



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS Y VALIDACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE ABSCISIÓN PREMATURA DEL FRUTO DE *Vanilla planifolia* G. Jacks (Orchidaceae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biol. Claudia Verónica Granados Hernández

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
FES Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Estela Sandoval Zapotitla
Instituto de Biología, UNAM

Dr. César Mateo Flores Ortiz
FES Iztacala, UNAM

México, CDMX., Junio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

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.





OFICIO CPCB/064/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de noviembre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GRANADOS HERNANDEZ CLAUDIA VERONICA**, con número de cuenta 304042069, con la tesis titulada "Análisis y validación de genes involucrados en el proceso de abscisión prematura del fruto de *Vanilla planifolia* G. Jack (Orchidaceae)", realizada bajo la dirección del **DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS**:

Presidente:	DR.	VICTOR MANUEL SALAZAR ROJAS
Vocal:	M. en C.	JOSEFINA VÁZQUEZ MEDRANO
Secretario:	DRA.	ESTELA SANDOVAL ZAPOTITLA
Suplente:	DR.	OSWALDO VALDÉS LÓPEZ
Suplente:	DR.	ELIAS PIEDRA IBARRA

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de enero de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)





AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por permitirme realizar mis estudios de Maestría, y el apoyo al desarrollo de esta investigación.

- ❖ Al CONACYT por su apoyo con la beca de manutención (no. 453904) recibida en el periodo 2016-2018 01/08/2016 31/07/2018.

- ❖ Esta investigación fue apoyada por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (SEP-CONACYT), Convocatoria de Investigación Científica Básica 2015, Proyecto 255952.

- ❖ Mi más sincero y profundo agradecimiento a mi tutor, el Doctor Jorge Campos. Por su asesoría, tiempo, orientación, comprensión, amistad, dedicación y paciencia; por compartir sus conocimientos y amplia experiencia académica conmigo.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

- ❖ Al Dr. César Mateo Flores Ortiz, por su comprensión, asesoría y apoyo durante el Posgrado y en la realización de esta tesis y por compartir sus conocimientos conmigo.

- ❖ A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla, por su apoyo y asesoría en la realización de tesis y durante la investigación y por compartir sus conocimientos conmigo; por su amistad, comprensión, consejos y agradables experiencias en campo.





AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a mi familia por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado. Especialmente a mi mamá por el apoyo incondicional, por acompañarme, por los cuidados y consejos. A Alejandro, mi hermano, por apoyarme, ayudarme; ser mi mayor motivación; mi cómplice y compañero. A mi tía Graciela, por el cariño y los consejos acertados y objetivos.

A las familias Oriza, y Aldape, quienes me han apoyado y adoptado como parte de su familia y asistido en varios aspectos. A mis padrinos Silvia y Gabriel por apoyarme y guiarme. A Hugo A., por el cariño, apoyo y las conversaciones sumamente enriquecedoras y formativas en todos los aspectos.

Héctor, muchas gracias por inspirarme, apoyarme, alentarme y motivarme, sobre todo en los momentos más difíciles; por el apoyo, cariño, cuidados y comprensión.

Muchas gracias a todos mis compañeros y amigos que me han acompañado en este camino. Uziel, gracias por tu amistad y ayudarme a vislumbrar nuevos proyectos con sentido y causa. A mis amigos de la infancia Jacob, Julio, Javier y Salvador, por la amistad, el cariño y apoyo. Isaac, gracias por las amenas y reconfortantes charlas. A Manuel por la motivación, comprensión y apoyo.

Carlos A., muchas gracias por tu amistad incondicional, confianza, comprensión, y apoyo constante. Agradezco tus palabras sinceras, consejos, poder contar contigo, que me alientas y ayudas a sortear los obstáculos y me retas a tener nuevos objetivos. Gracias por regresar siempre a pesar de las circunstancias.

A mis compañeros y amigos colegas por compartir conmigo alegrías, desvelos, frustraciones y triunfos. A Omar F., Joel, Hugo y Marco. A Jonathan por tu amistad y cariño, por estar siempre dispuesto a escucharme y ayudarme; a Sofi por motivarme a ser buena persona y ejemplo. A Omar C., por contagiarme tu optimismo y brindarme tu apoyo y amistad en momentos difíciles.

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, acompañarme y darme la confianza de poder compartir contigo todo tipo de comentarios y situaciones.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y UBIPRO: 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, las risas y la grata convivencia. Andy, Karen, Nelly y Alex C., gracias por además por apoyarme y ser mis confidentes. A Andy por tus palabras de aliento y siempre recordarme que vale la pena decidirse por lo correcto. Luis, gracias por ayudarme a mantener la cordura y el humor. Salva, agradezco tu amistad sincera, tu cuidado hacia mi persona en varios aspectos y por tu apoyo.



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 Jurado de este proyecto de investigación:

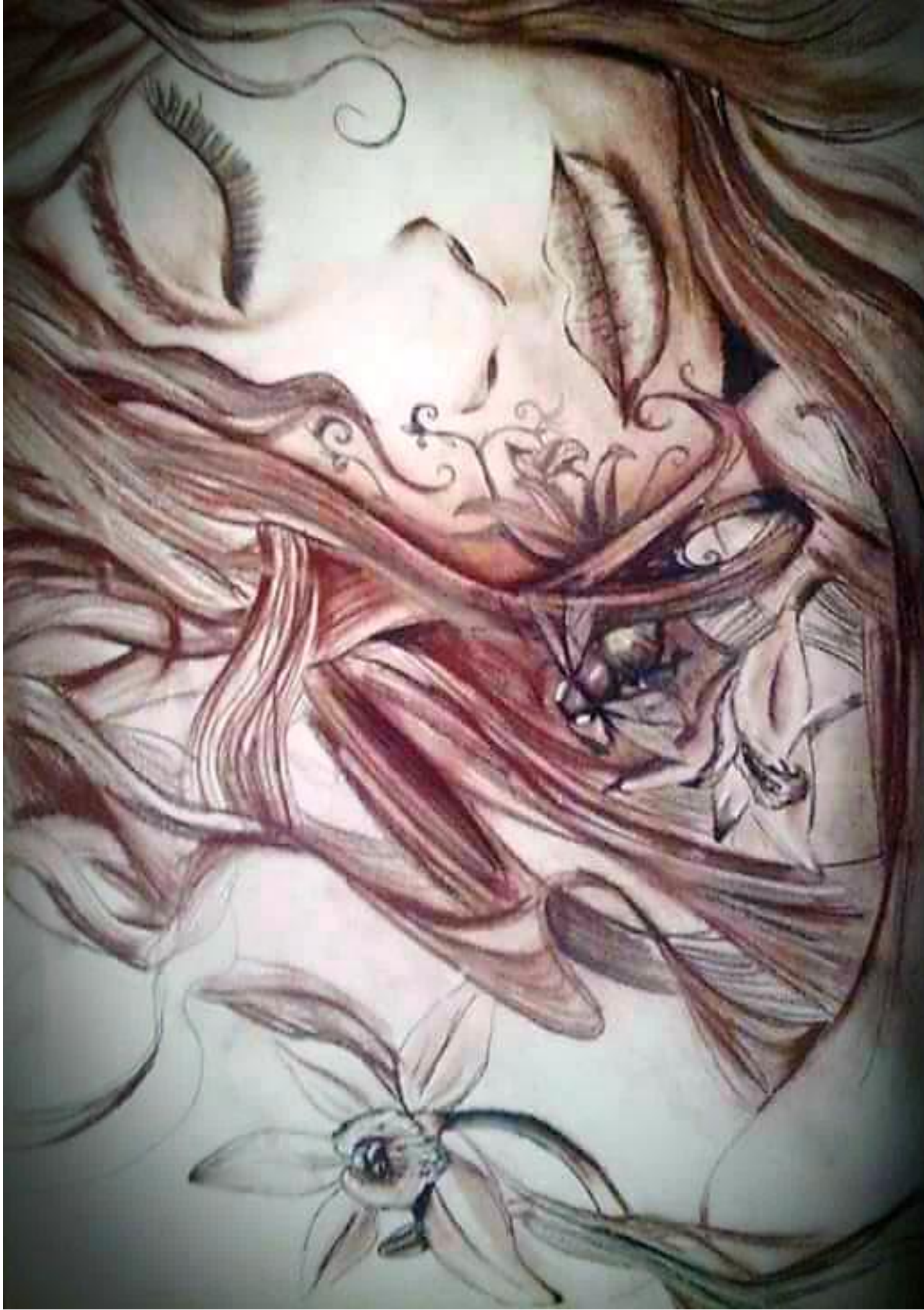
Al Doctor Víctor Salazar. Gracias por despertar en mí admiración y deseo de aprendizaje al compartir conmigo sus conocimientos y la visión tan amplia y particular que tiene de los aspectos biológicos y de la vida en general. Por su asesoría, observaciones, críticas constructivas y consejos. Le agradezco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

Agradezco a la M. en C. Josefina Vázquez Medrano y el Dr. Elías Piedra Ibarra por compartir sus conocimientos y observaciones conmigo, por siempre ser asequibles y amables conmigo y abrirme las puertas de su laboratorio para hacer uso del equipo para realizar este proyecto de investigación. Al Dr. Oswaldo Valdés López por sus comentarios y observaciones que contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

M. en C. Alejandro Monsalvo gracias 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 Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), ya que a través de la Coordinación General del Servicio Meteorológico Nacional (CGSMN), me facilitó los datos meteorológicos de los años 2016 y 2017, haciendo posible parte de la discusión de los resultados obtenidos en esta investigación. Al Macroproyecto de Investigación Aplicada a Vainilla y a los productores: Sr. Miguel Acosta y familia y Sr. Edilberto Gallegos (†) y familia por su apoyo y compartir sus conocimientos y experiencia.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron a que yo pudiera completar mi formación en el Posgrado.







Para Ana María, Marina y Alejandro

*“En tiempos de cambio, quienes estén abiertos al aprendizaje se adueñarán del futuro,
mientras que aquellos que creen saberlo todo estarán bien equipados para un mundo que ya no existe”.*

Eric Hoffer

Ilustración: Víctor Manuel Salazar Rojas





ÍNDICE GENERAL

	Pág
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Generalidades de <i>Vanilla planifolia</i>	9
2.2. Importancia de <i>Vanilla planifolia</i>	15
2.3. El proceso de abscisión	17
2.3.1. Vías de señalización en el proceso de abscisión	20
2.3.1.1. Vía dependiente de la señalización del etileno	21
2.3.1.1.1. <u>Genes de respuesta a etileno</u>	21
2.3.1.1.2. <u>Genes que intervienen en la biosíntesis de etileno</u>	22
2.3.1.2. Vía semi-independiente de la señalización del etileno	23
2.3.1.2.1. <u>Genes que codifican factores de transcripción de la vía semi-independiente de la señalización por etileno</u>	24
2.3.1.3. Genes que codifican enzimas degradadoras de pared celular	25
2.3.2. <i>Problemática en Vanila planifolia por abscisión del ovario no fertilizado</i>	25
2.4. Análisis de la expresión génica diferencial por Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	26
2.5. Análisis de conglomerados y su representación gráfica: <i>heat map</i>	28
2.6. Análisis de Componentes Principales	28
3. ANTECEDENTES	30
3.1. Quimiotipos y genotipos en <i>Vanilla planifolia</i>	30
3.2. Ovario, fruto y síndrome de post-polinización en <i>Vanilla planifolia</i>	32
3.3. Tejido de unión entre raquis y ovario/fruto en <i>Vanilla planifolia</i>	36
3.4. Comparación diferencial de la expresión génica (transcriptoma) durante el proceso de abscisión en <i>Vanilla planifolia</i>	37
3.5. Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de abscisión en <i>Vanilla planifolia</i>	39
3.6. Ruta de señalización hormonal y molecular en la abscisión entre tejidos	41
3.7. Genes que intervienen en el proceso de abscisión	42
3.7.1. Vía dependiente de la señalización del etileno	42
3.7.1.1. <u>Genes de respuesta a etileno</u>	42
3.7.1.2. <u>Genes que intervienen en la biosíntesis de etileno</u>	43
3.7.1.3. <u>Las condiciones ambientales y el estrés intervienen en la regulación de estos genes y modifican su expresión</u>	43
3.7.2. Vía semi-independiente de la señalización del etileno	44
3.7.3. Genes que codifican enzimas degradadoras de pared celular	45
3.8. Análisis de expresión diferencial de genes en <i>Vanilla planifolia</i> , mediante PCR cuantitativa	45
4. JUSTIFICACIÓN	46
5. HIPÓTESIS	46
6. OBJETIVOS	47
6.1. Objetivo general	47
6.2. Objetivos particulares	47



7. MATERIAL Y MÉTODOS	48
7.1. Selección de genes a analizar	48
7.2. Diseño de <i>primers</i>	49
7.3. Material biológico	50
7.4. Extracción de ARN total	50
7.5. Síntesis del cDNA	50
7.6. Verificación de hibridación <i>primers</i> diseñados / cDNA y amplificación de los genes	52
7.7. PCR en tiempo real (qRT-PCR)	53
7.8. Análisis de resultados	53
7.9. Relación de los resultados de ER con las condiciones climáticas de cada año	53
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
8.1. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión relativa entre los genes de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i>	54
8.1.1. Vía dependiente de la señalización del etileno	56
<u>8.1.1.1. Genes de respuesta a etileno</u>	56
<u>8.1.1.2. Genes de regulación de biosíntesis de etileno</u>	61
8.1.2. Vía semi-independiente de la señalización del etileno	62
8.1.3. <i>VpXTH3</i> , gen que codifica una enzima degradadora de pared celular	63
8.2. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i> , entre años	64
8.3. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i> , entre genotipos	66
8.4. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i> , entre tejidos	69
8.5. Modelo propuesto de expresión de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no polinizado de <i>Vanilla planifolia</i>	75
9. CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS Y APLICACIONES	83
LITERATURA CITADA	84
ANEXOS	97
ANEXO 1. Valores de Expresión Relativa de los genes relacionados con el proceso de abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i>	97
ANEXO 2. Secuencias contrastadas con el transcriptoma de <i>V. planifolia</i> para el diseño de <i>primers</i> para el análisis de ER de genes relacionados con el proceso de abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i>	97
ANEXO 3. Información meteorológica de los sitios de colecta del material utilizado para el análisis de la ER de genes relacionados con el proceso de abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i> (SNN, CONAGUA)	98



Índice de figuras y cuadros

Figuras	Página
Figura 1. Estructura de la planta de <i>Vanilla planifolia</i>	11
Figura 2. Esquema de las estructuras de <i>Vanilla planifolia</i>	13
Figura 3. Distribución conocida de <i>Vanilla planifolia</i> en México	15
Figura 4. Principales hormonas involucradas en el proceso de abscisión	18
Figura 5. Etapas de abscisión	19
Figura 6. Modelo de la transducción de señales del etileno	23
Figura 7. Ciclo de Yang y biosíntesis del etileno	23
Figura 8. Genes de la vía semi-independiente de la señalización por etileno en la abscisión floral	24
Figura 9. Dendrograma de colectas de <i>Vanilla planifolia</i> en la región Totonacapan, Puebla-Veracruz, México, basado en el promedio de 13 loci microsatélites y agrupamiento por distancias de similitud	32
Figura 10. Gráfico comparativo de los niveles de expresión del gen ARF8 en los genotipos CH-I y CH-VI en diferentes tiempos y etapas en la transición de flor a fruto en <i>Vanilla planifolia</i>	35
Figura 11. Zona unión entre el raquis y ovario/fruto en <i>Vanilla planifolia</i>	37
Figura 12. Comparación diferencial de la expresión genética (transcriptoma) durante el proceso de abscisión en <i>Vanilla planifolia</i>	38
Figura 13. Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de abscisión en <i>Vanilla planifolia</i>	40
Figura 14. Diseño experimental para el análisis de expresión de genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no fertilizado de <i>Vanilla planifolia</i>	48
Figura 15. Métodos utilizados en el análisis de expresión de genes implicados en la abscisión del ovario no fertilizado en <i>Vanilla planifolia</i>	48
Figura 16. Tejidos colectados para el análisis de genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no fertilizado de <i>Vanilla planifolia</i>	52
Figura 17. Expresión Relativa de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no fertilizado de <i>Vanilla planifolia</i>	55
Figura 18. <i>Heat map</i> de la Expresión Relativa de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no fertilizado de <i>Vanilla planifolia</i>	57
Figura 19. Gráfico de doble proyección del Análisis de Componentes Principales de la Expresión Relativa de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no fertilizado de <i>Vanilla planifolia</i>	59
Figura 20. Diagrama esquemático de la regulación de la adhesión de la flor y el fruto en las ZAs de tomate	72
Figura 21. Modelo propuesto de expresión de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no polinizado de <i>Vanilla planifolia</i>	77 y 79



Cuadros

Cuadro 1. Principales características de los quimiotipos de <i>V. planifolia</i> en la región Totonacapan, Puebla-Veracruz y localidades complementarias	31
Cuadro 2. Características de los <i>primers</i> diseñados para el análisis de la ER de los genes relacionados con la abscisión de ovario no fertilizado en <i>V. planifolia</i>	51



ABREVIATURAS

- 2D-SDS-PAGE**- Del inglés, Two Dimensions- Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis de dos dimensiones-SDS en geles de poliacrilamida)
- 4CL**- Del inglés, 4-coumarate-Coenzyme A Ligase (4-coumarato-Coenzima A Ligasa)
- 4HBS**- Del inglés, 4-HydroxyBenzaldehyde Synthase (4-HidroxiBenzaldehído Sintasa)
- ABA**- Ácido abscísico
- ACC**- Ácido 1-Aminociclopropano-1- Carboxílico
- ACO (1/2/ 3)- ACC Oxidasa 1 /2/3** (Ácido 1-Aminociclopropano-1- Carboxílico Oxidasa 1/2 /3)
- ACP**- Análisis de Componentes Principales
- ACS (1 /2)- ACC sintasa 2** (Ácido 1-Aminociclopropano-1- Carboxílico Sintasa 1/2)
- ACS1-1 y ACS1-2**- Alelos 1 y 2 del gen ACS1, (alelos 1 y 2 del gen Ácido 1-Aminociclopropano-1- Carboxílico Sintasa 1)
- ACS1-1/-1**- Homocigoto para el alelo ACS1-1 (alelo 1 del gen Ácido 1-Aminociclopropano-1- Carboxílico Sintasa 1)
- ACT**- Actina
- AdoMet**- S-adenosilmetionina
- AIL (1/6)**- Del inglés, AP2-like ethylene-responsive transcription factor 1/6 (APETALA 2- like ethylene-responsive transcription factor 1 y 6) (Factor de transcripción de respuesta a etileno tipo APETALA 2, 1/6)
- AJ**- Ácido Jasmónico
- AP (2)**- APETALA 2
- ARF (6/8)**- Del inglés, Auxin Response Factor 6/8 (Factor de respuesta a auxina 6/8)
- βGLU(46)**- Del inglés, Beta-glucosidase 46 (Beta-glucosidasa 46)
- BLAST**- Del inglés, Basic Local Alignment Search Tool
- BOP (1/2)** – Blade On Petiole 1/2
- C4H**- Del inglés, Cinnamate-4-Hydroxylase (Cinamato-4-hidroxilasa)
- cDNA**- Del inglés, complementary Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico complementario)
- CTR1**- Del inglés, Constitutive Triple Response 1
- DDA**- Día(s) Después de la Antesis
- ddp** - día(s) después de la polinización
- DNA**- Del inglés, DeoxyRibonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- dNTPs**- Del inglés, deoxynucleotide triphosphates (desoxirribonucleótidos trifosfatados)
- ED**- Expresión Diferencial
- EDF (1/2/3/4)**-Del inglés, Ethylene Response DNA-Binding Factor 1/2/3/4 (Factor de unión al ADN de respuesta a etileno 1/2/3/4)
- EIL (172/3)**- Del inglés, Ethylene Insensitive 3-like (1/2/3) (Tipo Insensible a Etileno 3. 1/2/3/4)



EIN (2/3/4)- Del inglés, Ethylene Insensitive 2/3/4 (Insensible a Etileno 2/3/4)

ER- Expresión Relativa

ER4- Del inglés, Ethylene Receptor 4 (Receptor de Etileno 4)

ERF(1/022/038)- Del inglés, Ethylene-Responsive Transcription Factor 1/022/038 (Factor de Respuesta a Etileno 1/022/038)

ERS (1/2)- Del inglés, Ethylene Response Sensor 1/2 (Sensor de Respuesta a Etileno 1/2)

ETO (1)- Del inglés, Ethylene-Overproduction protein 1 (Proteína de sobreproducción de Etileno 1)

ETR (1/2)- Del inglés, Ethylene Receptor 1/2 (Receptor de etileno 1/2)

EXP- Expansinas

FT- Factores de Transcripción

FYF- Del inglés, Forever Young Flower

HAE- HAESA

HGL1- Del inglés, Heteroglycan Glucosidase 1 (Heteroglicano Glucosidasa 1)

His- Histidina

HSL(2)- Del inglés, HAESA-like 2 (Tipo HAESA, 2)

IAA (30)- Del inglés, Indole-3-Acetic Acid Inducible 30 (Inducible por Ácido-3- Indolacético, 30)

KMBA- Del inglés, 2-keto-4-methylthiobutyric acid (Ácido 2-ceto-4-metiltiobutírico)

L-DOP- Del inglés, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-3,4 dihidroxifenilalanina)

mRNA- Del inglés, messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico mensajero)

MTN(2)- Del inglés, 5'-MethylThioadenosine/S-adenosylhomocysteine Nucleosidase 2 (5'-MetilTioadenosina/S-adenosilhomocisteina Nucleosidasa 2)

NCBI- Del inglés, National Center of Biotechnology Information

OMT (2/3)- Del inglés, O-methyltransferase 2/3 (O-metiltransferasa 2/3)

Ov - Ovario adyacente a la Zu (Ovario adyacente a la Zona de unión raquis-ovario/fruto)

PaEIN3L1- Del inglés, Gen ortólogo de EIN3L-1 en *Phalaenopsis aphrodite* Ethylene Insensitive 3-like 1.

