). *Método para la extracción de ADN cloroplastídico de Bouteloua gracilis como herramienta para aplicaciones moleculares*. *TECNOCENCIA*. 5(3): 132-139.

Hernández, S. A., García H.E. & Rodríguez R. A. (1999). *Celulosomas: Sistemas Multienzimáticos*. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 43 (3-4):137-142.

Herrera, J., Alizaga R., Guevara E. & Jiménez V. (2006). *Germinación y crecimiento de la planta. Vol. 4*. En: Villalobos R. E. (Ed.) *Fisiología de la producción de los cultivos tropicales*. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 113 p.

Herrera-Cabrera, B.E., Salazar-Rojas, V.M., Delgado-Alvarado, A., Campos-Contreras J.E. & Cervantes-Vargas J. (2012). *Use and conservation of Vanilla planifolia J. in the Totonacapan Region, México*. *European Journal of Environmental Sciences* 2(1):43-50.

Hua, J., Sakai H., Nourizadeh S., Chen Q.G., Bleecker A.B., Ecker J.R. & Meyerowitz E.M. (1998). *EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1321-1332.

Illumina. (2015). *An Introduction to Next- Generation Sequencing Technology*.
Consulta digital, Octubre 2015:
<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>

Jordán M., & Casaretto J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. Capítulo XVI*. En: Squeo F.A. & Cardemil L., (Eds.). *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Ju, C. & Chang C. (2012). *Advances in ethylene signalling: protein complexes at the endoplasmic reticulum membrane*. AoB PLANTS. Ethylene 2012: 1-12.

Kearse, M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T.†, Ashton B., Meintjes P. & Drummond A. (2012). *Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. Bioinformatics. 28 (12): 1647–1649.

Klimes, I. & Lamparasky. D. (1976). *Vanilla volatiles a comprehensive analysis*. Int Flavour Food Addit. 7:272-291.

Koekoek, F. J. (2005). *The Natural Vanilla Markets; with special attention for the Organic segment. Summary of a market study*. EPOPA. Netherlands.

Köhler, H. A. (1888). *Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte* Tomo II. Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. G. Pabst (Ed.). Editorial de Franz Eugen Köhler. Gera Unterhaus. Alemania. 200 p.

Kushad, M. M., Richardson D. G. & Ferro A. J. (1985). *5'-Methylthioadenosine Nucleosidase and 5-Methylthioribose Kinase Activities and Ethylene Production during Tomato Fruit Development and Ripening*. Plant Physiol. 79: 525-529.

Laresse, E., Jobet E., Llauro C. & Delseny M. (2008). *AtERF38 (At2g35700)*, an AP2/ERF family transcription factor gene from *Arabidopsis thaliana*, is expressed in specific cell types of roots, stems and seeds that undergo suberization. Plant Physiology and Biochemistry. 46:1051-1061.

Lewis, M. W., Leslie, M. E. & Liljegren, S. J. (2006). *Plant separation: 50 ways to leave your mother*. Curr Opin Plant Biol 9(1): 59-65.

Li, H.M., Rotter D., Hartman T.G., Pak F.E., Havkin-Frenkel D. & Belanger F.C. (2006). *Evolution of novel O-methyltransferases from the Vanilla planifolia caffeic acid O-methyltransferase*. Plant Mol. Biol. 61:537-552.

Life Technologies. (2002). SilverQuest™ Silver Staining Kit. 26 p.

Liljegren, S., Ditta, G., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J., Yanofsky, M. (2000). *Control of fruit dehiscence in Arabidopsis by the SHATTERPROOF MADS-box genes*. Nature. 404: 766-769.

Lin Z., Zhong S. & Grierson D. (2009). *Recent advances in ethylene research*. Journal of Experimental Botany. 60(12): 3311–3336.

Liscum, E. & Reed J.W. (2002). *Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development*. Plant Mol. Biol. 49:387-400.

Liu, H.C., Do Y.Y., Huang P.L. (2000). *Molecular Cloning and Characterization of cDNAs Encoding Ethylene Receptor Homologs from Oncidium*. Registrado en la base de datos EMBL/GenBank/DDBJ.

Liu, Q, Xu C. & Wen C.K. (2010). *Genetic and transformation studies reveal negative regulation of ERS1 ethylene receptor signaling in Arabidopsis*. BMC Plant Biology. 10 (60): 1-14.

Lodish, H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L. & Darnell J. (2005). *Biología Celular y Molecular y. 5^{era} edición*. Buenos Aires. Médica Panamericana. 1088 p.

Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J., Seung-Chul, K. & Gómez-Pompa A. 2008. *Origin and Dispersal of Cultivated Vanilla (Vanilla planifolia Jacks. [Orchidaceae]*. Economic Botany, 62(2): 127-138.

Merelo C. P. (2011). *Aproximación genómica al estudio de la abscisión de frutos cítricos: análisis transcriptómico de la zona de abscisión C*. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 282 p.

Mojica, T., Sánchez O., & Bobadilla, L. (2003). *La proteómica. La otra cara de la genómica*. Nova. 1(1):12-6.

Morales, S.S., Becerril R. A. E., Tijerina C. L. & Santizo R. J. A. (2001). *Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz*. Fitotec. 24 (1): 49-56.

Nagpal, P., Ellis C.M., Weber H., Ploense S.E., Barkawi L.S., Guilfoyle T.J., Hagen G., Alonso J.M., Cohen J.D., Farmer E.E., Ecker J.R., Reed J.W. (2005). *Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation*. Development. 132:4107-4118.

Nakano, T., Suzuki K., Fujimura T. & Shinshi H. (2006). *Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice*. Plant Physiol. 140:411-432.

Odoux, E., Chauwin, A. & Brillouet J.M. (2003). *Purification and characterization of vanilla vean (Vanilla planifolia Andrews) beta D-glucosidase*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 3168-3173.

Ogata, H., Goto S., Sato K., Fujibuchi W., Bono H. & Kanehisa M. (1999). *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Nucleic Acids Research. 27(1): 29:34.

Osorio, M A. I. (2012). *Efecto de materiales orgánicos, fertilizantes e inóculos microbiales sobre el crecimiento y nutrición de plántulas de vainilla (Vanilla planifolia Jacks)*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 80 p.

Palama, T. L., Menard, P., Fock, I., Choi, Y. H., Bourdon, E., Govinden-Soulange, J., Bahut, M., Payet, B., Verpoorte, R. & Kodja, H. (2010). *Research article Shoot differentiation from protocorm callus cultures of Vanilla planifolia (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage*. BMC Plant Biology. 10:82-100.

Pan, Y., Gong W., Liu D., Fu Q., Mei W.Q., Song W.Q., Ma L.G., Luo J.C., Deng X.W., Zhu Y.X. (2004). *Molecular cloning, expression, phylogenetic and functional characterization of the Arabidopsis AP2/EREBP transcription factor family*. Registrado en la base de datos EMBL/GenBank/DDBJ.

Pando, R.V. & Ferreira B.C. (2015). *Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas*. Capítulo 9. En: López A. & Rebolledo F. (Eds). Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología-UNAM.

Pardo, A. (2008). *Metaloproteasas de matriz en la remodelación aberrante de la fibrosis pulmonar*. En: Bustos, J. I., Castañeda P. C., Oria H. J., Rendón H. E., Reyes V. H. & Romero A. I (Eds). Mensaje Bioquímico. 32:39-48.

Parra, Q.R.A (1987). *Cultivo in vitro y Anatomía de Óvulos de Vainilla (Vanilla planifolia Andrews)*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México. 104 p.

Patterson, S.E. (2001). *Cutting loose: abscission and dehiscence in Arabidopsis*. Plant Physiol 126: 494–500.

Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodríguez-Jiménez, G., Robles-Olvera, V., García-Alvarado, M.A. & Günata, Z. (2006). *GC-MS and GC olfactometry analysis of aroma compounds in a representative aroma extract from cured vanilla (Vanilla planifolia) beans*. Food Chemistry. 99:728-735.

Pláteník, J. (2009). *Electrophoresis in Biochemistry*. Institute of Medical Biochemistry. Charles University. Praga.

Consulta digital, Septiembre 2015:

<http://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1593/electrophoresis.pdf>

Portis Jr, A. R. (2001). *RuBisCO*. Encyclopedia of Life Sciences Group.

Consulta digital, Noviembre 2015:

<http://rubisco.ugr.es/fisiofar/pagwebinmalcb/contenidos/Tema07/rubisco.pdf>

Ranadive, A. (1992). *Vainillin and related flavour compounds in Vanilla extracts made from beans of various origins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40:1922-1924.

Raven P. H., Evert R. & Eichhorn S. E. (1992). *Biología de las Plantas*. Vol II. Ed. Reverté. España. 777 p.

Reed, J.W. (2001). *Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis*. TRENDS in Plant Science 6(9):420-425.

Reinstein, E. (2006). *Narrative Review: Protein Degradation and Human Diseases: The Ubiquitin Connection*. Ann Intern Med. 145:676-684.