PaIAA30L1- Del inglés, Gen ortólogo de IAA30L1 en *Phalaenopsis aphrodite* Indole-3-Acetic Acid Inducible 30-Like 1

PAL- Del inglés, Phenylalanine Ammonia-Lyase (Fenilalanina amonia liasa)

PCR- Del inglés, Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PG- Poligalacturonasa

PL- Pectato liasa

PME- Pectin metilestereasa

qPCR- Del inglés, quantitative Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa)



qRT-PCR- Del inglés, quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcripción Reversa)

RAN1- Del inglés, Ras-Related Nuclear Protein 1

RAP2 (7/13)- Del inglés, Related To Apetala 2, 7/13

RNA- Del inglés, Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

SAM- Del inglés, S- adenosylmethionine (S- adenoilmetionina)

SNPs- Del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de un solo nucleótido)

VpACO3- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *ACO3*

VpEIN3- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *EIN3*

VpERF- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *ERF*

VpERS1- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *ERS1*

VpFYF- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *FYF*

VpHSL2- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *HSL2*

VpVAS1- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *VAS1*

VpXTH3- Gen de *Vanilla planifolia* similar a *XTH3*

UBLCP(1)- Del inglés, Ubiquitin-Like domain-containing CTD Phosphatase Carboxy terminal domain Phosphatase 1

XTH(3)- Del inglés, Xyloglucan Endotransglucosylase/ Hydrolase (3) (Xiloglucano Endotransglucosilasa/ Hidrolasa (3))

ZA- Zona de Abcisión

Zu- Zona de unión raquis-ovario/fruto





RESUMEN

Introducción: La abscisión de ovarios no fertilizados de *Vanilla planifolia*, genera pérdidas de producción de hasta del 90%. Abscisión es la separación tisular y pérdida de órganos vegetales senescentes o maduros, regulada por fitohormonas: auxinas en altas concentraciones la retarda y la alteración de éstas estimula la biosíntesis de etileno, la formación de la zona de abscisión (ZA) y la biosíntesis de enzimas degradadoras de pared celular. El fruto de *V. planifolia* no presenta ZA, se forma un tejido de reforzamiento (genotipo-CH-I) o de separación (genotipo-CH-VI). Diseñar estrategias que disminuyan la pérdida de producción del fruto de vainilla, requiere comprender el mecanismo molecular de abscisión. **Objetivo:** Analizar la expresión relativa de los transcritos de genes relacionados con las vías dependiente (*VpERS1*, *VpEIN3*, *VpERF*, *VpACO3*, *VpVAS1*) y semi-independiente (*VpFYF*, *VpHSL2*) de la señalización del etileno respectivamente y de la enzima degradadora de pared celular (*VpXTH3*) y comparar esta expresión entre las siguientes variables: genotipos (CH I, tolerante, sin abscisión y CH VI, susceptible en condición de abscisión); tejidos (zona de unión raquis-ovario/fruto y Ovario adyacente a esta zona) y años (2016, año con menor cantidad de abscisión y 2017, año con mayor porcentaje de abscisión, para conocer los patrones de expresión de dichos genes en *V. planifolia*. Para obtener la ER mediante qPCR, se diseñaron *primers* para los genes de estas vías y de *VpVAS1* (regulador de rutas hormonales) y *VpXTH3* (enzima degradadora de pared celular). Los resultados se visualizaron mediante *heatmaps* y ACP. **Resultados y discusión:** En 2016 hubo una diferencia en los perfiles de expresión entre los tejidos en el genotipo CH-VI, pero no en el genotipo CH-I. En el Ov del genotipo CH-I y la Zu de ambos genotipos la vía de etileno endógeno esta activa; en el Ov del genotipo CH-VI están activas las vías de etileno exógeno y la semi-independiente de etileno. Para el 2017, la expresión entre tejidos en ambos genotipos es muy similar a la del genotipo CH-VI en 2016. La vía activa en la Zu de ambos genotipos fue la de etileno endógeno; mientras que en los Ov de ambos genotipos, fueron las vías de etileno exógeno y la semi-independiente de etileno. Las condiciones meteorológicas diferentes entre años más importantes fueron la precipitación máxima y total, la evaporación total y los días de máxima temperatura. **Conclusiones:** Debido a que el etileno participa en diversos procesos durante el desarrollo de la planta, estos perfiles de expresión sugieren que en el año 2016, en el genotipo CH-I, el etileno endógeno participa en la señalización de la fertilización e inicio de maduración del fruto, mientras que para CH-VI, los perfiles sugieren una señal de activación de la abscisión. Existe una diferencia de sensibilidad a etileno entre genotipos, tal vez derivada del proceso de selección, (CH-VI más seleccionado y susceptible). En el año 2017, los patrones de expresión son similares al genotipo CH-VI en el 2016, probablemente por que en 2017, la señal de abscisión está presente en ambos genotipos, pero debido a la mayor sensibilidad a etileno del genotipo CH-VI, ocurrió mayor cantidad de abscisión en este genotipo. Los perfiles génicos respaldan la idea de una abscisión de ovario no fertilizado y no la abscisión de fruto en *V. planifolia*. Se presenta un modelo de los patrones de expresión de los genes relacionados con la abscisión de ovario no fertilizado de *V. planifolia*. La señalización por etileno afecta diferentes procesos y su percepción integra diversas señales, por lo que hay otras redes génicas río arriba reguladoras de esta abscisión en *V. planifolia*.

Palabras clave: Abscisión; Etileno; *Vanilla planifolia*; Vía dependiente de etileno; Vía semi-independiente de etileno





ABSTRACT

Introduction: The abscission of non-fertilized ovaries of *Vanilla planifolia*, generates production losses of up to 90%. Abscission is the the separation of senescent or mature plant organs, regulated by phytohormones: auxins in high concentrations prevents abscission and the alteration of these stimulates ethylene biosynthesis, the formation of the abscission zone (ZA) and the biosynthesis of cell wall-degrading enzymes. The fruit of *V. planifolia* has no ZA, in his place a tissue of reinforcement (genotype-CH-I) or separation (genotype-CH-VI) is formed. Designing strategies that reduce the loss of vanilla fruit production requires understanding the molecular mechanism of abscission. **Objective:** Analyze the relative expression of gene transcripts related to the dependent (*VpERS1*, *VpEIN3*, *VpERF*, *VpACO3*, *VpVAS1*) and semi-independent (*VpFYF*, *VpHSL2*) pathways of ethylene signaling respectively and the cell wall-degrading enzyme (*VpXTH3*) and compare the expression between genotypes (CH-I, tolerant, without abscission and CH-VI, susceptible under abscission); tissues (rachis-ovary / fruit and Ovary next to this zone) and years (2016, year with less abscission and 2017, year with more), to find expression patterns of these genes in *V. planifolia*. To obtain the ER by qPCR, primers were designed for the genes of these pathways and *VpVAS1* (regulator of hormonal routes) and *VpXTH3* (cell wall-degrading enzyme). The results were visualized by heatmaps and PCA. **Results and discussion:** In 2016 there was a difference in expression profiles between tissues in the CH-VI genotype, but not in the CH-I genotype. In the Ov of the CH-I genotype and the Zu of both genotypes, the endogenous ethylene pathway is active; in the Ov of the CH-VI genotype, the exogenous ethylene and the semi-independent ethylene pathways are active. For 2017, tissue expression in both genotypes is very similar to that of the CH-VI genotype in 2016. The active pathway in the Zu of both genotypes was endogenous ethylene; while in the Ov of both genotypes, were the ethylene exogenous and semi-independent ethylene pathways. The different meteorological conditions between years were maximum and total precipitation, total evaporation and days of maximum temperature. **Conclusions:** Ethylene participates in various processes during the development of the plant, so these expression profiles suggest that in 2016, in the CH-I genotype, the endogenous ethylene participates in the signaling of fertilization and initiation of maturation of the fruit, whereas for CH-VI, the profiles suggest a signal of activation of the abscission. There is a difference in sensitivity to ethylene between genotypes, perhaps derived from the selection process, (CH-VI more selected and susceptible). In 2017, the expression patterns are similar to the CH-VI genotype in 2016, presumably in 2017, the abscission signal is present in both genotypes, but more abscission occurred in genotype CH-VI, derived from its sensitivity to ethylene. The gene profiles support the idea of a non-fertilized ovary abscission and no fruit abscission in *V. planifolia*. A model of the expression patterns of the genes related to abscission of non-fertilized ovary of *V. planifolia* is shown. Ethylene signaling affects different processes and its perception integrates various signals, so that there are other gene networks upstream regulating this abscission in *V. planifolia*.

Keywords: Abscission; Ethylene; *Vanilla planifolia*; ethylene dependent pathway; semi-independent ethylene pathway.





1. INTRODUCCIÓN

El extracto de *Vanilla planifolia* G. Jack ex Andrews, es uno de los productos más demandados a nivel mundial por las industrias saborizantes, aromatizantes, cosméticas y alimenticias (Morales *et al.*, 2001, Osorio, 2012). Además, es un recurso genético, es decir, es un material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y la agricultura. Este tipo de recursos son conservados y desarrollados por los agricultores de forma tradicional y son la base para desarrollar nuevas variedades y tecnologías (snics.sagarpa.gob.mx).

Durante varios años, *Vanilla planifolia* presentó un incremento de lo que se conoce como abscisión o caída frutos inmaduros. Dicha problemática derivó en una disminución en la producción de vainilla de 90% aproximadamente, siendo hoy la principal causa de la baja producción de este recurso en México. Se estima actualmente un volumen de producción, alrededor de 5 ton de vainilla beneficiada, cuando anteriormente se producía entre 20 a 30 ton anuales. Esta disminución en la producción generó a su vez pérdidas económicas en todos los eslabones que integran el sistema producto vainilla a nivel nacional (Hernández, 2014).

La abscisión es el proceso biológico 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 varios estratos 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 el tejido de abscisión y la síntesis de enzimas degradadoras de pared celular (Niederhuth *et al.*, 2013; Tucker & Kim, 2015).



Un modelo comúnmente citado para la abscisión incluye cuatro pasos básicos: la diferenciación de la ZA; la competencia para responder a las señales de abscisión; la activación de la abscisión y la formación de una capa protectora y trans-diferenciación post-abscisión (Patterson, 2001; Tucker & Kim, 2015; Meir *et al.*, 2019). Existe evidencia de que, aunque este es un modelo conservado, aún entre órganos, existen diversas modificaciones entre plantas (Zhang *et al.*, 2015). Para la transducción de la señal de abscisión, se ha encontrado que existen dos principales vías: la dependiente de la señalización del etileno y la semi-independiente de la señalización del etileno. Dependiendo de la especie, tejido o ante ciertas condiciones es que se expresan los genes de una de las vías (Patterson & Bleecker, 2004; Butenko *et al.*, 2006). Diversos genes participan en cada una de las vías (receptores, segundos mensajeros, factores de transcripción, enzimas y algunos como parte de complejos de regulación).

De manera general se ha observado que el órgano distal a separarse de la planta (fruto, hoja, flor), percibe la maduración o senescencia e inicia la señal de abscisión que se transporta hacia la planta y a la ZA, activando la separación. Esto genera una diferencia en la expresión de los genes relacionados y la subsecuente concentración y acción de las hormonas entre tejidos y órganos (Giovannoni, 2004; Corbacho, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Estos modelos y vías de abscisión han sido descritos para plantas modelo o con importancia comercial. Dado que la familia Orchidaceae tiene importancia principalmente ornamental derivada de la vistosidad de sus flores, se ha estudiado principalmente la senescencia floral y abscisión del perianto y la función del etileno en estos fenómenos (Huda & Wilcock, 2012). No obstante, *V. planifolia* tiene importancia económica por el aprovechamiento de su fruto y no se tienen caracterizadas las rutas génicas que intervienen en la abscisión del ovario sin fertilizar que evita la formación del fruto. En esta orquídea, se han realizado estudios histológicos de la antes llamada Zona de Abscisión, y se han encontrado diferencias entre dos genotipos con comportamiento contrastante ante la abscisión.



El genotipo CH I (tolerante a la abscisión), presenta en dicho tejido la formación de una zona de reforzamiento con alta concentración de lignina, mientras que en el genotipo susceptible (CH VI) se observan menores cantidades de lignina y la presencia de células amorfas; es decir no se forma esta zona de reforzamiento por lo que se produce una zona de separación (Salazar *et al.*, 2016).

También se encontraron diferencias entre genotipos en los perfiles de expresión génica mediante el análisis de transcriptomas, en el genotipo CH I sin abscisión, se observó actividad en las vías de biosíntesis de metabolitos, incluyendo la síntesis de lípidos, lignina y reguladores de crecimiento vegetal, tales como auxinas. En contraste, el genotipo CH VI, bajo condiciones de abscisión presentó una disminución de la actividad en la biosíntesis de metabolitos (i.e. lípidos); un aumento en el metabolismo de etileno y la interrupción de la síntesis de auxinas y lignina (Salazar *et al.*, 2016). Granados (2016), realizó una comparación de la expresión de proteínas en este tejido de frutos en ambos genotipos de *V. planifolia*. Se concluyó que los factores de transcripción asociados a etileno son las proteínas que tienen mayor influencia en el proceso de abscisión de fruto inmaduro en esta planta, debido a la cantidad de posibles proteínas de este tipo que se presentaron y su alta expresión de algunas de ellas.

Además de la abscisión, el etileno regula los fenómenos de post-polinización en orquídeas, incluyendo la maduración de los ovarios y la diferenciación de los óvulos (Primack, 1985; Tsai *et al.*, 2008). A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las angiospermas, la familia Orchidaceae presenta un largo proceso de fertilización que puede tardar entre 45 y 80 días después de la polinización (ddp), dependiendo la especie. Esto se debe a que, en la transición de flor a fruto en las orquídeas, la polinización y la fertilización ocurren en momentos distintos del desarrollo de la planta. El ovario de estas plantas, no tiene óvulos o están inmaduros y es el contacto del polen con el estigma, la señal que activa el desarrollo de los óvulos de manera sincrónica a la elongación del tubo polínico hasta su fertilización (Síndrome Post-polinización) (O'Neill, 1997; O'Neill & Nadeau, 1997; Hernández-Hernández, 2011; Chen, et al., 2018; Hernández-Miranda, 2018). Se desconoce si los frutos de *V. planifolia* son climatéricos o no, sin embargo, se ha encontrado que el etileno es un importante inductor de la madurez en estos (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010; Odoux, 2010).



Por otro lado, Hernández-Miranda y col. (2018) analizaron en diferentes tiempos del desarrollo del ovario de *V. planifolia*, el patrón de expresión del gen sensible a auxinas: *ARF8* (*Auxin Response Factor 8*), el cual estimula la expresión temprana de un gen relacionado con la madurez de óvulos y el desarrollo del fruto. Basados en los patrones de expresión de este gen a lo largo de los tiempos de desarrollo, los autores concluyeron que el evento reconocido como “caída prematura de fruto” corresponde biológicamente con la abscisión de flores no fertilizadas por la interrupción en la transición de flor a fruto.

Sumado a esto, tampoco es correcto referirse a esta caída como “prematura” ya que, la dispersión de semillas de *V. planifolia* es dehiscente por lo que de manera natural, no se cae sino que se rasga o hiende para facilitar el proceso de dispersión de las semillas (Castillo & Engleman, 1993; Vivar, 2004; Soto & Dressler, 2010; Invernón, 2012).

Es necesario comprender el mecanismo molecular que promueve la abscisión de ovarios no fertilizados en *V. planifolia* con el propósito de obtener a mediano plazo estrategias que permitan controlar dicho proceso y así incrementar la productividad del cultivo a nivel nacional y contribuir a la conservación del germoplasma (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012). Por tal razón, el objetivo de este trabajo de investigación fue analizar la expresión relativa de los transcritos de genes relacionados con las vías dependiente (*VpERS1*, *VpEIN3*, *VpERF*, *VpACO3*, *VpVAS1*) y semi-independiente (*VpFYF*, *VpHSL2*) de la señalización del etileno respectivamente y de la enzima degradadora de pared celular (*VpXTH3*) y comparar esta expresión entre las siguientes variables: genotipos (CH I, tolerante, sin abscisión y CH VI, susceptible en condición de abscisión); tejidos (zona de unión raquis-ovario/fruto y Ovario adyacente a esta zona) y años (2016, año con menor cantidad de abscisión y 2017, año con mayor porcentaje de abscisión, para conocer el patrón de expresión de estos genes en *V. planifolia*. Uno de los métodos utilizados para realizar el análisis comparativo de la expresión de genes entre dos situaciones, tejidos o tiempos (o expresión diferencial (ED)) es el de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o cuantitativa (qPCR) que permite el monitoreo de la expresión génica (Derveaux, *et al.*, 2010).



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de *Vanilla planifolia* G. Jacks ex Andrews

Vanilla planifolia pertenece al género *Vanilla* Plumier ex Miller (subfamilia Vanilloideae, Familia Orchidaceae), con 110 especies aproximadamente (Cameron *et al.*, 1999, Lubinsky *et al.*, 2008). 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**) (Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010).

El tallo o bejuco, es carnoso, suculento de color verde oscuro y fotosintético con presencia de estomas (Vivar, 2004; Baltazar, 2010; Soto & Dressler, 2010). Está formado por entrenudos 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. Las secundarias o aéreas 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, suculentas, lustrosas, subsésiles, oblongas- elípticas a lanceoladas con puntas agudas a acuminadas y la base redondeada (**Fig. 1, A; Fig. 2**). El peciolo contiene un jugo viscoso, que al igual que el tallo, es irritante (Arditti *et al.*, 2009; Baltazar, 2010; Soto & Dressler, 2010).

Las inflorescencias son racimos axilares simples con raquis cilíndrico, grueso (**Fig. 1, B; Fig. 2**). 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, primero los de la base y después hacia la parte apical, y sólo perduran hasta medio día; al siguiente día abren nuevas flores. Esta orquídea florece generalmente por primera vez a los tres años de plantada y después anualmente durante un periodo aproximado de dos meses (Vivar, 2004; Castro, 2008; Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010).



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. 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 y los pétalos presentan una forma oblanceolada y algo arqueada. Uno de ellos está modificado y se le denomina labelo, tiene forma de trompeta, muy cóncavo (Soto, 1999; Arditti *et al.*, 2009; Soto & Dressler, 2010).

La columna o ginostemo (**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 es ínfero y cilíndrico (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; la dehiscencia se realiza paulatinamente del ápice hacia la base (**Fig. 1, D**). En su interior contiene varios miles de pequeñas semillas negras y subglobosas (**Fig. 2**) (Castillo & Engleman, 1993; Vivar, 2004; Baltazar, 2010; Soto & Dressler, 2010).

Esta especie presenta se distribuye en los bosques tropicales de los continentes mayores (pantropical) (Soto & Cribb, 2010); 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).

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 (**Fig. 3**) (Soto & Dressler, 2010; Reyes *et al.*, 2014). De la producción nacional de vainilla, el 90% se obtiene 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).

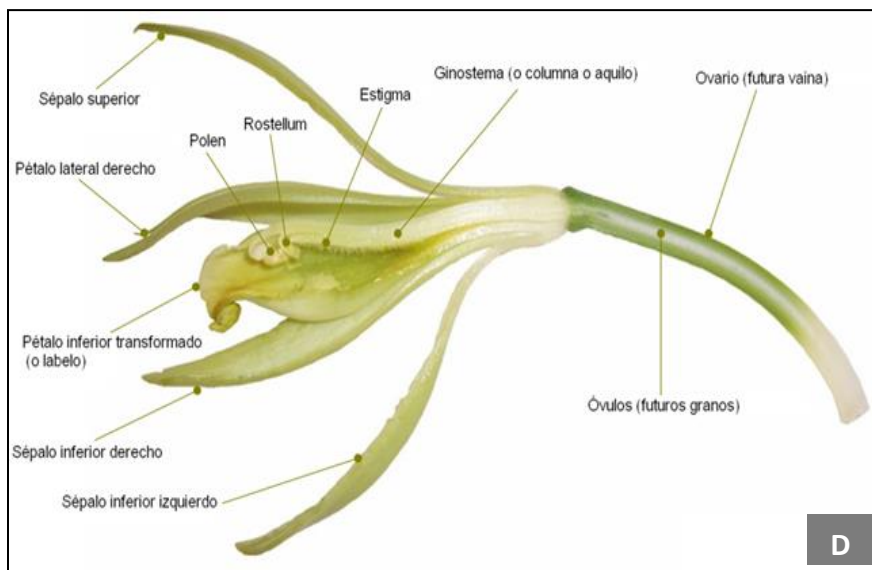


Figura 1. Estructura de la planta de *Vanilla planifolia*.
A. Planta, B. Inflorescencia, Raquis y fruto polinizado. C. Flor, D. Corte longitudinal de flor, E. Fruto



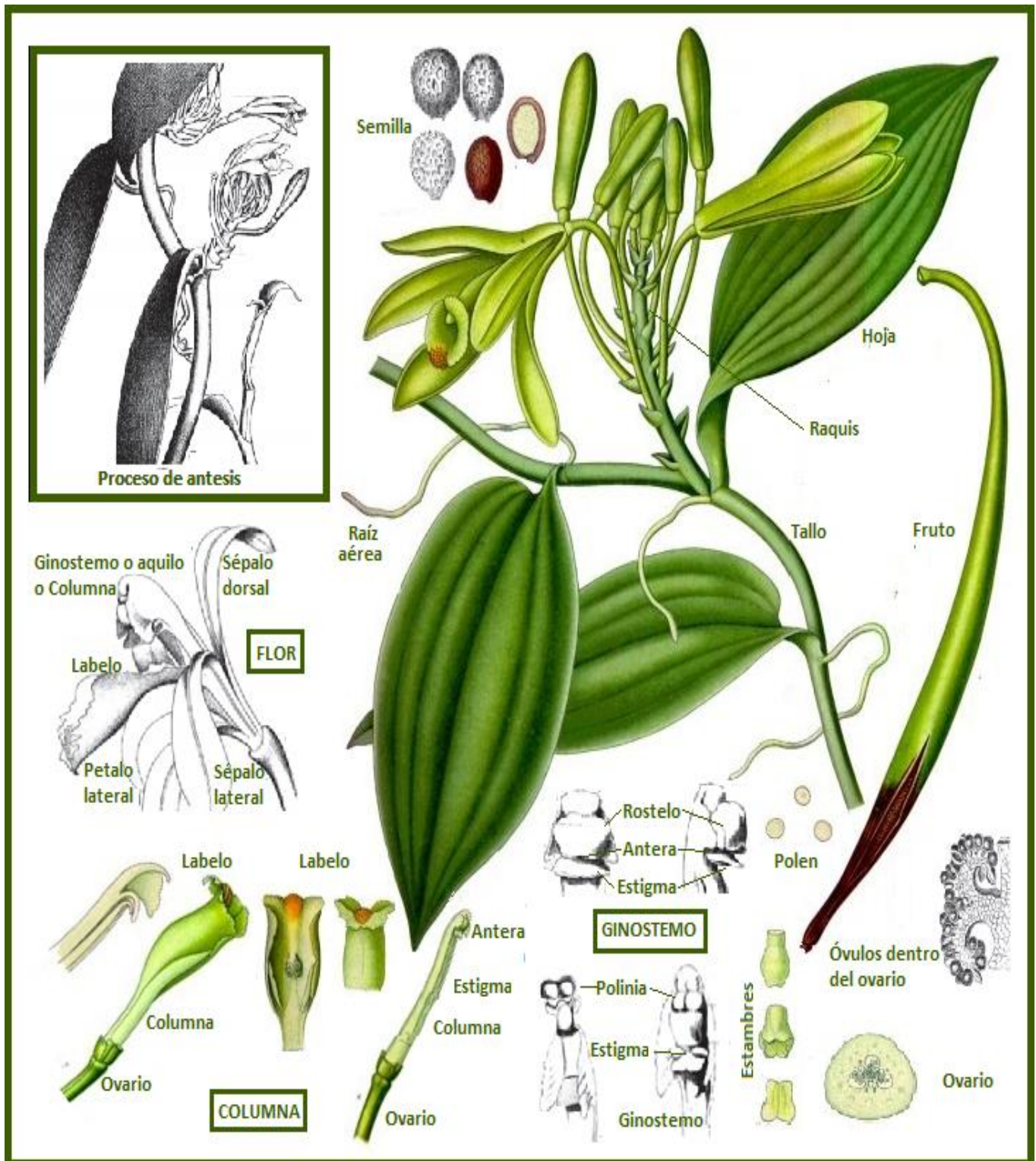


Figura 2. Esquema de las estructuras de *Vanilla planifolia*. Modificada de Kohler, 1890 y Arditti *et al.*, 2009





Figura 3. Distribución conocida de *Vanilla planifolia* en México (www.conabio.gob.mx)

2.2. Importancia de *Vanilla planifolia*

Vanilla planifolia es un recurso fitogenético, es decir, es un material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y la agricultura. Este tipo de recursos son conservados y desarrollados por los agricultores de forma tradicional y son la base para desarrollar nuevas variedades y tecnologías (snics.sagarpa.gob.mx).

De esta forma, la importancia de la vainilla incluye aspectos económicos, culturales, sociales y ecológicos. En primer lugar, la vainilla es 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, lo que consiste en un constante “sudado” y secado de los frutos mediante la exposición al sol u horneado (Hernández, 2014).



Este proceso propicia reacciones enzimáticas, incluyendo una ligera fermentación, que permite la eliminación del 80% de la humedad y la obtención del principal compuesto activo, la vainillina (Morales *et al.*, 2001; Hernández, 2014). El extracto del fruto de vainilla 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, cigarrillos y otros productos de cuidado personal. Con el fruto beneficiado también se realizan artesanías como, aretes, pulseras, collares, rosarios y otras figuras (Morales *et al.*, 2001, Osorio, 2012). La vainillina, metabolito secundario presente en la vainilla, es utilizada por la industria farmacéutica para la síntesis de fármacos tales como papaverina, Aldomet (antihipertensivo), L-metildopa, L-dopa y trimetaprim; posee propiedades bacteriostáticas, anti-fúngicas y herbicidas. 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, agente solubilizante para la riboflavina y reactivo de revelado en cromatografías (Suwarso & Utama, 2002; Walton, 2003; Díaz, 2007; Saucedo & Neryda, 2011).

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 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).



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, ya que presenta fenómenos ecológicos, conductuales, de co-evolución y a través de ellos se pueden entender aspectos relacionados con el éxito evolutivo de las especies involucradas (Gigant *et al.*, 2011; Azofeifa *et al.*, 2014).

En el ámbito 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 involucrando a la familia como mano de obra. Además, la cadena de producción de la vainilla incluye tanto la comercialización del fruto verde como 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 (Azofeifa *et al.*, 2014).

Por otro lado, existe un proceso de selección de este recurso, ya que el conocimiento local que existe en torno a la elección de esquejes de vainilla, responde a las distintas apreciaciones culturales y sensoriales que existen entre los grupos indígenas pluriétnicos de la región, que apoyados en la reproducción clonal iniciaron un proceso de selección-domesticación que no ha terminado y que da respuesta a la dinámica social, cultural, económica, ambiental y biológica de la región del Totonacapan (Herrera-Cabrera *et al.*, 2014).

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 varios estratos de células densamente citoplasmáticas ubicadas en la unión del órgano y el cuerpo principal de la planta (Roberts *et al.*, 2000; Patterson, 2001; Lewis *et al.*, 2006).



Dicho proceso está regulado por señales ambientales, del desarrollo, por estrés y/o de manera hormonal. De manera general, algunas hormonas como etileno, ABA, ácido jasmónico y en algunas circunstancias citocininas actúan como señales aceleradoras de abscisión, mientras que otras como auxinas, giberelinas, poliaminas, brasinoesteroides y citocinina actúan como inhibidores de la abscisión (Corbacho, 2015).

Más puntualmente, la presencia de altas concentraciones de auxinas en el receptáculo, al inicio del proceso está relacionada con el retardo de la abscisión, mientras que, una disminución o alteración de esta hormona, ya sea por factores naturales o por estrés, estimula la síntesis de etileno, el cual favorece la biosíntesis de proteínas degradadoras de pared y sensibiliza las células para formar la zona de abscisión (**Fig. 4**) (Niederhuth *et al.*, 2013; Tucker & Kim, 2015). Una disminución o alteración del gradiente de auxinas, 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 el tejido de abscisión (Herrera *et al.*, 2006).

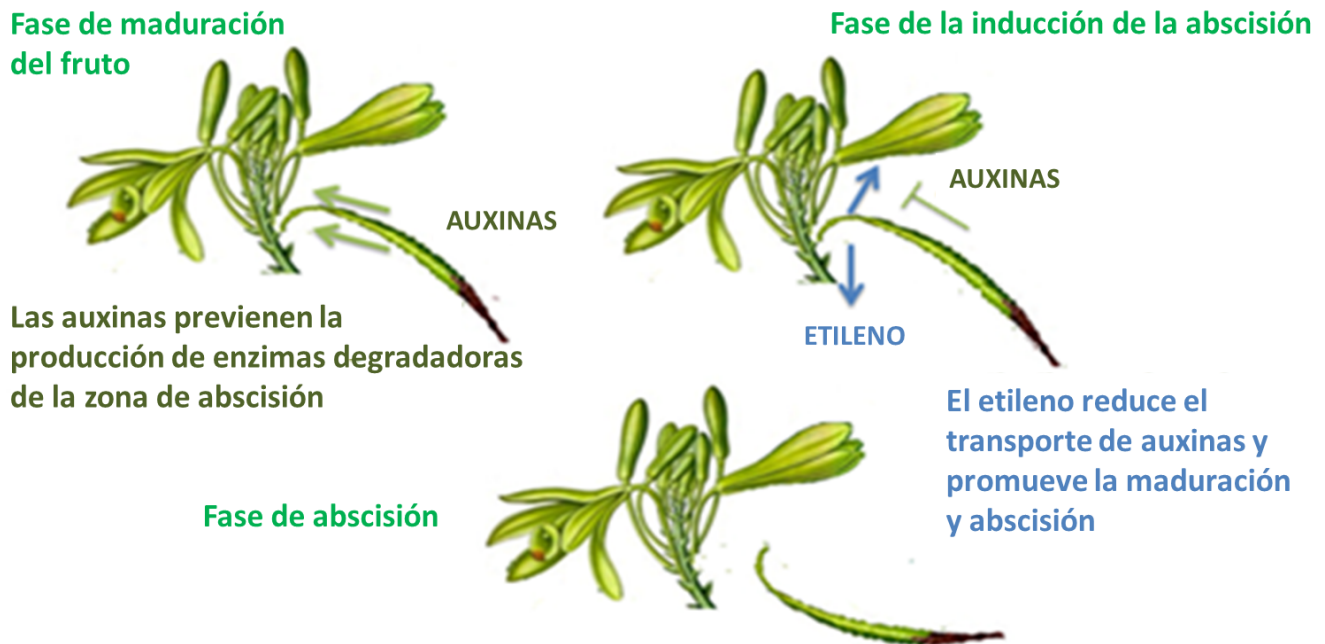


Figura 4. Principales hormonas involucradas en el proceso de abscisión

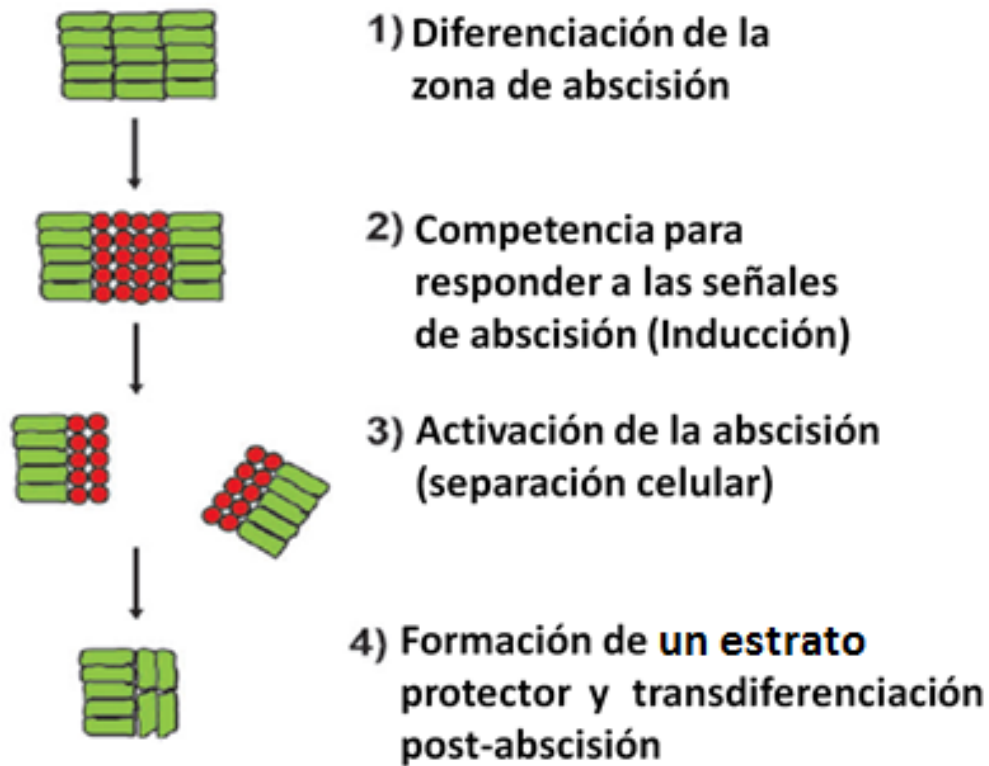


Figura 5. Etapas de abscisión (Niederhuth *et al.*, 2013).

Un modelo general comúnmente citado para la abscisión incluye cuatro pasos básicos: la diferenciación de la ZA; la competencia para responder a las señales de abscisión; la activación de la abscisión y la formación de una capa protectora y trans-diferenciación post-abscisión (**Fig. 5**) (Patterson, 2001; Tucker & Kim, 2015; Meir *et al.*, 2019).

En la primera etapa, la separación real de células se limita a un estrato celular anatómicamente distinta en la base del órgano de abscisión o ZA. La morfología del estrato de la ZA se observa como un pequeño grupo de células redondas y citoplasmáticamente densas (Niederhuth *et al.*, 2013). La respuesta a los estímulos, regulados principalmente de manera hormonal, se induce en la ZA durante la competencia para responder a las señales de abscisión.



En la tercera etapa ocurre la activación de la abscisión mediante la separación celular en la lámina media, y requiere de la acción de enzimas degradadoras de pectina y de la hidrólisis de otros polisacáridos de la pared celular. Entre las hidrolasas involucradas en dicha degradación, se encuentran la poligalacturonasa (PG), la pectin metilesterasa (PME), la pectato liasa (PL), la β -1,4-glucanasa (con actividad celulasa), expansinas (EXP) y la xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa (XTH), entre otras. (Niederhuth *et al.*, 2013; Tucker & Kim, 2015; Phetsirikoon *et al.*, 2016).

Finalmente, en la última etapa de la abscisión, se producen otros procesos fisiológicos y moleculares, cuyo resultado es la producción de un estrato de cicatriz protectora sobre la ZA. La síntesis de este estrato en el sitio de abscisión sirve para dos propósitos principales; sellar la superficie expuesta para reducir la pérdida de agua y nutrientes, y servir de protección a la planta contra la invasión de patógenos (Niederhuth *et al.*, 2013; Tucker & Kim, 2015). En algunas plantas, se forma un estrato de protección por la deposición de suberina en paredes celulares y espacios intercelulares que se encuentran debajo del estrato de separación (Raven *et al.*, 1992). Existe evidencia de que, aunque este es un modelo conservado, aún entre órganos, existen diversas modificaciones entre plantas, (Zhang *et al.*, 2015), tal vez derivadas de adaptaciones evolutivas propias de cada especie.

2.3.1. Vías de señalización en el proceso de abscisión

Se ha encontrado que existen dos principales vías de señalización para que ocurra la abscisión: la dependiente de la señalización del etileno y la semi-independiente de la señalización del etileno. Dependiendo de la especie, tejido o condiciones ambientales o del desarrollo de la planta, es que se expresa una de las vías (Patterson & Bleecker, 2004; Butenko *et al.*, 2006; Meir *et al.*, 2019).



2.3.1.1. Vía dependiente de la señalización del etileno

La producción endógena de etileno aumenta durante ciertas etapas de crecimiento y desarrollo, incluyendo la abscisión, además el etileno exógeno (ambiental o aplicado en tratamientos) induce su producción endógena. La vía de abscisión dependiente de etileno requiere de la señalización de etileno y actúa a través de genes de respuesta a esta fitohormona (principalmente de manera exógena), tales como receptores, factores de transcripción y enzimas que participan en la biosíntesis del etileno endógeno (Liu *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2018).

2.3.1.1.1. Genes de respuesta a etileno

La señalización inicia con la unión del etileno (una fitohormona gaseosa) a receptores proteicos con dominio histidina cinasa (la mayoría) y función redundante entre sí, presentes principalmente en la membrana del retículo endoplasmático: ETR(1 y 2), ERS(1 y 2) y EIN4. El transportador de Cobre RAN1 también participa en esta señalización. Los receptores activan al segundo mensajero: CTR1, que desencadena una cascada de fosforilación MAP-cinasa que activa a su vez, diversos Factores de Transcripción (FT). Respecto a ERS1, se ha encontrado que en *A. thaliana*, tiene funciones duales en la regulación de las respuestas a etileno; además de reprimir estas respuestas, también las promueve de una manera dependiente de ETR1 (otro receptor). La actividad de ERS1 es dependiente de la concentración de etileno, a altas concentraciones de la hormona, la señalización de este receptor es bloqueado (Hall *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2010). Esto sucede debido a que la cinasa CTR1 forma complejos con los diferentes receptores, regulados de manera dependiente de la dosis. El etileno estimula la producción de nuevos complejos a través de la inducción transcripcional de los receptores; sin embargo, el etileno también induce el recambio de los receptores (de manera post-transcripcional), de modo que los complejos receptor de etileno-CTR1 disminuyen a concentraciones más altas de etileno. Las interacciones entre CTR1 y los receptores evitan el cambio de conformación de ETR1 mediada por etileno necesaria para la actividad hormonal (Shakeel *et al.*, 2015).



Corriente abajo se encuentra el receptor intracelular EIN2 (que se trasloca al núcleo), los FT: EIL(1,2 y 3), EIN3, ERF(1) y EDF y componen la ruta de señalización del etileno activando otros genes de respuesta a esta fitohormona (**Fig. 6**). (Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006; Lin *et al.*, 2009; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012; Ju & Chang, 2012; Balaguera-López *et al.*, 2014; NCBI, 2017). El factor de transcripción, EIN3 se acumula en el núcleo en presencia de etileno, mientras que, en su ausencia, EIN3 se regula negativamente y se degrada constantemente. Dicha degradación de la proteína EIN3 está controlada por la actividad proteasomal 26S bajo la regulación de dos proteínas de la familia F-box, EBF1 y EBF2, redundantes en función (Cho & Yoo, 2015).

2.3.1.1.2. Genes que intervienen en la biosíntesis de etileno

La biosíntesis de etileno endógeno inicia con la metionina, un aminoácido 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 (Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006). Las tres reacciones principales están sintetizadas por las enzimas: AdoMet sintasa (síntesis de AdoMet); la ACC sintasa (síntesis de ACC) y la ACC oxidasa (síntesis de etileno). La enzima ACC oxidasa (ACO1) cataliza la conversión de ACC a etileno (**Fig. 7**) (Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006; Arc *et al.*, 2013; Balaguera-López *et al.*, 2014; Savada *et al.*, 2017). Las proteínas y sus genes de respuesta y biosíntesis de etileno endógeno, actúan en la segunda etapa del proceso de abscisión o competencia para responder a las señales de abscisión.

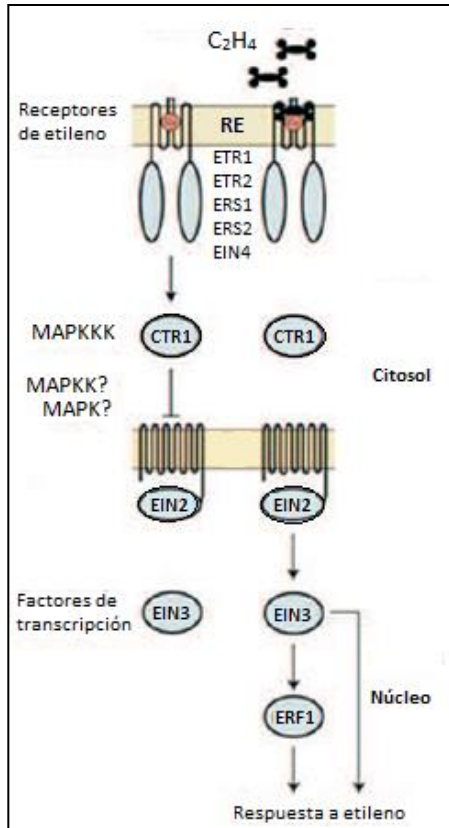


Figura 6. Modelo de la transducción de señales del etileno (Barrera-Ortiz *et al.*, 2012)

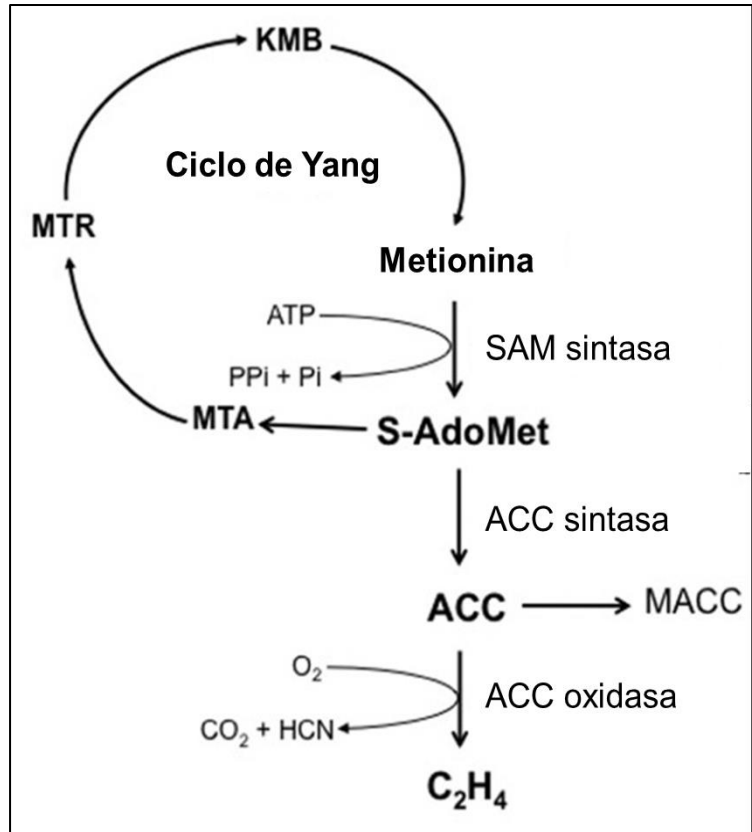


Figura 7. Ciclo de Yang y biosíntesis del etileno (Modificado de Arc *et al.*, 2013)

2.3.1.2. Vía semi-independiente de la señalización del etileno

En algunas especies de plantas se ha encontrado que el etileno no es el único inductor de la expresión genética en el proceso de abscisión y se ha encontrado una vía semi-independiente a la señalización del etileno. Estudios con mutantes insensibles al etileno (*etr1* e *ein2*) mostraron un retraso significativo en la abscisión floral, pero las observaciones morfológicas y genéticas indicaron que estos mutantes presentaron las mismas etapas de desarrollo que las flores tipo silvestre (Patterson & Bleeker, 2004; Butenko *et al.*, 2006). Meir y col. (2019) encontraron que esta ruta no es totalmente independiente a la señalización por etileno, por lo que en este trabajo se mencionará como vía semi-independiente de etileno.



2.3.1.2.1. Genes que codifican factores de transcripción de la vía semi-independiente de la señalización por etileno

FYF participa en ambas vías y regula negativamente la vía de señalización de etileno activando la expresión de *FUF1* que a su vez activa a un gen desconocido que reprime la expresión de la familia de factores de transcripción *EDF* (1/2/3/4) que promueven la abscisión floral (**Fig. 8**) (Chen *et al.*, 2015). También se ha estudiado la expresión de *FYF* y su participación en la abscisión del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Xie *et al.*, 2014).

EDF (2/3/4) promueven la senescencia y/o abscisión mediante la supresión de otro gen desconocido cuya función es evitar la senescencia y/o abscisión. Esta vía también regula la abscisión activando otro gen desconocido que reprime la expresión de *BOP1(2)*, reguladores de la formación de la ZA y de la expresión de genes de receptores tipo cinasa como *IDA/HAE/HSL2* que controlan el inicio de la abscisión (**Fig. 7**) (Cho *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015; Stø *et al.*, 2015; Vie *et al.*, 2015).

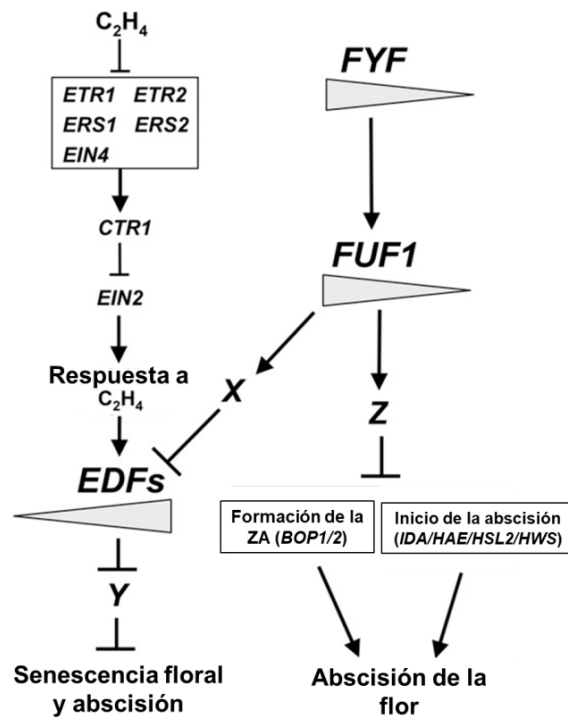


Figura 8. Genes de la vía semi-independiente de la señalización por etileno en la abscisión floral (Chen *et al.*, 2015)



2.3.1.3. Genes que codifican enzimas degradadoras de pared celular

A nivel celular, la tercera etapa o activación de 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 (Merelo, 2011).

El etileno induce significativamente la expresión de los genes de estas enzimas en la ZA, sin embargo estos genes también son activados en la vía semi-independiente de la señalización del etileno. Se ha sugerido la posibilidad de que otras familias de enzimas como las xiloglucano, las endotransglicosilasas, las pectin metilesterasas o las pectato liasas, participan en la degradación de la lámina media y la pared celular durante el proceso, (Merelo, 2011).

2.3.2. Problemática en *Vanilla planifolia* por abscisión del ovario no fertilizado

En un contexto evolutivo, la abscisión es un proceso fundamental en los procesos reproductivos en plantas, ya que hace posible la caída de frutos maduros y la liberación y dispersión de semillas. Sin embargo, desde el punto de vista agrícola, esto ocurre en *V. planifolia*, este proceso es un factor limitante en la productividad de los cultivos (Corbacho, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

La caída o abscisión de ovarios no fertilizado (conocida comúnmente como caída de frutos inmaduros) está considerada como una de las principales causas del bajo rendimiento de vainilla en México, ya que durante varios años, provocó una disminución en la producción de vainilla del 90% aproximadamente. Este fenómeno a su vez, se atribuye a las condiciones climáticas adversas que se presentan durante el periodo de polinización y crecimiento de frutos. Se estima actualmente un volumen de producción, alrededor de 5 ton de vainilla beneficiada, cuando anteriormente se producía entre 20 a 30 ton anuales. Esta disminución en la producción generó a su vez pérdidas económicas en todos los eslabones que integran el sistema producto vainilla a nivel nacional (Hernández, 2014).



2.4. Análisis de la expresión génica diferencial por Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La comparación de la expresión de genes entre dos situaciones, tejidos o momentos se le denomina análisis de expresión diferencial. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es un método que permite el monitoreo de la expresión génica (Derveaux, *et al.*, 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa punto final, es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción utiliza la actividad de la enzima DNA polimerasa termoestable que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células (Paniagua *et al.*, 2011; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (DNA o cDNA), la enzima Tag DNA polimerasa, los *primers* (oligonucleótidos sintéticos complementarios a los extremos del DNA que se va a amplificar), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), el ión magnesio ($MgCl_2$), una solución amortiguadora o buffer y agua. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone el PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Paniagua *et al.*, 2011; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo para que las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Finalmente, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción se realizó de manera correcta (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

El PCR tiempo real o cuantitativo es una modificación de la técnica de PCR que permite monitorear la amplificación en cada ciclo a través de la detección de fluorescencia que se emite cada vez que se lleva a cabo la síntesis de una nueva cadena (Tamay de Dios *et al.*, 2013).