Rocha-Sosa, M. (2013). *El Sistema Ubicuitina/Proteasoma en la interacción planta-patógeno*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 16(2):121-131.

Roberts, J.A., Whitelaw, C., González-Carranza, Z.H., & MacManus, M.T. (2000) *Cell Separation Processes in Plants: Models, Mechanisms and Manipulation*. Annals of Botany 86: 223-235.

Rodolphe, G., Séverine B., Michel G. & Pascale B. (2011). *Biodiversity and Evolution in the Vanilla genus*. En: Grillo O. ., (Ed). The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution
Consulta digital, Agosto 2015:

<http://www.intechopen.com/books/the-dynamical-processes-of-biodiversity-case-studies-of-evolution-and-spatial-distribution/biodiversity-and-evolution-in-the-vanilla-genus>.

SAGARPA. (2012). *Plan Rector Sistema Producto Vainilla Estado De Puebla*. 57 p.

Salazar-Rojas, V.M., Herrera-Cabrera, B.E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-González, F., & Cobos-Peralta M. (2011). *Chemotypical variation in Vanilla planifolia Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region*. Genetic Resources and Crop Evolution. 59 (5):875-887.

Salazar R. V.M. (2011). *Estrategia de uso y conservación del germoplasma de Vainilla planifolia Jack. en la región Totonacapan Puebla-Veracruz*. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Puebla, Puebla. México. 135 p.

Santos, H.L. (2008). *Identificación de inhibidores de proteasas en semillas de plantas silvestres de zonas semiáridas*. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 65 p.

Shagger, H & Von-Jagow, G. (1987). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem. 166: 368-379.

Shamina, A. (2008). *Vanilla*. En: Parthasarathy, V.A., Chempakam, B. & Zachariah, T.J. (Eds). Chemistry of Spices. India. CABI. 445 p.

Solano, R., Stepanova A., Chao Q.M. & Ecker J.R. (1998). *Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1*. Genes & Development. 12: 3703–3714.

Soto A. M. A. (1999). *Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas en México*. Instituto Chinoín A.C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. México D.F.
Consulta digital, Agosto 2015 en:
<http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>

Soto, A. M.A. (2006). *La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo*. CONABIO. Biodiversitas 66:1-9.

Soto, A. M.A & Cribb P. (2010). *A new infrageneric classification and synopsis of the genus Vanilla Plum. ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae)*. Lankesteriana 9(3): 355-398.

Soto, A. M.A. & Dressler R. L. (2010). *A revision of the Mexican and Central American species of Vanilla Plumier ex Miller with a characterization of their region of the nuclear ribosomal DNA*. Lankesteriana 9(3): 285-354.

Taiz, L. & Zeiger E. (2006). *Fisiología vegetal*. Vol. II. Universidad Jaume Publicaciones. 3° Ed. España. 1343p.

Theologis, A. (1998). *Ethylene signaling: Redundant receptors all have their say*. Curr. Biol. 8:R875-R878.

Van Doorn, W.B. & Stead A. D. (1997). *Abscission of flowers and floral parts*. Journal of Experimental Botany. 48(309): 821-837.

Vivar, T.M.V. (2004). *Germinación y propagación de Vanilla planifolia (vainilla Andrews) in vitro*". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. 42p.

Wang, W.Y, Hall A.E., O'Malley R., Bleecker A.B.(2003). *Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 100: 352–357.

Weber H. & Hellmann H. (2009). *Arabidopsis thaliana BTB/ POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family*. FEBS J. 276:6624-6635.

Woodward A.W. & Bonnie B. (2005). *A Receptor for Auxin*. The Plant Cell. 17:2425-2429.

Yábar, V. C. (2003). *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Serie de Normas Técnicas; 38. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Lima. 59 p.

Zhang, H. (2002). *Protein Tertiary Structures: Prediction from Amino Acid Sequences*. Encyclopedia of Life Sciences. MacMillan Publishers Ltd.

Consulta digital, Agosto 2015:

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.119.3599&rep=rep1&type=pdf>

Zou, Y., Zhang L., Rao S., Zhu X., Ye L., & Chen W. & Li X. (2014) *The Relationship between the Expression of Ethylene-Related Genes and Papaya Fruit Ripening Disorder Caused by Chilling Injury*. PLoS ONE 9(12):1-24.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Consulta digital, Noviembre 2015

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/839143

Consulta digital, Julio 2015

www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0000155

Consulta digital, Noviembre 2015

www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0004553

Consulta digital, Noviembre 2015

www.geneious.com

Consulta digital, Octubre 2015