El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo difieren la forma de detección y análisis de los productos de la amplificación. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción mediante fluorescencia (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de las moléculas molde (DNA o cDNA) en la muestra. En la reacción, si se utiliza DNA genómico como sustrato, entonces nos referimos a una qPCR, pero si se utiliza DNA complementario (cDNA) proveniente del RNA mensajero (mRNA) se le conoce como qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). La síntesis de cDNA se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el mRNA en una molécula de cDNA (Paniagua *et al.*, 2011; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

El qPCR se basa en la detección de una señal fluorescente emitida por moléculas de un reportero durante la amplificación del templado. El agente químico no específico, utilizado con mayor frecuencia es el SYBR® Green, un fluoróforo que emite mayor fluorescencia al intercalarse en el surco menor del DNA de doble cadena. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de DNA de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Existen dos estrategias para llevar a cabo la cuantificación de RNA en tiempo real: la absoluta y la relativa. La cuantificación absoluta determina con exactitud el número de moléculas de RNA utilizando una curva de calibración con un estándar de concentración conocida. Mientras que, la cuantificación relativa se utiliza para determinar los cambios en los niveles de expresión de un gen en comparación con uno o más genes de referencia (genes con expresión constante en las células, también llamados genes *housekeeping*). A dicha expresión se le denomina expresión relativa (ER) (Paniagua *et al.*, 2011).



2.5. Análisis de conglomerados y su representación gráfica: *heat map*

Un *heat map* es una representación gráfica en dos dimensiones de la matriz de los niveles de expresión génica: las filas representan a los genes y las columnas a las condiciones o tejidos. Cada nivel de expresión se representa como un cuadrado de color en la posición correspondiente a su gen y su condición o tejido. El color depende del nivel de expresión, y suele seguir una escala bi o tricolor (Santamaría, 2009).

Esta representación puede hacerse con la ayuda de varios software o en sitios web gratuitos (<http://www.heatmapper.ca/expression/>). Esta herramienta de análisis de datos exploratorios se utiliza para analizar agrupaciones de rasgos y de muestras simultáneamente de forma sintética. Asimismo, se puede comprobar si los *clusters* o agrupaciones de rasgos similares (genes en este caso), corresponden a *clusters* de muestras similares (<https://help.xlstat.com>).

2.6. Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es un método estadístico de Análisis Multivariante. Esta herramienta se utiliza para el tratamiento de datos compuestos por numerosas variables con el objetivo de reducirlas perdiendo la menor cantidad de información posible, es decir, sintetizar la información o reducir la dimensión. Estos bloques de datos son generados por estudios donde intervienen diversos factores en el parámetro o proceso a estudiar, registradas a partir de observaciones o experimentalmente (Serrano, 2003).

Conceptualmente, el ACP toma p variables correlacionadas ($X_1, X_2 \dots X_p$), las cuales describen n objetos, para encontrar una combinación de éstas y generar otras variables nuevas ($Z_1, Z_2 \dots Z_p$) que no estén correlacionadas. La independencia de las nuevas variables Z_i (llamadas componentes principales) hace que midan diferentes dimensiones de los datos (Serrano, 2003).



Estos componentes principales son ordenados, de manera que Z_1 explique la mayor cantidad de variación contenida en los datos originales, Z_2 contiene la mayor cantidad de información original, y así sucesivamente. Así, a partir de una matriz de datos, el ACP permite transformar un conjunto de variables inter-correlacionadas en otro conjunto de variables no correlacionadas (los nuevos componentes principales o factores) y serán una combinación lineal de las variables originales, independientes entre sí. Cuanto más dependientes sean las variables, más varianza será explicada por los primeros componentes y la información contenida en los datos será mejor explicada por un menor número de componentes (Serrano, 2003).

Se generan tantos componentes como variables originales (n) existan en la matriz de datos, siendo todos ellos ortogonales entre sí en un espacio R^n , según el valor calculado para los objetos respecto a cada componente, que se utilizan como coordenadas. Estos valores (*weights*) de los objetos o individuos para cada componente se calculan a partir de los valores propios (*eigenvalues*, l) y los *eigenvectors* (a_{i1}, a_{i2}, \dots) que arrojan los coeficientes de cada variable en la combinación lineal generada, calculados a partir de la matriz de correlaciones (Serrano, 2003).

La interpretación del análisis consiste en encontrar correlaciones positivas o negativas entre objetos o grupos de objetos, según su situación respecto a uno o varios componentes. Estas correlaciones están representadas por las distancias euclidianas en el espacio que se represente en el gráfico visualizado (compuesto por los primeros componentes) (Serrano, 2003).

Existen diversos programas estadísticos que permiten realizar este tipo de análisis con un mínimo esfuerzo de cálculo, tal es el caso del Software XLSTAT de Microsoft Excel (Serrano, 2003; <https://www.xlstat.com/es/>).



3. ANTECEDENTES

3.1. Quimiotipos y genotipos en *Vanilla planifolia*

En plantas medicinales y en plantas aromáticas, como *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 *et al.*, 2011).

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 (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 (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012).

Salazar-Rojas y col., (2012), estudiaron el polimorfismo químico de los cuatro fenoles principales en el fruto de *Vanilla planifolia* (ác. hidroxibenzoico, ác. vainílico, hidroxibenzaldehído denominados como compuestos menores, y vainillina). Basados en la concentración de dichos fitoquímicos, los autores distinguieron seis variantes químicas (quimiotipos). Estos perfiles corresponden a tipos de vainilla con características aromáticas muy específicas (**Cuadro 1**). El polimorfismo fitoquímico encontrado en el centro de origen de la vainilla, Totonacapan, sugería que la presencia de diferentes compuestos químicos tiene un antecedente genético que dirige las biosíntesis divergentes (Delgado-Alvarado *et al.*, 2014).



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. 9**). 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 selección (Salazar, 2011).

Además de las diferencias fitoquímicas entre estos genotipos, se ha observado que presentan un comportamiento contrastante frente a la abscisión de fruto inmaduro, donde el genotipo CH I muestra un bajo porcentaje de caída, mientras que el genotipo CH VI presenta el mayor porcentaje (Salazar *et al.*, 2016). Por otra parte, el fenómeno de caída del ovario/fruto de *V. planifolia* ha sido mayor en algunos años respecto a otros, relacionado probablemente con las condiciones ambientales; por ejemplo, los productores comentan que en los años 2005 y 2017, la cantidad de fruto inmaduro caído ha sido mayor que en otros años.

Cuadro 1. Principales características de los genotipos de *V. planifolia* en la región Totonacapan, Puebla-Veracruz y localidades complementarias (Salazar-Rojas *et al.*, 2012)

Quimiotipo	[Ac. p-hidroxibenzoico]	[p- hidroxibenaldehído]	[Ac. Vainílico]	[Vainillina]	Aroma global	Importancia	Clima	Precipitación pluvial anual (mm)	Temperatura anual (mes más frío)
I	La mayor	Alta	Alta	Baja	Notas dulces y florales	Biológica	Húmedo y caliente	1,751	22°C a 18°C
II	Medio	Alta	Alta	Alta	Vainilla	Comercial	Húmedo y caliente	1,351	22°C a 18°C
III	Media-Alta	Media-Baja	Alta	Alta	Notas sutiles a vainillina	Comercial	Húmedo, tibio y caliente	Entre 1,351 y 1,751	Mayores a 18°C
IV	Media-Baja	Media-Alta	Baja	Media-Baja	Notas sutiles a canela	Comercial	Caliente y húmedo	Entre 1,000 y 2,751	Mayores a 22°C y 18°C
V	Media-Alta	Media-Alta	Media-Alta	Media-Baja	Notas dulces a chocolate	Genética	Húmedo, tibio y caliente	Entre 1,351 y 3,501	18°C o por debajo
VI	Bajo	Media-Alta	Media	Variable-Alta	Notas intensas a vainillina	Comercial	Caliente y húmedo	Entre 1,000 y 4,000	Arriba de 18°C y menor a 22°C

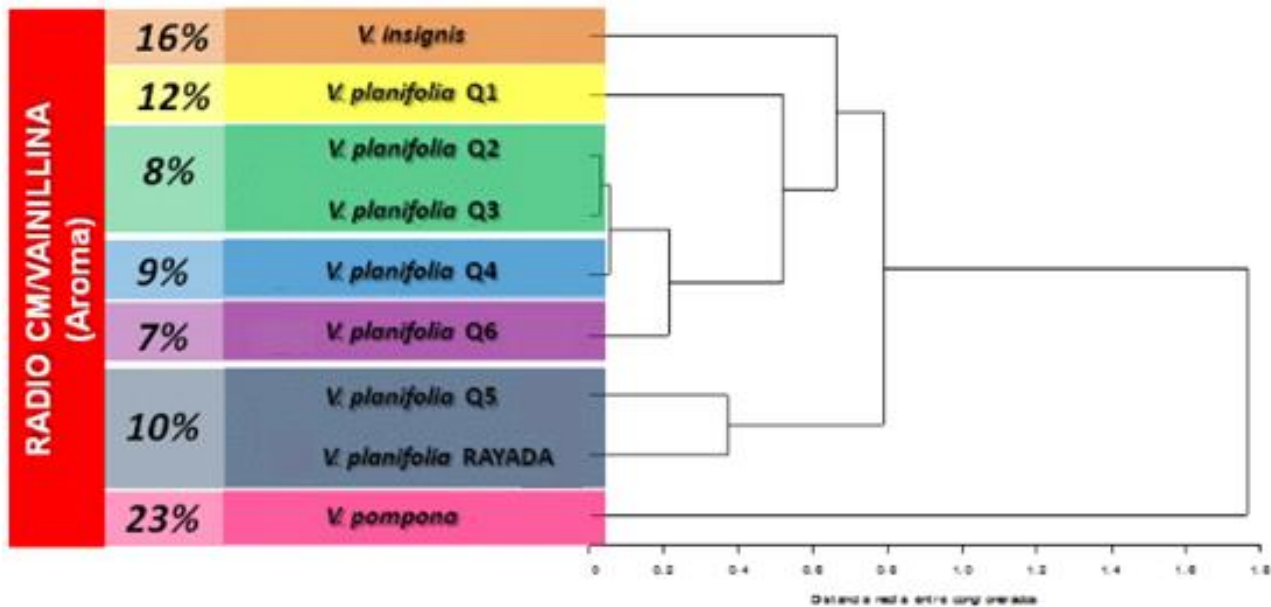


Figura 9. Dendrograma de colectas de *Vanilla planifolia* en la región Totonacapan, Puebla-Veracruz, México, basado en el promedio de 13 loci microsatélites y agrupamiento por distancias de similitud (Salazar, 2011; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012)

3.2. Ovario, fruto y síndrome de post-polinización en *Vanilla planifolia*

El desarrollo de la flor se puede dividir fácilmente en etapas de pre-polinización y post-polinización. Estas dos etapas principales se definen tanto temporal como funcionalmente, ya que la primera etapa prepara a los órganos florales para la dispersión y recepción del polen, mientras que la segunda elimina ciertos órganos florales y prepara otras para la fertilización, la embriogénesis y el desarrollo de los frutos (O'Neill & Nadeau, 1997). Generalmente, el resultado final de la polinización en angiospermas es la fertilización, que conduce a la formación de cigotos y posteriormente la embriogénesis. Así, el ovario en estas plantas contiene a los óvulos y se transforma en fruto después de la fecundación; después de que ocurre la doble fecundación dentro del óvulo, éste se transforma en una semilla y el ovario que lo rodea se convierte en un fruto. En sentido estricto todo fruto es, cuanto menos, un ovario transformado y que alberga en su interior semillas (Invernón *et al.*, 2012; Ramírez & Goyes, 2004; Chen, *et al.*, 2018).



A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las angiospermas, la familia Orchidaceae presenta un largo proceso de fertilización que puede tardar entre 45 y 80 días después de la polinización (ddp), dependiendo la especie. Esto se debe a que, en la transición de flor a fruto en las orquídeas, la polinización y la fertilización ocurren en momentos distintos del desarrollo de la planta. La diferenciación y el desarrollo de los óvulos en las flores de orquídeas dependen de la polinización ya que, el ovario de estas plantas, no tiene óvulos o están inmaduros y es el contacto del polen con el estigma, la señal que activa el desarrollo de los óvulos de manera sincrónica a la elongación del tubo polínico hasta su fertilización (Síndrome Post-polinización) (Zhang & O'Neill, 1993; O'Neill, 1997; O'Neill & Nadeau, 1997; Hernández-Hernández, 2011; Chen, et al., 2018; Hernández-Miranda, 2018). Durante este periodo hay factores ambientales (principalmente temperatura y estrés hídrico) que afectan la sincronización entre la madurez de los óvulos y el crecimiento del tubo polínico, lo cual puede interrumpir la fertilización de la flor y provocar su abscisión (Hernández-Hernández, 2011; Chen & Fang, 2016).

Los frutos climatéricos, como es el caso del tomate, exhiben altos niveles de etileno y respiración durante la maduración, pero en los frutos no climatéricos estos niveles son limitados, sin embargo, es necesario cierto nivel de percepción de etileno para inducir la maduración de estos frutos. Así mismo, las vías independientes del etileno también pueden existir en la maduración no climatérica (Aizat *et al.*, 2013). Los fenómenos de post-polinización en orquídeas, incluyendo la maduración de los ovarios y la diferenciación de los óvulos, están regulados por el etileno producido por la flor después de su polinización (Primack, 1985; Tsai *et al.*, 2008). No se sabe si el fruto de *V. planifolia* es de tipo climatérico o no, pero se ha encontrado que el etileno tiene un papel importante en la maduración de su fruto (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010; Odoux, 2010).

En *V. planifolia*, después de la fertilización, el ovario comienza un rápido crecimiento derivado de una elongación de las células del endocarpo a través de la cavidad del ovario. La longitud máxima y el diámetro del fruto se alcanzan alrededor de 45 días después de la polinización (ddp), en este tiempo (entre 45 y 55 ddp) ocurre el fenómeno conocido agrónomicamente como “caída prematura del fruto”.



En el desarrollo normal del fruto, el crecimiento cesa aproximadamente a los 45 ddp y el fruto comienza un período de maduración que dura aproximadamente de 7 a 9 meses (Hernández-Hernández, 2011; Lapeyre-Montes *et al.*, 2010).

Al respecto, Hernández-Miranda y col. (2018), analizaron en diferentes tiempos del desarrollo del ovario de *V. planifolia*, el patrón de expresión del gen sensible a auxinas: *ARF8* (*Auxin Response Factor 8*), el cual estimula la expresión temprana de un gen relacionado con la madurez de óvulos y el desarrollo del fruto (**Fig. 10**). Estos autores encontraron en el genotipo CH I altos niveles de expresión de *VpARF8* en la etapa de pre-fertilización, mientras que en la etapa de polinización disminuyen, debido a que *ARF8* actúa como factor de transcripción de genes de desarrollo y maduración de los óvulos. Posteriormente, durante la etapa de pre-fertilización, los niveles de expresión de *VpARF8* volvieron a incrementarse debido a la señal recibida de los óvulos maduros que están listos para ser fertilizados. Finalmente la etapa de fertilización se manifestó con un decremento de los niveles de expresión de *VpARF8* después de los 25 dpp, inducido por el incremento en la concentración de auxinas, característico de la formación de semillas en las etapas de desarrollo y crecimiento de frutos (Hernández-Miranda *et al.*, 2018).

En el genotipo CH VI (susceptible a “caída”), no se observaron cambios en los niveles de expresión de *VpARF8* después de los 25 dpp. Por lo que se sugiere que en dicho genotipo no ocurre la fertilización y esta señal provoca la abscisión de las flores no fertilizadas. Esto lo convierte en un material más susceptible a las modificaciones ambientales provocadas por el cambio climático bajo las cuales se prevén incrementos en las temperaturas que podrían afectar la sincronización y madurez de los óvulos de este genotipo, también con niveles bajos de la expresión de dicho gen. Esta evidencia molecular sugiere que el evento reconocido como “caída prematura de fruto” corresponde biológicamente con la abscisión de flores no fertilizadas por la interrupción en la transición de flor a fruto (**Fig. 10**) (Hernández-Miranda *et al.*, 2018).

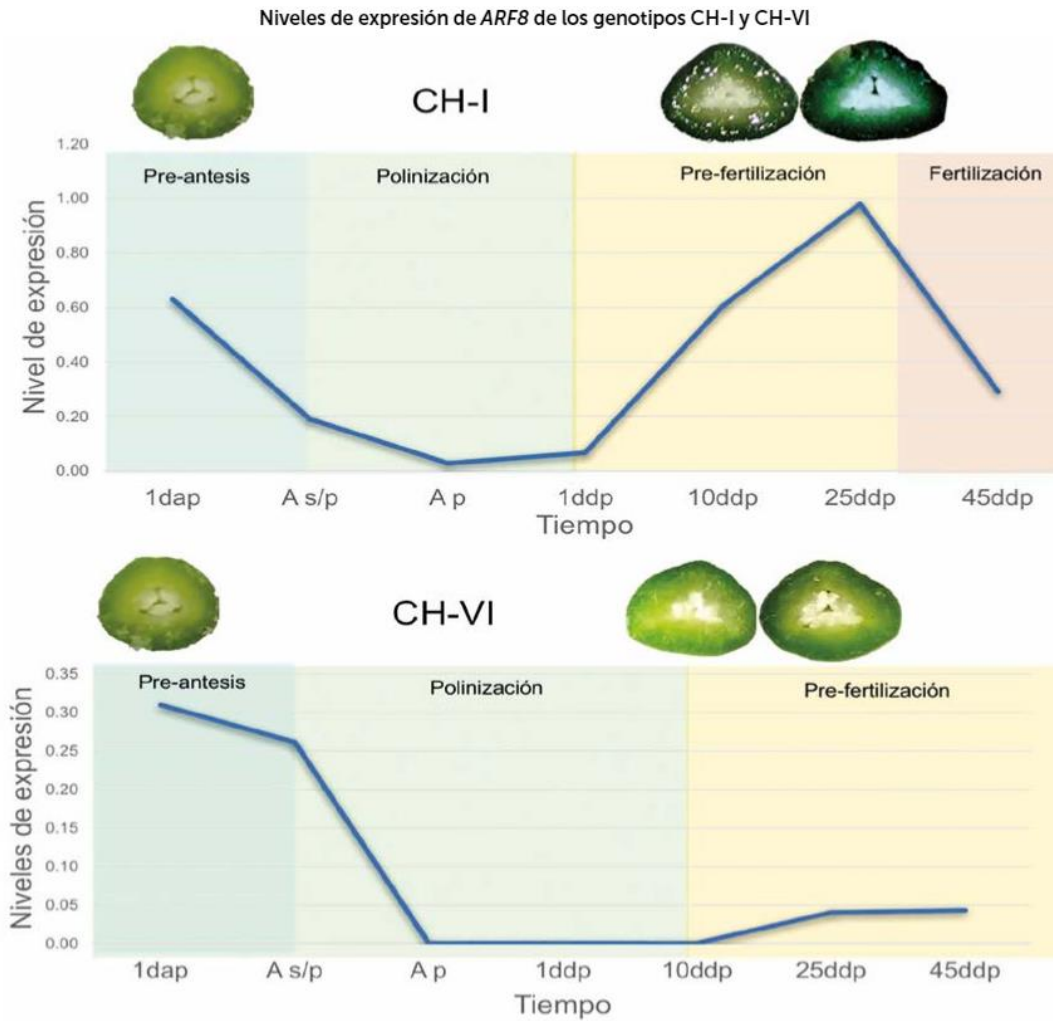


Figura 10. Gráfico comparativo de los niveles de expresión del gen *ARF8* en los genotipos CH-I y CH-VI en diferentes tiempos y etapas en la transición de flor a fruto en *Vanilla planifolia* 1 día antes de la polinización (1dap), en la antesis sin polinizar (A s/p), la antesis una vez polinizada la flor (A p), 1ddp, 10ddp, 25ddp y 45ddp (ddp=días después de la polinización) (Hernández-Miranda *et al.*, 2018).

Sumado a esto, tampoco es correcto referirse a esta caída como “prematura” ya que, la dispersión de semillas de *V. planifolia* es dehiscente por lo que de manera natural, no se cae sino que se rasga o hiende para facilitar el proceso de dispersión de las semillas (Castillo & Engleman, 1993; Vivar, 2004; Soto & Dressler, 2010; Invernón, 2012). Por otro lado, se desconoce si los frutos de *V. planifolia* son climatéricos o no, sin embargo, se ha encontrado que el etileno es un importante inductor de la madurez en estos (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010; Odoux, 2010).



3.3. Tejido de unión entre raquis y ovario/fruto en *Vanilla planifolia*

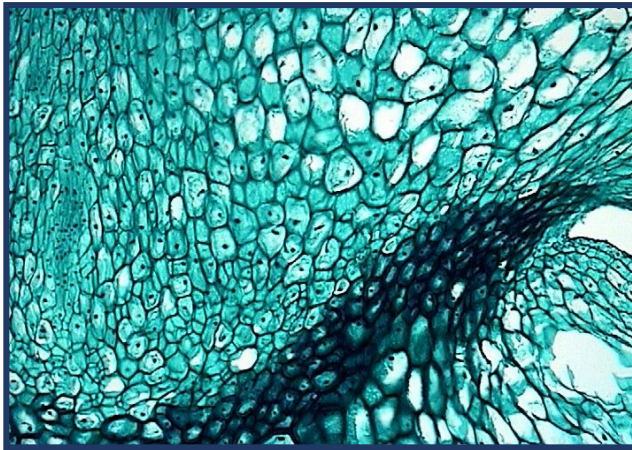
Como se mencionó anteriormente, la ZA en la mayoría de las especies, se observa como un pequeño grupo de células redondas y citoplasmáticamente densas (Niederhuth *et al.*, 2013). Esto se ha observado en el género *Populus* (Jin *et al.*, 2015) y en las especies *Arabidopsis thaliana* (Cai & Lashbrook, 2008), *Nicotiana tabacum* (Wu *et al.*, 2012) y *Rosa bourboniana* (Singh *et al.*, 2011), entre otras. Sin embargo, se ha observado que en *V. planifolia* no se forma un tejido de abscisión como tal, además de que los genotipos presentan diferencias entre sí a nivel histológico. En el genotipo tolerante a la abscisión (CH I), en lugar de una Zona de abscisión, se forma una zona de reforzamiento con alta concentración de lignina en las paredes celulares y un mayor número de estratos lignificados (**Fig. 11. A**), mientras que en el genotipo susceptible (CH VI) se observan menores cantidades de lignina, menos estratos lignificados y la presencia de células con paredes amorfas; es decir no se forma esta zona de reforzamiento por lo que se produce una zona de separación (**Fig. 11. B**) (Salazar *et al.*, 2016).

Por lo antes mencionado, en esta especie no se puede hablar de una zona de abscisión, sino más bien de una zona de unión entre el raquis y ovario/fruto, que dependiendo el genotipo y las condiciones puede derivar en una región tisular de reforzamiento o separación. En consecuencia se puede asumir que las etapas del proceso de abscisión presentes en otras especies antes enunciadas, no ocurren en *V. planifolia*.

La formación de dicha zona de reforzamiento en el material resistente (genotipo CH I), puede estar relacionado con el giro de 180° (resupinación) que ocurre en el pedicelo de las orquídeas (Dressler, 1981; Ordóñez, 2016); tal vez a manera de soporte de dicho giro y posteriormente cómo sostén del fruto.



A



B

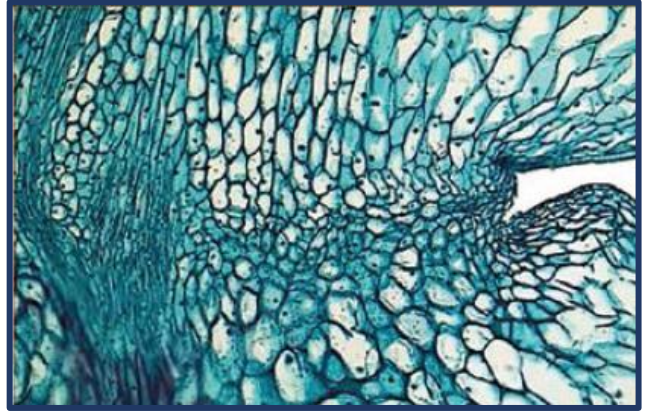
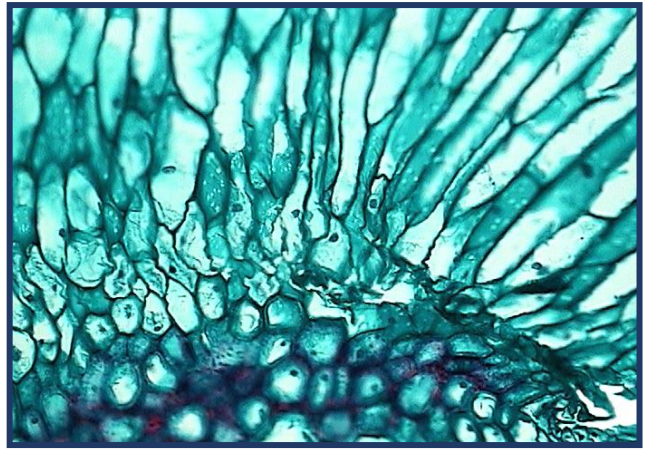


Figura 11. Zona unión entre el raquis y ovario/fruto en *Vanilla planifolia*
A. Genotipo CH I; B. Genotipo CH VI (Salazar *et al.*, 2016 y comunicación directa).

3.4. Comparación diferencial de la expresión génica (transcriptoma) durante el proceso de abscisión en *Vanilla planifolia*

La descripción del mecanismo natural que estimula el proceso de abscisión, se abordó mediante una comparación diferencial de la expresión genética (transcriptoma) del tejido de la Zona de Abscisión (ahora llamada Zona de unión raquis-ovario/fruto), en dos genotipos de *V. planifolia* con comportamiento contrastante frente a la abscisión del ovario sin fertilizar (genotipo CH I, tolerante y sin abscisión y genotipo CH VI susceptible, en condición de abscisión).



A

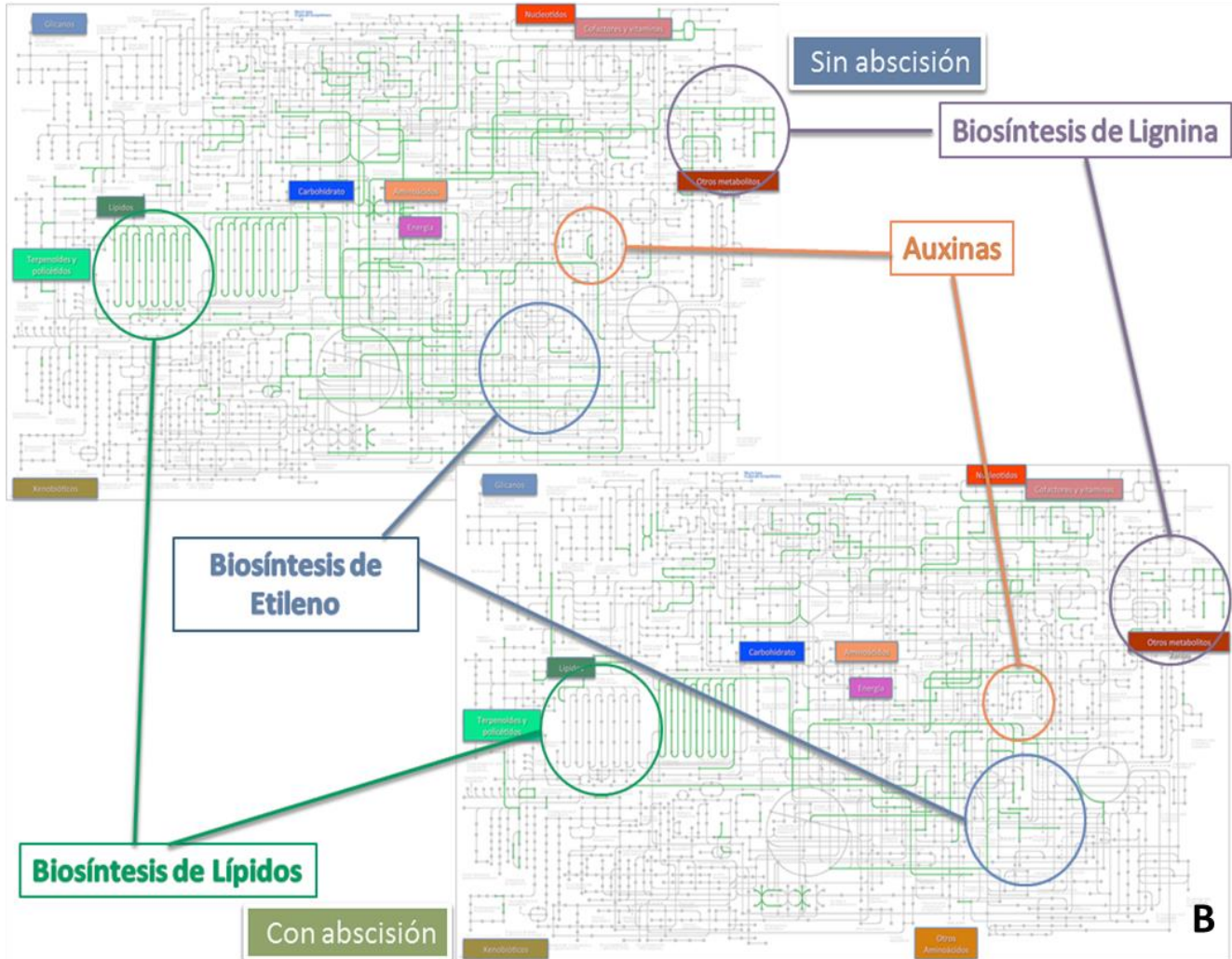


Figura 12. Comparación diferencial de la expresión genética (transcriptoma) durante el proceso de abscisión en *Vanilla planifolia*

A. Genotipo CH I sin abscisión; **B.** Genotipo CH VI con abscisión (Salazar *et al.*, 2016).

Salazar y col. (2016) encontraron un patrón diferencial en la expresión de genes y rutas metabólicas involucradas en el fenómeno conocido comúnmente como “caída de fruto”. En la **Fig. 12** se pueden observar mapas metabólicos; las líneas verdes señalan las rutas activas a través del análisis de los transcritos de genes encontrados entre condiciones.



En el genotipo CH I sin abscisión, se observó actividad en las vías de biosíntesis de metabolitos, incluyendo la síntesis de lípidos, lignina y reguladores de crecimiento vegetal, tales como auxinas (**Fig. 12. A**). En contraste, el genotipo CH VI, bajo condiciones de abscisión presentó una disminución de la actividad en la biosíntesis de metabolitos (i.e. lípidos); un aumento en el metabolismo de etileno y la interrupción de la síntesis de auxinas y lignina (**Fig. 12. B**). Este desbalance entre reguladores de crecimiento: auxina-etileno, sugirió un sistema de transducción de señales que llevan a un arresto del anabolismo, que conduce a la apoptosis celular y abscisión del tejido (Salazar *et al.*, 2016).

3.5. Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de abscisión en *Vanilla planifolia*

Granados (2016), realizó una comparación de la expresión de proteínas en la zona de unión raquis-ovario/fruto (antes mencionada como ZA), en dos genotipos de *V. planifolia* con comportamiento contrastante frente a dicho fenómeno (CH I y CH VI). Mediante 2D-SDS-PAGE, se encontraron posibles proteínas que intervienen en el fenómeno comúnmente conocido como “caída de fruto” de *V. planifolia*, tales como las relacionadas con la señalización de etileno (ETR1, ERS1, ERS2, EIN4 y ER4; factores de transcripción de respuesta a etileno (AIL1, AIL6, ERF022, ERF038, RAP2-7, RAP2-13, EIL1, EIN3); enzimas que intervienen en la biosíntesis de etileno (ACO1, ACO3 y MTN2); proteínas de regulación de auxinas (ARF6 y IAA30); proteínas implicadas en la degradación proteica mediante ubiquitinación; enzimas del metabolismo de lignina (OMT3) y enzimas degradadoras de pared celular. La mayoría de estas proteínas presentaron expresión diferencial en las condiciones contrastantes (con abscisión y sin abscisión) (**Fig. 13**).

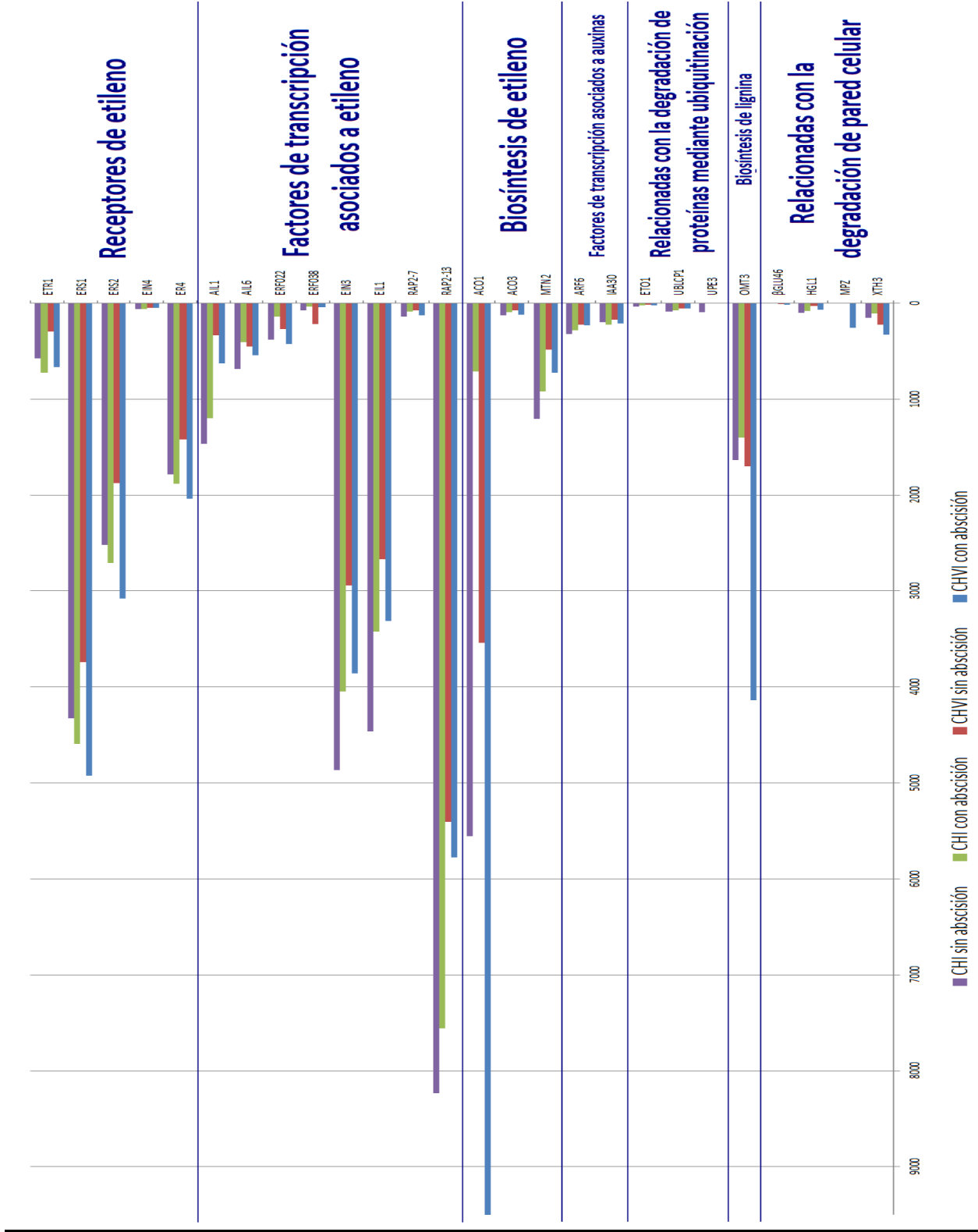


Figura 13. Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de abscisión en *Vanilla planifolia* (Granados, 2016).



Se concluyó que dentro de las posibles proteínas encontradas, los factores de transcripción asociados a etileno tienen mayor influencia en el proceso de abscisión, debido a la cantidad de posibles proteínas de este tipo que se presentaron y su alta expresión de algunas de ellas. ACO1 y RAP2-13 presentaron alta expresión y en tercer lugar OMT3, lo que sugiere que, además de la señalización de etileno; el metabolismo de la lignina, son importantes en el fenómeno agrónomicamente conocido como “caída de fruto” (Granados, 2016).

3.6. Ruta de señalización hormonal y molecular en la abscisión entre tejidos

En el proceso de abscisión, el sistema de señalización hormonal está regulado por funciones tales como: activación, inactivación, síntesis, degradación y transporte dentro, entre células, órganos y/o tejidos (la ZA presenta diversas conexiones de plasmodesmos entre células (Sexton & Roberts, 1982; Tranbarger *et al.*, 2018). En estas rutas, la amplificación de la señal implica la regulación de la expresión génica y el transporte inter-tejidos de las hormonas y sus precursores metabólicos pueden a través del xilema y el floema para comunicar órganos y activar respuestas influyendo en la actividad de la ZA. Esto sucede de manera normal y en respuesta a diferentes tipos de estrés, dicha señalización se da en órganos vegetativos y raíces, dependiendo el tipo de estrés (Corbacho, 2015; Chen *et al.*, 2018).

De manera general se ha observado que el órgano distal a separarse de la planta (fruto, hoja, flor), percibe la maduración o senescencia e inicia la señal de abscisión que se transporta hacia la planta y a la ZA, activando la separación. En situación de estrés, dicho órgano percibe sequía, salinidad, temperaturas extremas, baja irradiación, ataque de patógenos, etc., entra en senescencia y genera la señal de abscisión que se dirige hacia la ZA activando la abscisión. Esto genera una diferencia en la expresión de los genes relacionados y la subsecuente concentración y acción de las hormonas entre tejidos y órganos (Giovannoni, 2004; Corbacho, 2015; Zhang *et al.*, 2015).



En este sentido, se han realizado estudios de expresión diferencial entre tejidos, por ejemplo, el estudio a nivel transcriptómico y metabolómico en frutos de *Fragaria × ananassa* (fresa) transgénica con sensibilidad reducida a etileno, donde se encontró que el patrón de expresión de genes implicados en la percepción del etileno y de los genes *ACC* y *ACO* durante la maduración del fruto, es específico de la etapa y órgano (aquenio y receptáculo) (Merchante *et al.*, 2013).

Parra (2017), realizó un análisis comparativo del transcriptoma en la ZA y en el fruto de olivo (*Olea europaea*). Encontró que los patrones de expresión de genes relacionados con etileno y con la abscisión del fruto maduro del olivo, difieren durante la activación de la ZA del fruto del olivo. Por ejemplo, se registró una alta expresión de *ACO1*, *ETR1*, *EIN3/EIL*, de miembros de la familia *AP2/ERF* y de algunas proteínas degradadoras de pared celular, en la ZA respecto al fruto del olivo. Por su parte, *OeACO2* y *OeACS2* mostraron una fuerte asociación con la acumulación de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico durante abscisión (Parra, 2017).

3.7. Genes que intervienen en el proceso de abscisión

3.7.1. Vía dependiente de la señalización del etileno

3.7.1.1. Genes de respuesta a etileno

Los genes de respuesta a etileno se han estudiado en otras especies, por ejemplo: *ERS1*, receptor de etileno se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* (Hall *et al.*, 2000) y estudiados en el género *Oncidesa* (Huang *et al.*, 2016); *EIN3*, regulador de la transducción de señales de etileno, que activa la expresión de otros factores de transcripción de genes sensibles a etileno, en *A. thaliana* (Chang *et al.*, 2013) y en tomate (*Lycopersicon esculentum* = *Solanum lycopersicum*) (Tieman *et al.*, 2001); y *ERF*, activador transcripcional que activa una cascada de señalización de síntesis de etileno en *A. thaliana* (Nakano *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015), en tomate (*Lycopersicon esculentum* = *Solanum lycopersicum*) (Tournier *et al.*, 2003) y arroz (Nakano *et al.*, 2006).



3.7.1.2. Genes que intervienen en la biosíntesis de etileno

Otros genes que regulan la biosíntesis de etileno son *ACO1* y *VAS1*; la enzima *ACO1* cataliza el paso final de la síntesis de etileno (Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006) en *Malus domestica* (Costa *et al.*, 2005), tomate (*Lycopersicon esculentum* = *Solanum lycopersicum*) (Yokotani *et al.*, 2009) y en el género *Dendrobium* (Nagtong *et al.*, 2009). Por otro lado, Zheng y col. (2013), reportaron que *VAS1* parece inhibir tanto la biosíntesis de auxina como la biosíntesis de etileno en *A. thaliana*, ya que encontraron que, los mutantes con pérdida de función (*vas1-2*), contenían cantidades más altas de ACC que las plantas de tipo silvestre. No obstante, también encontraron que la enzima *VAS1*, utiliza preferentemente a la L-metionina (precursor del etileno), como sustrato donante del grupo amino para la conversión de 3-IPA, antes que al L-triptofano (precursor de la auxina). Además, la L-metionina y el producto de la desaminación de L-metionina: KMBA, son intermedios biosintéticos en el ciclo de Yang, el cual mantiene altas tasas de producción de etileno. Sus resultados sugirieron que la sobreexpresión de *VAS1* atenúa preferentemente la biosíntesis de etileno.

3.7.1.3. Las condiciones ambientales y el estrés intervienen en la regulación de estos genes y modifican su expresión

El etileno afecta a una variedad de procesos a lo largo de la vida de la planta, como la germinación de las semillas, el crecimiento, la formación de meristemos apicales, la senescencia de órganos, la maduración de los frutos, la abscisión, el gravitropismo y la respuesta a diferentes tipos de estrés; por lo que, en las plantas, la expresión de genes de respuesta a la señalización por etileno puede verse modificada durante el estrés fisiológico (Wang *et al.*, 2013; Dubois *et al.*, 2018).

Por ejemplo, el dominio tipo histidina quinasa de los receptores de etileno realiza autofosforilación en un residuo conservado de His en respuesta al estrés ambiental (Wang *et al.*, 2013). El gen *ERS1* pertenece a este tipo de receptores de etileno (Dubois *et al.*, 2018).



Por otro lado, se ha reportado que *EIN3* puede dirigirse directamente al promotor de *ERF* y la expresión de los genes posteriores responde a diversos factores de estrés. Se ha reportado que el gen *EIN3/EIL1* podría actuar como un nodo de integración de la señalización de las hormonas etileno y ácido jasmónico (AJ) y regular el desarrollo de la planta, así como de respuesta ante estrés (Zhang *et al.*, 2009, 2011; Zhu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Otros genes inducidos por etileno y por la señal de estrés, son los genes de la familia *ERF*; estos son factores de transcripción reguladores de la vía de señalización por etileno y se ha demostrado que están involucrados también en varios procesos de desarrollo en plantas (Zhang *et al.*, 2009; Zhu *et al.* 2010; 2011; Wang *et al.*, 2013). Así mismo, se ha encontrado que la expresión de genes de las enzimas de biosíntesis de etileno endógeno, *ACC* y *ACO*, es inducida por la señal de estrés.

3.7.2. Vía semi-independiente de la señalización del etileno

La vía de abscisión semi-independiente de la señalización de etileno, no se ha descrito por completo. Respecto a los genes que controlan la abscisión de manera semi-independiente a la señalización por etileno, se ha encontrado en *Arabidopsis thaliana* que el gen *FYF* regula negativamente la vía de señalización de etileno a través de la represión de la familia de factores de transcripción *EDF*, que promueven la abscisión. A su vez, regula la expresión de genes de receptores tipo cinasa como *IDA/HAESA/HSL2* que controla el inicio de la abscisión en *A. thaliana* (Cho *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015; Stø *et al.*, 2015; Vie, 2015) y en soya (*Glycine max*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Tucker & Yang, 2012). En el género *Cattleya* (Orchidaceae) se encontró que los genes *CaFYF1/2* pueden actuar como represores en el control de la senescencia y la abscisión de los órganos florales, similar al papel del gen *FYF* en *Arabidopsis* (Chen, *et al.*, 2018).



3.7.3. Genes que codifican enzimas degradadoras de pared celular

El xiloglucano es una de las principales hemicelulosas de las paredes celulares primarias, en plantas dicotiledóneas, y puede representar entre 10-20% de los componentes de la pared celular. La modificación de la longitud de xiloglucanos durante la expansión celular está mediada principalmente por enzimas XTH a través de la endotransglucosilación, permitiendo así que la pared celular se expanda sin debilitarse. También tienen funciones de degradación de pared celular y lámina media ((Iwai *et al.*, 2013; Tsuchiya *et al.*, 2015).

Los *XTHs* pertenecen a una familia multigénica, que desempeñan papeles importantes en varios procesos durante la modificación y expansión de la pared celular, incluida la abscisión de órganos (Tsuchiya, *et al.*, 2015). *XTH3* es un gen miembro de esta familia, ha sido estudiado en *Dendrobium* (Phetsirikoon *et al.*, 2016), manzana (Taishanzaoxia) (Zhang *et al.*, 2017) y en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Saladié *et al.*, 2006). Se ha encontrado que el etileno induce la expresión de los genes de la familia *XTH* (Singh *et al.*, 2011; Iwai, *et al.*, 2013; Balaguera-López *et al.*, 2014), por ejemplo en *Sagittaria pygmaea* (Ookawara *et al.*, 2005; Dubois *et al.*, 2018), pero también pueden ser activados mediante la vía semi-independiente de etileno (Zhang *et al.*, 2017).

3.8. Análisis de expresión diferencial de genes en *Vanilla planifolia*, mediante PCR cuantitativa

Fock-Bastide y col. (2014), identificaron cinco genes clave relacionados con la acumulación de vainillina (genes fenilpropanoides) expresados durante el desarrollo del fruto de *Vanilla planifolia*. Mediante PCR cuantitativa, evaluaron los perfiles de acumulación del mRNA de estos genes durante el desarrollo y la maduración del fruto. Los genes estudiados fueron los que codifican las tres enzimas de la biosíntesis de fenilpropanoides: *PAL*, *C4H* y *4CL*; y enzimas relacionadas con el aroma de la vainilla: *4HBS* (4-hidroxibenzaldehído sintasa), enzima encargada de convertir el ácido p-coumárico a p-hidrozibenzaldehído de manera no oxidativa y que puede tener un papel en la biosíntesis de vainillina y de las proteínas *OMT2* y *OMT3*, las cuales parecen ser cercanas a las ácido caféico O-metiltransferasas y parecen estar involucradas en la biosíntesis de componentes fenólicos y flavonólicos.



En los genes *VpPAL1* y *VpC4H1* se observó una expresión diferencial de 3 a 8 meses después de la polinización. *VpPAL1* fue regulado progresivamente, alcanzando el nivel de expresión máximo en la madurez y mostró una correlación positiva con la maduración y la acumulación de vainillina. Por el contrario, los genes que codifican *4HBS*, *C4H*, *OMT2* y *OMT3* no mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión después del cuarto mes posterior a la polinización (Fock-Bastide *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

Durante varios años, *V. planifolia* ha presentado un incremento de lo que se conoce agronómicamente como abscisión o caída frutos inmaduros. Dicha problemática derivó en una disminución en la producción de vainilla de 90% aproximadamente, siendo hoy la principal causa de la baja producción de vainilla en México. Dada la importancia económica, cultural, social y ecológica de la vainilla, es necesario comprender el mecanismo molecular involucrado en la abscisión de ovarios no fertilizados de este recurso fitogenético, con el propósito de obtener a mediano plazo estrategias que permitan controlar el proceso de abscisión para incrementar la productividad del cultivo a nivel nacional y contribuir a la conservación del germoplasma.

5. HIPÓTESIS

Dada su actividad biológica reportada en la bibliografía, se espera que la vía dependiente de la señalización del etileno (genes *VpERS1*, *VpEIN3*, *VpERF*, *VpACO3* y *VpVAS1*), así como el gen degradador de pared celular (*VpXTH3*), se encuentren inducidos (con mayor ER), principalmente en el genotipo CH VI (condición de abscisión), en la zona de unión raquis-ovario/fruto y en el año 2017 (con mayor porcentaje de abscisión); respecto a la vía semi-independiente de la señalización del etileno (genes *VpFYF* y *VpHSL2*). Ya que se espera que la abscisión del ovario no fertilizado en *V. planifolia* esté regulada principalmente por la vía dependiente de etileno y que tanto la comunicación entre tejidos, como las diferentes condiciones climáticas entre años, favorecen la expresión de esta vía.



6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Analizar la expresión relativa de los transcritos de genes relacionados con las vías dependiente (*VpERS1*, *VpEIN3*, *VpERF*, *VpACO3*, *VpVAS1*) y semi-independiente (*VpFYF*, *VpHSL2*) de la señalización del etileno y de la enzima degradadora de pared celular (*VpXTH3*) y comparar esta expresión entre las siguientes variables: genotipos (CH I, tolerante, sin abscisión y CH VI, susceptible en condición de abscisión); tejidos (zona de unión raquis-ovario/fruto y Ovario adyacente a esta zona) y años (2016, año con menor cantidad de abscisión y 2017, año con mayor porcentaje de abscisión), para conocer los patrones de expresión de dichos genes en *V. planifolia*.

6.2. Objetivos particulares

- Conocer y describir los patrones de expresión de los genes implicados en las vías de abscisión (vía dependiente y semi-independiente de etileno) de ovario no fertilizado de *V. planifolia* a través de la cuantificación de su expresión relativa mediante qPCR.

- Comparar dichos patrones de ER entre las variables:
 - Entre dos años (2016- con menor porcentaje de abscisión y 2017-con mayor porcentaje de abscisión).

 - Entre dos genotipos (CH I-tolerante y CH VI-susceptible) de *V. planifolia*.

 - Entre dos tejidos (zona de unión ovario/fruto-raquis y ovario adyacente a esta zona) de *V. planifolia*.



7. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se describen el diseño experimental (**Fig. 14**) y los métodos utilizados (**Fig. 15**) para cumplir con los objetivos de este proyecto de investigación.

Vías de señalización a estudiar mediante el análisis de trascritos		Años	Tejidos	Genotipos	Condición	Tiempo	Localidad genotipos
Vía dependiente de etileno		2016 (menor abscisión)	Zu	CH-I	Sin abscisión	45 ddp	Pantepec (Pue)
Endógeno	Exógeno						
Vía semi-independiente de		2017 (mayor abscisión)	Ov	CH-VI	Con abscisión	45 ddp	San Rafael (Ver)

Figura 14. Diseño experimental para el análisis de expresión de genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no fertilizado de *Vanilla planifolia*

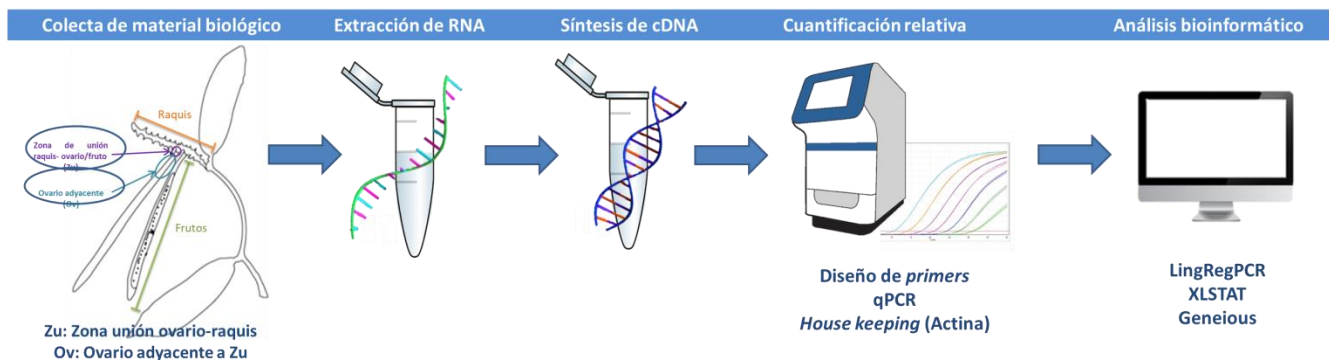


Figura 15. Métodos utilizados en el análisis de expresión de genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no fertilizado de *Vanilla planifolia*

7.1. Selección de genes a analizar. Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes expresados en las vías etileno-dependiente y etileno-independiente así como la separación celular en la lámina media, respectivamente. De éstos se eligieron los genes que, según su función, tienen un papel relevante en dichas vías. Otro criterio de selección fue la presencia de las proteínas de estos genes en el análisis proteómico previo de Granados (2016), se eligieron los que presentaron mayor expresión bajo condición de abscisión.



7.2. Diseño de *primers*. Las secuencias de los genes a analizar fueron buscadas en las bases de datos *GeneBank* del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (www.ncbi.nlm.nih.gov), *Phytozome v12.1* (phytozome.jgi.doe.gov) y/u *Orchidstra 2.0*. (especializada en la familia *Orchidaceae*) (orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw); se descargaron secuencias de genes de especies pertenecientes a la familia *Orchidaceae* o en su defecto, de alguna familia del Superorden *Liliana* o de alguna especie con la mayor cercanía filogenética posible (**Anexo 2**). A través de *Geneious* se corroboró en la base de datos *Uniprot* (www.uniprot.org) que la traducción de la secuencia de la proteína hipotética correspondiera con la secuencia referencia.

Estas secuencias se ingresaron en las bases de datos de nucleótidos antes mencionadas, para realizar una segunda búsqueda de secuencias homólogas en la familia *Orchidaceae* (**Anexo 2**), mediante la herramienta *BLAST* (Benson *et al.*, 2008). Los criterios de selección de las secuencias además de su relación filogenética, fueron valores del 80% o más para *Ident* y *Query cover* y de 0.0 en *E value* (<https://bioinformaticancbi.wordpress.com>).

Con ayuda del Software *Geneius*® 9.0.4., las secuencias seleccionadas se *mapearon* y contrastaron en el transcriptoma de la Zu del genotipo CH I sin abscisión y de la Zu del genotipo CH VI en condición de abscisión de *V. planifolia*. Esto para obtener secuencias consenso y utilizarlas a manera de sonda en la búsqueda de *contigs* ensamblados en el transcriptoma antes mencionado.

A partir de las secuencias de los *contigs* para cada gen, se diseñaron los *primers* en el programa en línea *PRIMER 3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) y en *Geneius*® 9.0.4. Las características de los *primers* diseñados fueron: longitud de 21nt, *Tm* de ~60°C, 50% de GC y un producto de amplificación de 80 a 120pb. Una vez diseñados, se ingresaron las distintas propuestas de *primers* y se evaluaron varios parámetros mediante el simulador en línea *OligoAnalyzer 3.1-Integrated DNA Technologies* (www.idtdna.com/calc/analyzer), para corroborar su especificidad y verificar que no formaran homodímeros y/o heterodímeros (Owczarzy *et al.*, 2008).



Según estos criterios, se eligieron los *primers* con mejores características (**Cuadro 2**). Los oligonucleótidos de estos cebadores fueron sintetizados por el laboratorio Sigma-Aldrich.

7.3. Material biológico. La colecta de material biológico se realizó en el mes de Mayo de 2016 y 2017. En el año 2017, se registraron altos porcentajes de abscisión de ovario no fertilizado (comúnmente conocido como “caída de fruto”), a diferencia del año anterior (comunicación directa de los productores). Para la condición de caída, se muestrearon los tejidos del genotipo CH VI (susceptible), al momento de la ocurrencia de la abscisión del ovario no fertilizado (45 días); mientras que para la condición sin caída, se colectaron tejidos del genotipo CH I (tolerante) a los 45 días después de la polinización. Se realizaron tres réplicas experimentales para cada año de colecta, genotipo y condición. El genotipo CH I se colectó en la localidad de Pantepec, Puebla y el genotipo CH VI en Puntilla Aldama, Veracruz. Para cada genotipo se tomaron muestras del tejido o zona de unión raquis-ovario/fruto (Zu) y del ovario adyacente a esta zona (Ov), es decir, la sección del ovario inmediata a la Zu (**Fig. 16**). Las muestras se etiquetaron y se conservaron tanto en nitrógeno líquido como en una solución de preservación RNA later (QIAGEN).

7.4. Extracción de ARN total. Para la extracción de RNA total con el Kit *ZR Plant RNA MiniPrep* (Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante) se emplearon 30 mg de tejido fresco los cuales se maceraron con nitrógeno líquido. Para eliminar remanentes de DNA genómico, al RNA obtenido se le realizó un tratamiento con DNAsa I: el RNA se precipitó en 20 µl de acetato de sodio 3 M y 60 µl de etanol a 4°C, al 100%, durante 12 horas a -80°C; pasado este lapso, se descartó el etanol y la pastilla se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas. Una vez obtenido el RNA se visualizó en geles de electroforesis a 1.4% para confirmar la presencia e integridad del RNA en la muestra.

7.5. Síntesis del cDNA. Para la síntesis del cDNA se utilizó el Kit *Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Fischer), utilizando oligodT. El producto obtenido fue utilizado como templado para la reacción de PCR en tiempo real.

Cuadro 2. Características de los *primers* diseñados para el análisis de la ER de los genes relacionados con la abscisión de ovario no fertilizado en *V. planifolia*

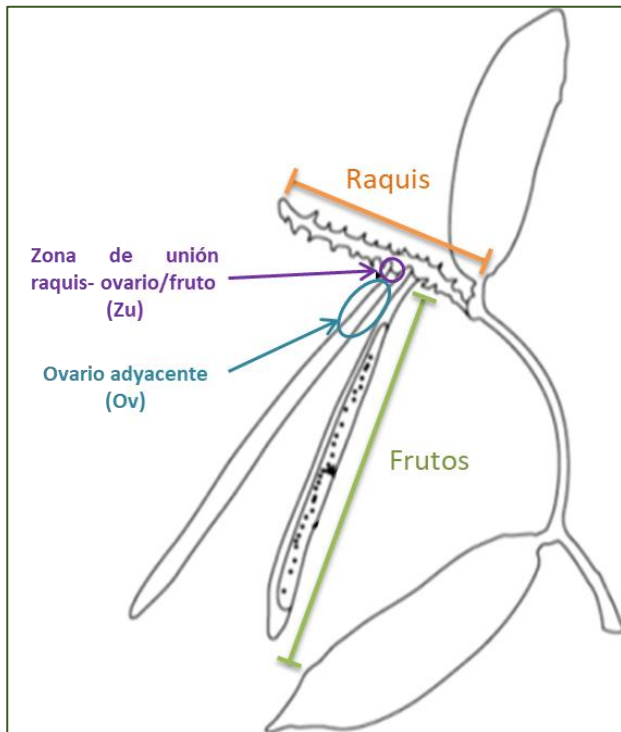
Vía de señalización	Gen	Función	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Tamaño del producto (pb)	G/C (%)	Secuencia <i>primer</i>
Dependiente de del etileno	<i>VpERS1</i>	Receptor de etileno. <u>Metaloproteína tipo proteína-cinasa.</u> (Taylor & Whitelaw, 2001; Wang <i>et al.</i> , 2013; Eccher, 2015; Chen, 2015; Huang <i>et al.</i> , 2016)	21 21	60.40 59.59	99	52.38 52.38	5'- CTGTTGCACTTTCTCATGCGG -3' 3'- CCTCCCTGCGTGCTAAATCTA -5'
	<i>VpEIN3</i>	Regulador positivo de la transducción de señales del etileno, activa la expresión de otros FT de genes sensibles a etileno. <u>Factor de Transcripción.</u> (Taylor & Whitelaw, 2001; Barrera-Ortiz <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2013; Chen, 2015; Tucker & Kim, 2015; Huang <i>et al.</i> , 2016).	21 21	59.86 60.68	113	52.38 52.38	5'- GTGGATATGATGGCTGTGGGT -3' 3'- CTATGTGCCGGCTCAACAGAA -5'
	<i>VpERF</i>	Activador transcripcional. Regulación de la expresión génica. Activa una cascada de señalización de síntesis de etileno. <u>Factor de transcripción.</u> (Weber & Hellmann, 2009; Nakano <i>et al.</i> , 2013; Chen, 2015).	21 21	59.93 60.13	99	57.14 57.14	5'- GGATGTAGTGGTAGTCGGCAG -3' 3'- CTGGAGGTGCTCTTCTGGATG -5'
	<i>VpACO1</i>	Cataliza el paso final de la síntesis del etileno a partir de 1-Aminociclopentano-carboxilato (ACC). <u>Oxidasa.</u> (Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006).	21 21	60.13 59.93	87	52.38 47.62	5'- CCCGGTAATCAACATGGAGCT -3' 3'- AAACCCCAATTTTACAGGCG -5'
	<i>VpVAS1</i>	Interrupción del flujo metabólico de auxina y etileno. <u>Amino transferasa.</u> (Zheng <i>et al.</i> , 2013).	21 21	59.93 60.07	113	52.38 57.14	5'- AGAAGAACCCCAAGCTCAAG -3' 3'- CTTCAAGGTCGCTCCCTCAC -5'
Ambas vías (dependiente y semi-independiente de etileno)	<i>VpFYF</i>	Ruta de abscisión semi-independiente de etileno. Regula negativamente la vía de señalización del etileno a través de la represión de la familia EDF, genes de la vía de señalización de etileno. También regula la expresión de genes como <i>IDA/HAESA/HSL2</i> , que controla el inicio de la abscisión. <u>Factor de transcripción.</u> (Chen, 2015).	21 21	60.07 60.34	119	57.14 52.38	5'- GGAGTTGAAGATGGTGAGGGG -3' 3'- CTGAGAGCTCGAAGGCCTTTT -5'
Semi-independiente de etileno	<i>VpHSL2</i>	Controla inicio de abscisión mediante ruta <i>IDA/HAESA/HSL2</i> . Parcialmente dependiente de etileno. <u>Receptor tipo cinasa.</u> (Chen, 2015; Tucker, 2012; Cho <i>et al.</i> , 2008; Vie <i>et al.</i> , 2015; Stø <i>et al.</i> , 2015).	21 21	60.2 60.0	113	52.38 47.62	5'- GGGAGTCCGTCAAAACCTGTGA -3' 3'- AAGCACGTCATGAAGCAAACC -5'
Ambas vías (dependiente y semi-independiente de etileno)	<i>VpXHT3</i>	Proteólisis celular. Degradación de pared celular y lámina media. Remodelación de la pared celular. <u>Hidrolasa.</u> (Tucker & Kim, 2015; Phetsirikoon <i>et al.</i> , 2016).	21 21	60.06 60.2	103	57.14 52.38	5'- CCAGCTCCTCACTCTCTCTCT -3' 3'- GGGTACGAGCTTGATCTGCAT -5'
<i>House keeping</i>	<i>VpACT</i>	Gen de referencia	22 20	60.1 60.0		52.4 52.5	5'-GGGTTACTCCTTTACGACCACA-3' 5'-GCTGCTCTTCGCTGTGTCAA-3'





7.6. Verificación de hibridación *primers* diseñados/cDNA y amplificación de los genes. Se realizó PCR punto final mediante el Kit *MyTaq™ DNA Polymerase* (BIOLINE). La mezcla de reacción se incubó en un termociclador T100 Bio-Rad para 35 ciclos de reacción ajustado a muestras de 10 µl. Cada ciclo consistió en: la activación de la Taq polimerasa 1 min a 95°C; la desnaturalización 15 seg, 95°C; el alineamiento a 60°C por 15 seg y la extensión 10 seg a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en geles de electroforesis en geles de agarosa a 1.7%.

A.



B.



Figura 16. Tejidos colectados para el análisis de genes relacionados con la abscisión de ovario no fertilizado de *Vanilla planifolia* A. Esquema del fruto de *V. planifolia*; B. Fotografía del fruto de *V. planifolia*

7.7. PCR en tiempo real (qRT-PCR). Para la reacción de qPCR se utilizó el Kit *Máxima SYBR® GreenROX qPCR Master Mix* (Thermo Fischer) ajustado a 10 µl con 1µl de cDNA por reacción en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System. El programa a seguir fue: un ciclo inicial a 95°C durante 10 min,



seguido por 45 ciclos de 15 seg a 95°C; 1 min a 60°C; 15 seg 95°C; 1 min, 60°C y 15 seg a 95°C. El equipo arroja los valores de Ct (*cycle threshold*), de la cinética de amplificación de cada uno de los genes, los cuales fueron exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel para su análisis correspondiente con ayuda del programa *LingRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data* v3.0.0. La expresión (E) se calculó de acuerdo con la fórmula: $E = Peff^{-\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2004), donde Peff es la eficiencia de amplificación, calculada en el programa *LingRegPCR*. Los niveles de expresión se indican como Expresión Relativa, ya que para la normalización de los datos se utilizó la expresión del gen constitutivo o *housekeeping* de la proteína Actina (*ACT*).

7.8. Análisis de resultados. No se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y por lo tanto no se establecieron diferencias significativas entre la ER de los genes, debido a que el objetivo era analizar y comparar patrones de expresión de las vías implicadas, entre las diferentes situaciones (años, genotipos y tejidos), en cambio se utilizaron herramientas de análisis multivariado de conglomerados y su representación gráfica: *heat map* en el recurso en línea: <http://www.heatmapper.ca/expression/>. También, mediante XLSTAT, se realizó un Análisis de Componentes Principales para encontrar correlaciones positivas o negativas entre muestras de años, genotipos y tejidos. Se le denomina alta expresión, inducción o sobre-expresión a aquellos genes que presentan un alto número de transcritos.

7.9. Relación de los resultados de ER con las condiciones climáticas de cada año. Para conocer si existe una diferencia significativa entre las condiciones ambientales de cada año, se comparó la desviación estándar (en Microsoft Excel) para cada dato meteorológico entre el año 2016 y 2017 (**Anexo 3**). Este análisis se realizó para cada genotipo. Se obtuvieron los datos mensuales para Abril, Mayo y Junio del año 2016 y el año 2017 de temperatura (mínima, máxima y media); precipitación (mínima, máxima y total) y evaporación (máxima, mínima, media y total) (**Anexo 3**) (<http://smn.cna.gob.mx>; solicitados vía correo electrónico a la ventanilla única de la Coordinación General de SMN, CONAGUA).



Se utilizó la información de las estaciones meteorológicas más cercanas a los puntos de colecta, con información disponible. Para el genotipo CH I (tolerante a la abscisión), ubicado en el Municipio de Pantepec (Estado de Puebla), se utilizaron los datos de la estación “Ameluca”, localizada en este mismo Municipio. Por su parte, el genotipo CH VI (susceptible a la abscisión), se encuentra Puntilla Aldama (20 msnm), Municipio San Rafael (Estado de Veracruz). Algunos de los datos meteorológicos de las estaciones ubicadas en dicho Municipio, no se encuentran disponibles, por lo que se tomaron de referencia los datos de la estación meteorológica más cercana y con altitud similar (10 msnm), denominada “El Raudal”, localizada en el Municipio de Nautla (Estado de Veracruz) (<http://smn.cna.gob.mx>).

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión relativa entre los genes de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de *V. planifolia*

Cómo análisis preliminar se muestran los valores de ER obtenidos mediante el análisis de qPCR (**Anexo 1 y Fig. 17**); estos resultados muestran el comportamiento individual de los genes, pero debido a que el objetivo era analizar y comparar patrones de expresión de las vías implicadas entre las diferentes variables (años, genotipos y tejidos), se utilizaron herramientas de análisis multivariado, en lugar de Análisis de Varianza (ANOVA).

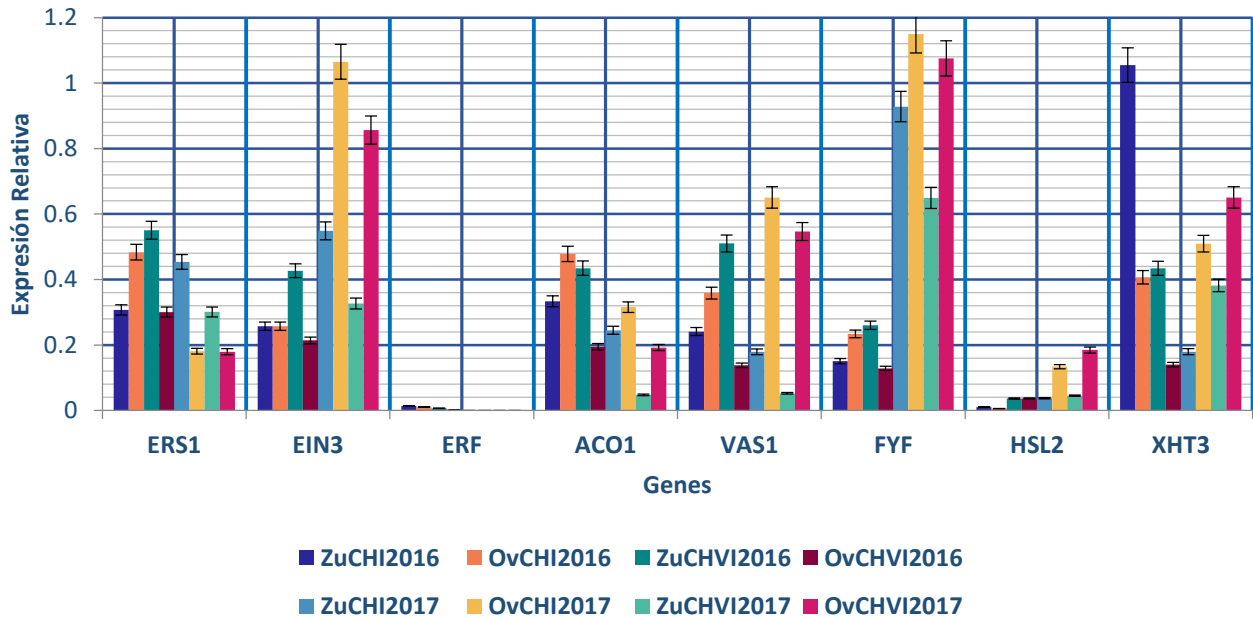


Figura 17. Expresión Relativa de los genes relacionados con la abscisión de ovario no fertilizado de *Vanilla planifolia*

Por lo tanto, para una mejor explicación biológica de los patrones de expresión de dichas vías y entre las variables, los datos se presentan en gráficos tipo *heat map* y ACP, herramientas que permitieron encontrar estos perfiles de expresión.

Los *heat maps* muestran el patrón de ER de los genes estudiados; cada *cluster* o agrupamiento indica un perfil de expresión, indicando que los genes dentro de cada grupo tienen una expresión muy similar en todos los genotipos y condiciones. El color azul oscuro, indica expresión alta; el azul agua, expresión media; el verde oscuro, baja expresión y el negro que no hubo expresión génica.

Los genes que presentan un comportamiento similar entre sí son *VpACO1* y *VpERS1* y en otro agrupamiento *VpERF* y *VpHSL2*. Estos genes se agrupan de la misma forma en ambos años aunque con valores de ER opuestos entre años (**Fig. 17**, marcos azules).



Para analizar los patrones de expresión de los genes relacionados con la abscisión de ovario no fertilizado en *V. planifolia*, en los diferentes años y tejidos, se utilizaron los dos primeros componentes del ACP que, en proporción acumulada, explica el 87.51% de la varianza de los datos (57.50 el primer componente y 30.01% el segundo). En el gráfico de doble proyección (**Fig. 18**) podemos visualizar tanto el gráfico de puntuaciones (puntos azules) cómo el gráfico influencias (líneas verdes).

El gráfico de puntuaciones representa la estructura del comportamiento de los tejidos en ambos años, determinada por la ER de los genes. En la **Fig. 18**, se pueden observar cuatro agrupaciones de puntos, estas distribuciones separadas indican patrones de comportamiento de los datos. Del lado izquierdo (2° y 3° cuadrantes), observamos los datos del año 2016, y del lado derecho (1° y 4° cuadrantes) los del año 2017. Ambos años presentan dos grupos de datos en cuadrantes opuestos.

8.1.1. Vía dependiente de la señalización del etileno

En el gráfico de ACP (**Fig. 19**), se observa que los genes que determinaron el patrón de expresión en el año 2016 fueron *VpACO1*, *VpERF* y *VpERS1* mientras que, para el año 2017 fueron *VpVAS1*, *VpEIN3*, *VpHSL2* y *VpFYF*. Los resultados para *VpXTH3* se analizan aparte, ya que este gen puede ser regulado por la vía dependiente y semi-independiente de etileno, además de que, según el gráfico de ACP, no contribuye a explicar los patrones de expresión en ninguna condición. La importancia biológica de estos patrones se discute a continuación.

8.1.1.1. Genes de respuesta a etileno

Cómo se mencionó en secciones anteriores, la actividad de ERS1 es dependiente de la concentración de etileno exógeno, a altas concentraciones de la hormona, la señalización de este receptor es bloqueado (Hall *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2010). La baja expresión de *VpERS1* en el Ov del genotipo CH VI en ambos años y del genotipo CH I en 2017 (**Figs. 17 y 18 y Anexo 1**), sugieren la actividad por altas concentraciones de etileno exógeno en esos tejidos.

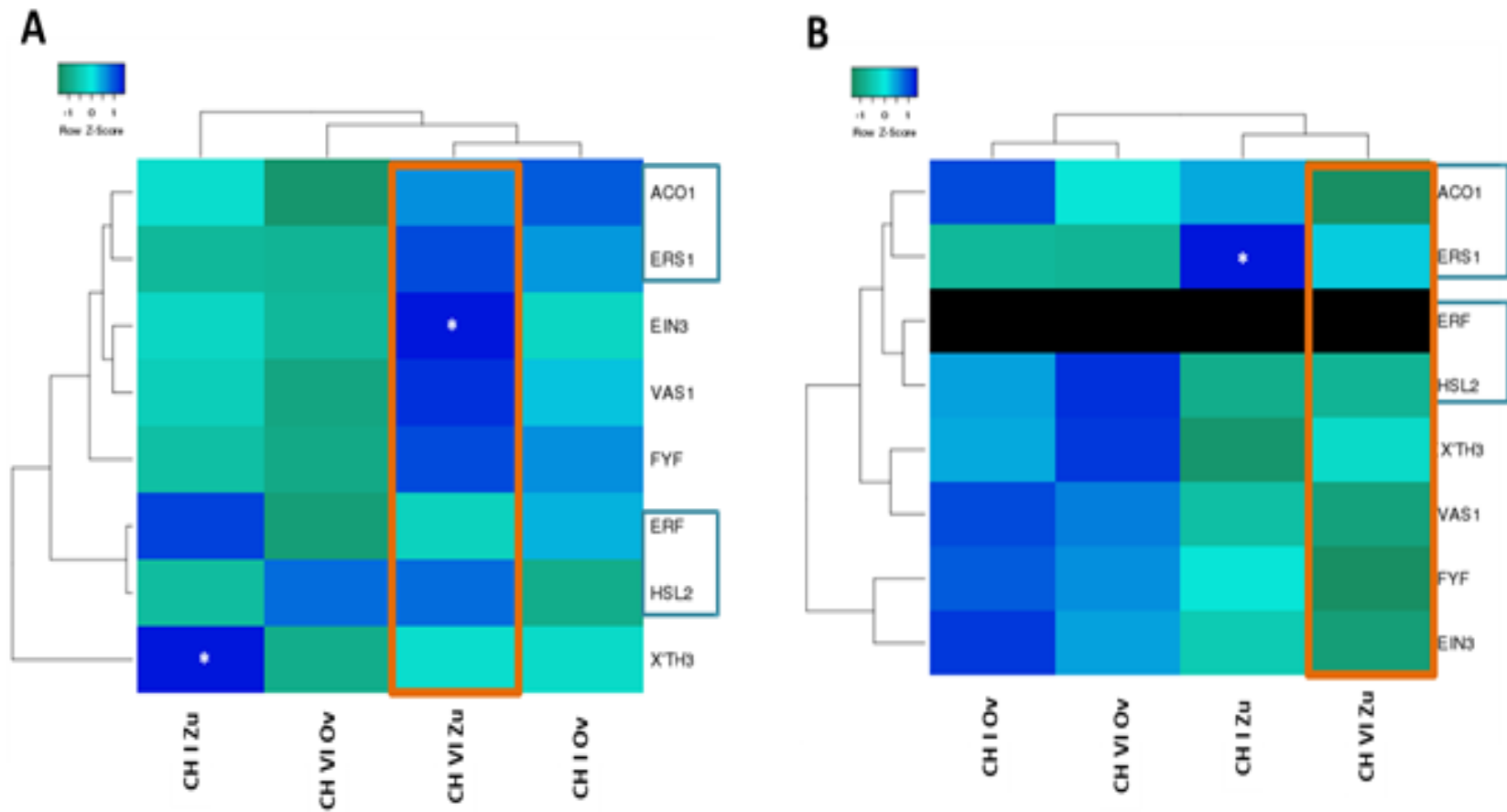


Figura 18. Heat map de la Expresión Relativa de los genes iredacionados conla abscisión de ovario no fertilizado de *Vanilla planifolia*
A. Resultados obtenidos del material colectado en el año 2016. **B.** Resultados obtenidos del material colectado en el año 2017 (con gran porcentaje de caída de ovario no fertilizado). **CH I Ov:** Ovario adyacente en genotipo CH I; **CH I Zu:** zona de unión entre el raquis y ovario/fruto en genotipo CH I; **CH VI Ov:** Ovario adyacente en genotipo CH VI; **CH VI Zu:** zona de unión entre el raquis y ovario/fruto en genotipo CH VI. (*): Genes con mayor expresión.
Rectángulo anaranjado: Indica el contraste del patrón de expresión en **CH VI Zu**. Los niveles de ER están representados en un gradiente de color: tonalidades azules indican alta ER; tonalidades verde agua: ER intermedias, tonalidades verde: ER baja y negro: no expresión.



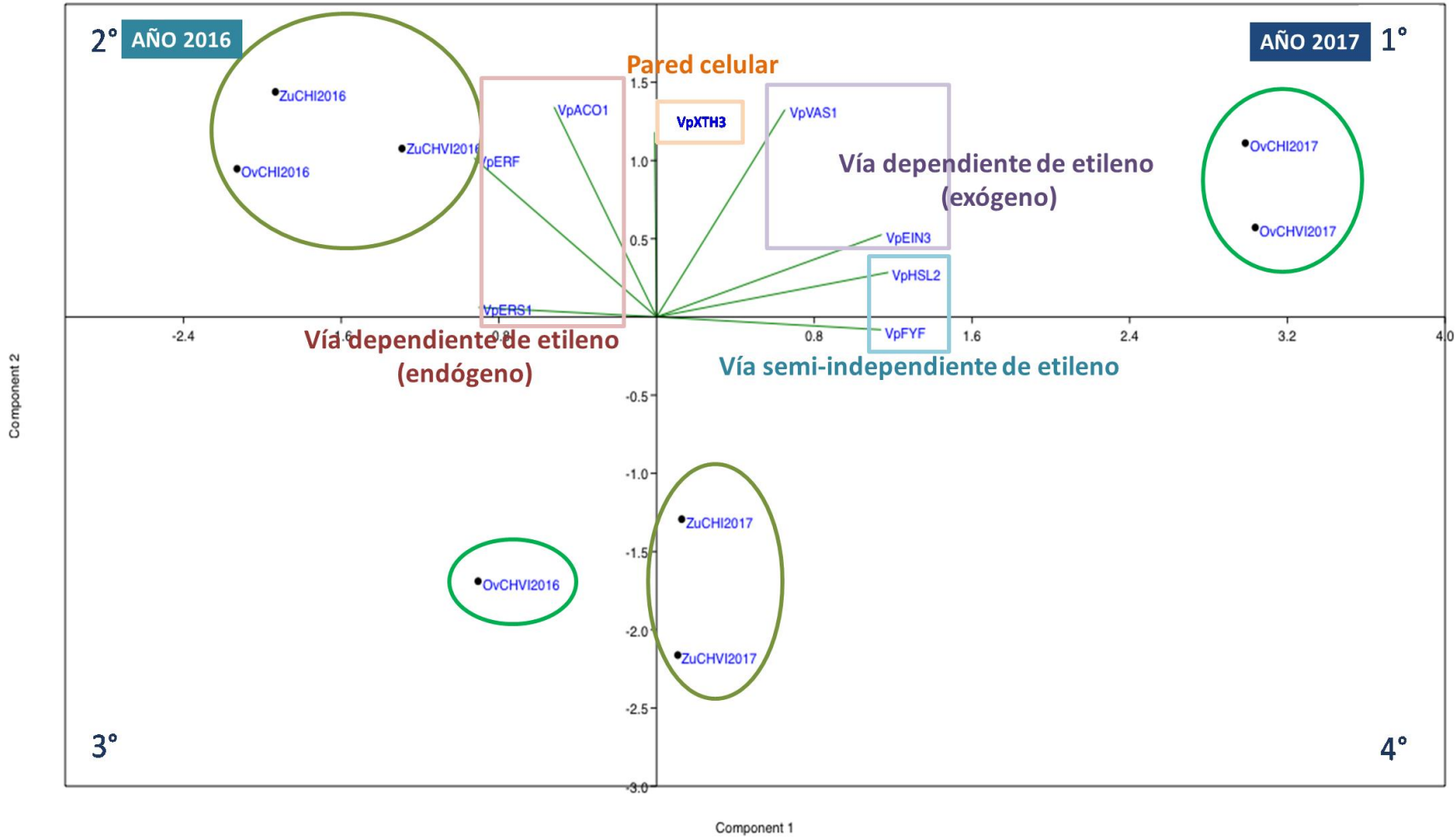


Figura 19. Gráfico de doble proyección del Análisis de Componentes Principales de la Expresión Relativa de los genes relacionados con el proceso de abscisión de ovario no pfertilizado de *Vanilla planifolia*
CH I Ov: Ovario adyacente en genotipo CH I; **CH I Zu:** zona de unión entre el raquis y ovario/fruto en genotipo CH I;
CH VI Ov: Ovario adyacente en genotipo CH VI; **CH VI Zu:** zona de unión entre el raquis y ovario/fruto en genotipo CH VI.
Puntos azules: Gráfico de puntuaciones (Tejidos de ambos genotipos, en los diferentes años);
Líneas verdes: Gráfico de influencias (genes).





Se esperaba mayor actividad de *VpERF*, especialmente en el genotipo CH VI Zu, año 2017, sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados para este gen (**Figs. 17 y 18 y Anexo 1**). Esto puede deberse a que existen otros factores de transcripción de respuesta a etileno con función redundante, tales como: *EDF*, *AP2*, *RAP*, entre otros (Wang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015), los cuales pueden estar actuando en dicha respuesta en *V. planifolia*.

El gen *EIN3* codifica un factor de transcripción y regulador positivo de la transducción de señales del etileno, activando la expresión de otros FT de genes sensibles al etileno (Taylor & Whitelaw, 2001; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015; Tucker & Kim, 2015; Huang *et al.*, 2016). *VpEIN3* presentó alta expresión en el Ov del genotipo CH VI en ambos años, y del genotipo CH I en 2017 (**Figs. 17 y 18 y Anexo 1**); la alta expresión de *VpEIN3* y de *VpVAS1* en los tejidos y condiciones donde la expresión de *VpERS1* y de *VpACO1* es baja, indica que en el Ov del genotipo CH VI en ambos años, y del genotipo CH I en 2017, la vía de señalización de etileno exógeno está activa (**Fig. 19**).

8.1.1.2. Genes de regulación de biosíntesis de etileno

Se ha encontrado que el gen *VAS1*, es un enlace metabólico entre auxina y etileno, regulando negativamente la biosíntesis de ambas fitohormonas, principalmente del etileno, ya que prefiere a la metionina (precursor del etileno) como donador de grupo amino para la conversión de 3-IPA, antes que al L-triptofano (precursor de la auxina) (Zheng *et al.*, 2013). En este estudio, se observa mayor expresión de este gen en el Ov del genotipo CH VI en ambos años, y del genotipo CH I en 2017 (**Figs. 17 y 18 y Anexo 1**). Por su parte, la enzima ACC oxidasa (*ACO1*) cataliza la reacción final para la biosíntesis de etileno (Jordán & Casaretto, 2006; Taiz & Zeiger, 2006; Balaguera-López *et al.*, 2014). *VpACO1* está inducido en la Zu de ambos genotipos en ambos años (**Figs. 17 y 18 y Anexo 1**). La alta expresión de *VpERS1* y *VpACO1* en los tejidos y condiciones donde la expresión de *VpEIN3* y de *VpVAS1* es baja, indica que en la Zu de ambos genotipos, en ambos años, y del genotipo CH I en 2016, la vía de señalización de etileno endógeno está activa (**Fig. 19**).



8.1.2. Vía semi-independiente de la señalización del etileno

En estudios anteriores, se ha sugerido que FYF regula negativamente la vía de señalización del etileno a través de la represión del factor de transcripción que promueve la abscisión -familia EDF- (Xie *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015), por lo que se esperaba baja ER de *VpFYF*, en año 2017, genotipo CH VI, en especial en la Zu y alta ER en el genotipo CH I. No obstante, los resultados en *V. planifolia* no coinciden con la literatura, ya que se observó una alta expresión de *VpFYF* en el año 2017. El valor de expresión de este gen en la Zu del genotipo CH VI fue de los más altos, lo que implica un comportamiento diferente en *V. planifolia* (**Figs. 17 y 18.B**).

De igual manera, dada la regulación génica reportada en bibliografía, se esperaba que el gen *VpHSL2*, disminuyera cuando *VpFYF* tuviera mayores niveles de expresión, sin embargo, el comportamiento de estos genes fue diferente en *V. planifolia* (**Fig. 17 y Anexo 1**). También se observó que la expresión más baja de *HSL2* en todos los tejidos, condiciones y años, respecto a los otros genes.

Los patrones de expresión antes mencionados, pueden deberse a que *FYF* esté reprimiendo la actividad de *VpHSL2* (ocasionando valores bajos de este gen en todos los años, condiciones y tejidos) y la relación del nivel de expresión entre *VpFYF* y *VpHSL2*, puede estar ocurriendo mediante un mecanismo de retroalimentación aún no descrito, es decir, que el aumento del nivel de expresión de *VpHSL2* pudiera activar la señalización para el aumento en la expresión de *VpFYF*. Aún se desconocen algunos genes río abajo de la vía de señalización por gen *FYF* y su función, por lo que no se puede explicar por completo su comportamiento.

Por su parte, en el patrón de expresión global se observó que estos genes de la ruta de abscisión semi-independiente de etileno, están relacionados con la vía de etileno exógeno (alta expresión de *VpFYF* y *VpHSL2* en los mismos tejidos y condiciones donde *VpEIN3* presenta alta expresión y *VpERS1* baja expresión) (**Fig. 19, 1° y 3° cuadrante**).



Esto puede deberse a lo reportado por Meir y col. (2019), quienes sugirieron que la expresión espacial del gen *AtIDA* en la ZA de *Arabidopsis* está regulada por etileno, ya que se encontró que esta fitohormona regula al alza a los ortólogos de *IDA* en otras especies de plantas: peciolo y láminas foliares en soya (*Glycine max*) (Tucker & Yang, 2012); frutos de la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) (Stø et al., 2015); ZA del pedúnculo del fruto en litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) (Ying et al., 2016), así como en la ZA en flores de altramuz (*Lupinus luteus*) (Wilmowicz et al., 2018).

La expresión del gen *IDA* en la ZA de los órganos florales de *Arabidopsis* es promovida por el etileno, pero el etileno puede no ser esencial para la continuidad de su expresión durante la abscisión (Butenko et al., 2006). Basado en las observaciones anteriores, se puede concluir que, como se sugirió recientemente, el complejo *IDA-HAE-HSL2* no está involucrado en la inducción real en la ZA de los procesos de abscisión de órganos, pero regula etapas posteriores del proceso. El modelo de la abscisión del órgano floral de *Arabidopsis* aún no se puede aplicar fielmente a otras especies de plantas (Meir et al., 2019).

8.1.3. *VpXTH3*, gen que codifica una enzima degradadora de pared celular

Uno de los valores más altos de expresión fue el del gen *VpXTH3* en CH I Ov del 2016 (Figs. 17 y 18.B y Anexo 1), que codifica una enzima degradadora y remodeladora de pared celular y lámina media (Phetsirikoon et al., 2016). Se ha encontrado que los genes de la familia *XTH* pueden ser sensibles a la señalización por etileno (Singh et al., 2011; Iwai, et al., 2013), pero también pueden ser activados mediante la vía semi-independiente de etileno (Zhang et al., 2017; Meir et al., 2019).

Consistente con lo encontrado en este estudio, se ha encontrado que la expresión del gen *XTH3* durante la maduración y la abscisión del fruto, puede diferir entre genotipos y/o especies, en función de las modificaciones de la pared celular realizada por las enzimas relacionadas (Zhang et al., 2017). En una sección posterior se discuten estos resultados en relación con el tipo de tejido donde se expresa.



8.2. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de *V. planifolia*, entre años

En la **Fig. 18**, (*heat map*) se puede observar el patrón de expresión de los genes estudiados. Se esperaba que la expresión de todos los genes se encontraran con alta expresión en la Zu del genotipo CH VI (a excepción de *VpFYF*). Los resultados del nivel de ER de los genes *VpERS1*, *VpEIN3*, *VpACO1*, *VpVAS1* y *VpHSL2*, en el año 2016 presentaron este comportamiento esperado (tonalidades azul), y la ER de los factores de transcripción *VpERF* y *VpFYF* fue contraria a lo esperado (**Fig. 18.A**). Mientras que, en el año 2017, la ER de todos los genes fue contraria a la esperada (**Fig. 18.B**).

Los genes de respuesta a etileno que definen el patrón de expresión para año 2016, fueron *VpACO1* (gen de la enzima de la biosíntesis de etileno interno), *VpERF* (gen de un factor de transcripción de respuesta a etileno) y *VpERS1* (gen del receptor de etileno) (**Fig. 19**, 2° cuadrante). Estos resultados sugieren que en años con comportamiento “típico” ante el fenómeno conocido agrónomicamente como caída del fruto (2016), la vía metabólica reguladora es la del etileno endógeno como posible respuesta a la baja concentración de etileno exógeno.

En el año con mayor porcentaje de caída (2017), los genes de respuesta a etileno que determinan el patrón de expresión génica, fueron: *VpEIN3* (factor de transcripción de respuesta a etileno) y *VpVAS1* (regulador de las rutas hormonales) (**Fig. 19**, 1° cuadrante), lo que sugiere que, bajo las condiciones meteorológicas del año 2017 (discutidas más adelante), la vía de regulación predominante fue la de etileno exógeno, posiblemente en respuesta a estrés.



La ER contrastante de los genes encontrada entre las muestras del año 2016 y 2017 en el fruto de *V. planifolia*, podría explicarse mediante las condiciones ambientales presentadas en cada año, ya que, como se señaló anteriormente, se ha reportado que tanto la señal de abscisión, como de los genes de respuesta a etileno, puede modificarse derivado del estrés provocado por diversos factores ambientales (Zhang *et al.*, 2009, 2011; Zhu *et al.*, 2010; 2011; Wang *et al.*, 2013; Dubois *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

Las diferencias más significativas de las condiciones climáticas entre años, para ambas localidades fueron la precipitación máxima y total y la evaporación total (para los tres meses, **Anexo 3**, en negrita). Al parecer los factores relacionados con la humedad podrían ser importantes en el proceso de abscisión; contrario a lo que ocurre con la temperatura, ya que sólo se presentaron diferencias significativas para la temperatura máxima entre años, para la estación “Ameluca” (genotipo CH I) (**Anexo 3**, en negrita).

No obstante, los días de máxima temperatura son diferentes entre años, en todos los meses (a excepción de Abril en Pantepec) (**Anexo 3**, en negrita); estas diferencias entre datos sugieren que el día que presente la máxima temperatura, puede ser relevante para la regulación de la señal de abscisión.

Consistente con estos resultados, se ha observado que el amarilleo y la caída del ovario/fruto de *V. planifolia* se manifiestan a altas temperaturas (mayores a 32°C) durante los meses de luz solar intensa y ocurre en mayor volumen cuando ocurren fuertes lluvias en un día y al siguiente se registra una elevada temperatura. Esta caída ocurre en los primeros 2 meses después de la polinización, principalmente en junio, mes con lluvias fuertes (Hernández-Hernández, 2011; comunicación directa con productores). El material utilizado en el presente trabajo, corresponde a este periodo de dos meses.



Debido a la alta precipitación y evaporación registradas en el año 2017, el estrés que enfrenta *V. planifolia*, podría ser por humedad alta, por lo que la baja ER de la red génica de la vía dependiente de etileno, encontrada en los tejidos colectados en el año 2017, puede deberse a lo que se ha reportado del etileno y el estrés hídrico (Salazar *et al.*, 2015). Cuando existe alta evaporación, aumenta la concentración del etileno en el suelo y en concentraciones demasiado elevadas, esta hormona gaseosa puede ser tóxica. Algunas plantas en respuesta, buscan la detoxificación mediante la eliminación de etileno. Posiblemente en *V. planifolia*, en el año 2017, la actividad de los genes de la vía del etileno endógeno se ve reducida (especialmente del gen de biosíntesis de etileno endógeno, *VpACO1*) como estrategia para limitar la concentración de esta hormona (Jiménez *et al.*, 2012).

En el presente estudio, los genes que presentaron mayor diferencia entre años son: en la Zu, genotipo CH I: *VpFYF* (aumento) y *VpXTH3* (disminución); en el Ov, genotipo CH I: *VpEIN3* y *VpFYF* (aumento en ambos); en la Zu, genotipo CH VI: *VpACO1* (disminución), *VpVAS1* (disminución) y *VpFYF* (aumento) y en el Ov, genotipo CH VI: *VpXTH3* y *VpFYF* (aumento) (ver **Anexo 1**); por lo que se puede asumir que *VpFYF* y *VpXTH3* son los genes más sensibles a los cambios en las condiciones meteorológicas.

8.3. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de *V. planifolia*, entre genotipos

A pesar que el proceso de abscisión del fruto es importante en la dispersión y evolución de las plantas, desde el punto de vista agrícola este proceso es un factor limitante en la productividad de los cultivos (Corbacho, 2015; Zhang *et al.*, 2015), incluida *V. planifolia*. Derivado de esto, a través del tiempo se han seleccionado cultivares y/o genotipos vegetales con características relacionadas con la reducida abscisión de frutos y semillas (Gross & Olsen, 2010; Corbacho, 2015).



Algunos ejemplos de la selección de variedades, cultivares o genotipos para disminuir la abscisión del fruto son: las variedades de tomate *jointless* con desarrollo defectuoso del pedúnculo del fruto (Mao *et al.*, 2000) y las variedades tardías de naranja dulce, las cuales presentan retención retrasada del fruto durante el periodo de maduración (Gallasch, 1996).

Respecto a la caracterización y selección de estos grupos con diferentes grados de sensibilidad a etileno, en *Rosa hybrida* L. (Müller *et al.*, 2000) y en la flor del guisante (*Pisum sativum* L.) (Orzáez, 1999) -efímera; con autopolinización y con síndrome post-polinización-, se encontró que la regulación diferencial por etileno de la expresión de la familia de genes del receptor *ERS1* puede proporcionar un mecanismo para lograr sensibilidades diferenciales, incluso en la misma respuesta en diferentes condiciones. El nivel de expresión de los genes de esta familia de receptores, está relacionado con el grado de respuesta del etileno, actuando como un mecanismo de retroalimentación negativa que reduce progresivamente la sensibilidad del órgano (Kühn *et al.*, 2014).

También se han encontrado diferencias en la expresión de enzimas de la biosíntesis de etileno entre genotipos, por ejemplo, Zhang y col. (2017) mencionan que en la biblioteca genómica de la manzana "*Golden Delicious*", se han encontrado dos formas del gen *ACS1*, (nombradas ACS1-1 y ACS1-2). ACS1-1 confiere alta producción de etileno, contrario a ACS1-2 que se vincula con el bajo nivel de producción de etileno por una inserción en la región promotora que ocasiona una fuerte disminución de la actividad de transcripción. La variedad "*Taishanzaoxia*" posee genotipo homocigoto ACS1-1/-1, con elevados niveles de transcripción de *ACS1* durante el periodo de desarrollo del fruto y se correlacionaron positiva y significativamente con la producción de etileno (Zhang *et al.*, 2017).

Realizar estudios posteriores de polimorfismos genéticos en los genes implicados en el proceso de abscisión en *V. planifolia*, podrían determinar si este tipo de fenómenos ocurren también en esta orquídea.



Para la familia Orchidaceae, se ha encontrado que la mayoría de las especies son altamente sensibles a la abscisión floral por la acción de etileno. Sin embargo se encontró que individuos de los géneros *Cymbidium* y *Dendrobium* no presentaron esta sensibilidad (Van Doorn, 2002). Dicha sensibilidad no sólo es diferente entre especies, sino también se ha observado que la variación infraespecífica de los cultivares confiere una sensibilidad diferente, tal es el caso de *Phalaenopsis* (Chang *et al.*, 2013; Olsen *et al.*, 2015).

Esta diferencia de sensibilidad a etileno, reflejada en la ER de los genes de respuesta a etileno del año 2016, puede estar ocurriendo en los genotipos de *V. planifolia*, derivada del proceso de selección. El conocimiento local que existe en torno a la selección de esquejes de vainilla, responde a las distintas apreciaciones culturales y sensoriales que existen entre los grupos indígenas pluriétnicos de la región, que apoyados en la reproducción clonal iniciaron un proceso de selección-domesticación que no ha terminado y que da respuesta a la dinámica social, cultural, económica, ambiental y biológica de la región del Totonacapan (Herrera-Cabrera *et al.*, 2014).

El genotipo CH I se ubica, usa, selecciona y conserva exclusivamente en la zona ecológica de mayor altitud, bajo un proceso de selección de esquejes con más elementos de conocimiento tradicional, con características aromáticas silvestres relacionadas con material no domesticado y comercialmente poco atractivo; cultivado principalmente en acahual y solares tradicionales. Mientras que CH VI es distribuido en diversos puntos, seleccionado por su contenido de vainillina, con alta importancia comercial y cultivado a mayor escala (Salazar-Rojas *et al.*, 2012; Herrera-Cabrera *et al.*, 2014).



8.4. Existen respuestas diferenciales en los patrones de expresión de las vías de abscisión dependiente y semi-independiente de etileno en la abscisión de ovario no fertilizado de *V. planifolia*, entre tejidos

En el año 2016, las Zu de ambos genotipos y del Ov del genotipo CH I se agruparon juntas, mientras que el Ov del genotipo CH VI tuvo un comportamiento contrastante (dendograma superior de la **Figs. 18.A y 19** -lado izquierdo, en dos cuadrantes opuestos: 2° y 3° respectivamente). Estas agrupaciones señalan una diferencia de patrones entre genotipos (para ovario). Es decir, existe una diferencia de la expresión de vías en el genotipo CH VI entre tejidos; la vía de etileno endógeno está sobre-regulada en la Zu, mientras que en el Ov de este genotipo, se expresaron mayormente las vías de etileno exógeno y la semi-independiente de etileno. Para el genotipo CH I, no hubo esta diferencia de regulación, donde para ambos tejidos la vía mayormente expresada fue la de etileno endógeno.

Para el año 2017 (año con mayor caída del fruto), los tejidos se comportan de parecido en ambos genotipos: los Ov de ambos genotipos se comportaron de manera similar entre sí, al igual que las Zu de ambos genotipos. Así mismo, los Ov de ambos genotipos se comportan de manera opuesta a las Zu de ambos genotipos (**Figs. 18.B**, dendograma superior y **19** -se visualizan en dos cuadrantes opuestos: 1° y 4°, respectivamente). Este patrón indica un comportamiento diferente entre tejidos y no entre genotipos. Para este año el comportamiento de ambos genotipos fue parecido al del genotipo CH VI (susceptible a abscisión) del año 2016; es decir, la ruta del etileno exógeno y la semi-independiente de etileno están sobre-reguladas en el Ov en ambos genotipos, mientras que la vía de etileno endógeno en la Zu de ambos genotipos.

En otras palabras, la expresión diferencial entre tejidos fue más evidente durante el año con condiciones “atípicas” (2017), esto sugiere que la señalización entre tejidos, mediada por la vía de etileno endógeno, está sobre-regulada en condiciones con posible alta concentración de etileno exógeno.



En este año ambos genotipos se comportan como el genotipo CH VI (susceptible a caída) en años con condiciones “típicas” (2016). El comportamiento génico de expresión contrastante entre ambos tejidos (año 2017), puede interpretarse como que para ese año, la señal de abscisión mediada por la vía de etileno exógeno-, estaba presente en ambos genotipos, pero fue el genotipo CH VI el que presentó mayor caída (probablemente por presentar mayor sensibilidad a etileno).

De manera general, se ha observado que el fruto, percibe la maduración e inicia la transducción de la señal de abscisión que se dirige del fruto hacia la planta pasa primero por la ZA, activando la separación (Giovannoni, 2004). Esto provoca una diferencia en la expresión de los genes relacionados y la subsecuente concentración y acción de las hormonas entre tejidos y órganos.

Consistente con lo anterior, los resultados obtenidos en el presente estudio para el año 2016, muestran que los genes de respuesta a etileno endógeno están más activos en la Zu, que como ya se mencionó antes, en *V. planifolia*, dependiendo del genotipo y condición actúa como ZA o como región de reforzamiento, siendo este tejido importante para la señalización génica y hormonal.

Además se ha observado que en *V. planifolia*, cuando ocurre la abscisión del ovario sin fertilizar, sólo ese se separa de la planta, aún cuando un mismo raquis sostiene varios frutos (observación en campo), lo que indica que sólo ocurre la señalización desde el ovario a escindir, hacia la planta hasta la Zu y no de manera inversa.

En algunas especies, se ha observado que la ZA presenta mayor expresión de genes relacionados con etileno. Por ejemplo, Parra (2017), en el análisis del transcriptoma de la ZA y en el fruto de olivo (*Olea europaea*), encontró que los patrones de expresión de genes relacionados con etileno difieren durante la activación de la ZA del fruto del olivo. Se registró una alta expresión de *ACO1*, *ETR1*, *EIN3/EIL* y de miembros de la familia *AP2/ERF* en la ZA respecto al fruto. Así mismo, *OeACO2* y *OeACS2* mostraron una fuerte asociación con la acumulación de Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico durante abscisión, estos genes se encuentran relacionados con la abscisión del fruto maduro del olivo.



Se han reportado resultados similares entre tejidos, para *ACO1* en litchi (*Litchi chinensis*) (Li *et al.*, 2015) y en jitomate (Kim *et al.*, 2016). Los resultados de la expresión relativa de *VpACO1* del genotipo CH VI para el año 2016, coinciden con la bibliografía: la expresión de este gen es mayor en la Zu respecto al Ov correspondiente (**Fig. 17 y 18.A.**).

Referente a la expresión del gen *XTH3*, Iwai y col. (2013) propusieron un modelo de reforzamiento ante la abscisión en tomate (*Solanum lycopersicum*), parecido a lo observado en *V. planifolia*. Estos autores describen que después de que la polinización desencadena el desarrollo del fruto de tomate, la ZA en el pedicelo fortalece su adhesión para mantenerlo unido. Las flores no polinizadas se desprenden mediante sus ZA respectivas, acompañado por la acumulación de xiloglucano y arabinano en la ZA, mientras que se observa una ampliación del mismo tejido en las flores polinizadas.

En estas últimas, una vez que el fruto se ha desarrollado y está completamente maduro, se produce un desprendimiento en la ZA, lo que indica una aceleración de la abscisión. Durante la abscisión del fruto, a diferencia de la abscisión floral, no se observó depósito de polisacáridos específicos de pared celular de la ZA; sin embargo, se observaron evidencias de una síntesis secundaria de la pared celular y lignificación de la ZA antes de la abscisión del fruto (Iwai *et al.*, 2013; Tsuchiya *et al.*, 2015) (**Fig. 20**).

Es decir, los resultados de estos autores sugieren que la abscisión floral o permanencia de la flor en tomate, está determinada por el éxito de la polinización y es fundamentalmente diferente de la que sigue a la maduración del fruto. En la abscisión floral, en la que la eliminación del órgano es el objetivo, la alteración de las paredes celulares de la ZA puede ser la forma más rápida y organizada para que la planta reconozca y arroje la flor no deseada, y se produce mediante una remodelación que implica el depósito de polisacáridos de la pared celular en la ZA. Por otro lado, la abscisión del fruto se produce a través de la deposición de lignina en la ZA (Iwai *et al.*, 2013).



En un estudio posterior, mediante inmunolocalización, se visualizaron los cambios de distribución de enzimas relacionadas con el metabolismo de xiloglucano, incluida la XTH. Durante la abscisión floral (flores sin polinizar), se observó un aumento gradual, llegando a su máximo en un día después de la antesis (1 DDA); en este tiempo la diferencia de acumulación de la proteína XTH en la ZA, fue muy evidente en comparación con las flores polinizadas. Después de 1 DDA, la presencia de XTH disminuyó notablemente a tal grado que no se detectó en la última etapa de abscisión, este resultado puede indicar que la proteína XTH se degrada en el periodo relativamente corto (Tsuchiya *et al.*, 2015).

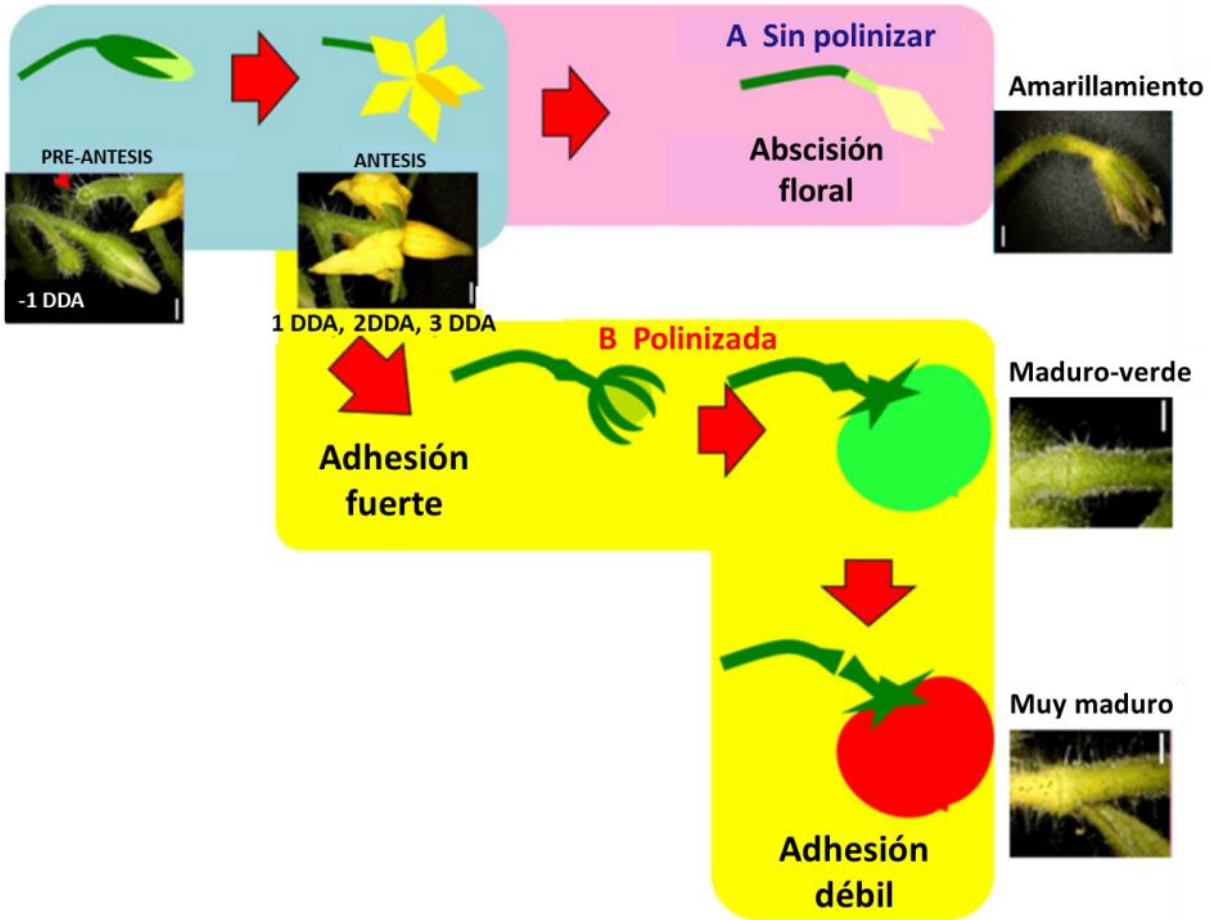


Figura 20. Diagrama esquemático de la regulación de la adhesión de la flor y el fruto en las ZAs de tomate

A. La polinización fallida de flores, conduce a la separación de la ZA. B. Una vez que las flores son polinizadas y los frutos comienzan a desarrollarse con éxito, la ZA se extiende y la adhesión se hace más fuerte hasta que los frutos maduran por completo.

DDA: Días Después de la Antesis. Barras= 1mm (Iwai *et al.*, 2013; Tsuchiya *et al.*, 2015).



Esta baja presencia de XTH en la ZA de flor de jitomate en etapas tardías de abscisión, coincide con los resultados de ER de *VpXTH3* en el presente estudio en la Zu y Ov del genotipo CH VI, y el Ov de CH I, para el año 2016 (Figs. 17 y 18). Esto sugiere que el genotipo CH VI tiene un comportamiento parecido al encontrado en flor no polinizada de jitomate.

La alta ER de *VpXTH3* en la Zu del CH I en el año 2016, parece estar relacionada a la actividad de este gen en la remodelación de la pared celular ya que se ha observado que un nivel alto de *XTH3* en los procesos que requieren dicha remodelación, incluido el crecimiento del fruto, interviniendo en la reorganización de los xiloglucanos (los xiloglucanos unidos a la celulosa, proporcionan resistencia a las paredes celulares durante el crecimiento) (Tsuchiya *et al.*, 2015).

Lo discutido para el gen *VpXTH3*, redunda en la idea de la abscisión de la flor u ovario sin fertilizar, más que la abscisión prematura del fruto (Hernández-Miranda *et al.*, 2018) y como se sugirió para tomate (Iwai *et al.*, 2013), en *V. planifolia* puede presentar un proceso similar pero no idéntico entre tipos de separación de tejidos (de flor o de fruto).

Contrario a lo observado en *V. planifolia* (genotipo CH I), en el modelo de abscisión de fruto del tomate, se observó la eliminación del fruto maduro por lignificación, involucrando una ZA más resistente y estructuralmente diferente a los tejidos circundantes, obligando al órgano a desprenderse del cuerpo de la planta (Iwai *et al.*, 2013).

Sin embargo, los autores proponen que en una etapa del desarrollo del fruto, la lignificación de la ZA evita el desprendimiento prematuro del fruto. Ellos comentan que, debido a que el tomate es fruto climatérico, la producción de etileno aumenta durante la maduración, y las alteraciones de los polisacáridos de la pared celular pueden inducir la actividad de enzimas degradadoras de pared celular dependientes del etileno. La lignificación de la ZA sería una estrategia para evitar el desprendimiento del fruto inmaduro durante la remodelación de los polisacáridos de la pared celular derivada de la producción de etileno (Iwai *et al.*, 2013).



La lignificación de la ZA en *V. planifolia* puede evitar el desprendimiento del fruto inmaduro durante la remodelación de los polisacáridos de la pared celular durante la resupinación y la maduración del fruto (tal vez relacionada con la alta expresión del gen con funciones de remodelación de pared celular: *VpXTH3*, en CH I), derivada de la señalización por etileno.

Por otro lado, en el genotipo CH I (año 2016), la actividad de los genes de respuesta a etileno puede deberse a un proceso diferente a la abscisión, debido a que esta fitohormona tiene diversas funciones durante el desarrollo de la planta. Por ejemplo, se ha reportado que desempeña un papel esencial en la regulación de la fertilización en las plantas, contribuye a la regulación del desarrollo de ovarios y óvulos y a la coordinación del desarrollo de gametofitos femeninos y masculinos (Zhang & O'Neill, 1993; Tsai Li *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016b).

Así, durante la polinización y la fertilización se observan dos picos de etileno en varias especies de plantas, una después de la polinización y la segunda después de la fertilización del óvulo, lo que indica un papel prominente para el etileno en estos eventos (O'Neill, 1997). A través del análisis de expresión en genes *ACO* en guisantes (*Pisum sativum*), se encontró que ante estrés por calor, la modulación de los niveles de etileno en los ovarios de esta especie, podría funcionar como parte de un mecanismo para reasignar recursos a los óvulos fertilizados, dando preferencia al desarrollo y maduración de semillas (Savada *et al.*, 2017).

Los patrones de expresión génica de biosíntesis y señalización de etileno en diversos órganos florales respaldan el papel del etileno en el proceso de fertilización. Se ha reportado un aumento de la expresión tejido-específica de genes *ACS* y *ACO* en los carpelos durante los eventos de polinización y fertilización en tomate (*Solanum lycopersicon*) (Llop-Tous *et al.*, 2000) y en petunia (*Petunia híbrida*) (Tang & Woodson, 1996), así como la regulación del desarrollo de la expresión génica de receptores de etileno en ovarios de tomate (*Lycopersicon esculentum* = *Solanum lycopersicum*) después de la antesis (Lashbrook *et al.* 1998).



En el género *Phalaenopsis* de la familia Orchidaceae, se ha estudiado la expresión de algunos genes relacionados con el etileno en ovario: *PaIAA30L1* (*INDOLE-3-ACETIC ACID inducible 30-like 1*); *PaEIN3L1* (*ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 1*) (Chen *et al.*, 2016a), y *ACC sintasa* y *ACC oxidasa* (O'Neill *et al.*, 2017). Estos genes aumentan su expresión en tejidos de ovario cuando se produce la fecundación y los embriones comienzan a desarrollarse (principalmente *PaEIN3L1*).

La expresión de *PaEIN3L1* aumenta en el día 70-80 ddp, cuando se produce la fecundación y se inicia la embriogénesis (Chen *et al.*, 2016a). En el caso de *V. planifolia*, la fertilización ocurre entre los 45 y 55 ddp, días en los que ocurre mayor abscisión. Los datos analizados en el presente estudio fueron obtenidos a partir de muestras colectadas a los 45 ddp y se observa que el patrón de ER presentado en el año 2017, coincide con los resultados de Chen y col. (2016a) en ovario, por lo que se ha propuesto que ocurre una abscisión de flor u ovario no fertilizado en lugar de la abscisión de fruto. Esto concuerda con lo encontrado en el ovario de *V. planifolia* por Hernández-Miranda y col. (2018).

8.5. Modelo propuesto de expresión de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no polinizado de *Vanilla planifolia*

En la **Figura 21** se muestra el modelo propuesto de expresión de los genes estudiados. Los genes analizados en el presente proyecto de investigación se representan con líneas sólidas (○, □) mientras que los genes utilizados para completar las vías de señalización y biosíntesis, encontrados en la bibliografía, se muestran con líneas punteadas (○, □). Según su nivel de ER, los genes se representan en óvalos azul oscuro para alta expresión (○); en rectángulos azul claro para baja expresión (□) y en óvalos azul oscuro, letras azul claro para expresión media-alta. Zu: Zona de unión raquis-ovario/fruto; Ov: Ovario adyacente a la Zu.



En el año 2016, se observa una diferencia en los perfiles de expresión de los tejidos para el genotipo CH VI (diferentes vías activas en Ov y Zu), pero no para el genotipo CH I (las mismas vías activas en ambos tejidos). El Ov del genotipo CH I y la Zu de ambos genotipos comparten un patrón de expresión (**Fig. 21.A**), en el cual los genes de la vía semi-independiente de etileno (*VpFYF* y *VpHSL2*) presentaron baja ER.

De la vía dependiente de etileno, el receptor *VpERS1*, de respuesta negativa a etileno mostró una alta ER, sugiriendo bajas concentraciones de etileno exógeno. La activación este gen limita la vía de respuesta de transducción de señales de respuesta a etileno mediante la inducción del gen *CTR1*, que a su vez es regulador negativo de *EIN2*. *EIN2* está asociado a la membrana del retículo endoplásmico (RE) y al no ser reprimido por *CTR1*, se trasloca al núcleo para activar factores de transcripción de genes de respuesta a etileno. Tanto la alta ER de *VpERS1*, como la baja ER de *VpEIN3* y *VpERF* (factores de transcripción de respuesta a la señalización por etileno exógeno), indican una represión de la vía de etileno exógeno en estos tejidos. Mientras que la alta ER de *VpACO1* (enzima catalizadora de la última reacción en la biosíntesis de etileno) y la baja ER de *VAS1* (regulador negativo de la biosíntesis de etileno), señala que la vía de etileno endógeno está sobre regulada.

En este mismo año (2016), el Ov del genotipo CH VI presentó el patrón de expresión opuesto a los otros tejidos (**Fig. 21.B**): expresión media-alta para la vía semi-independiente de etileno y para la vía de señalización por etileno exógeno y baja para la ruta de etileno endógeno. Contrario a lo que sucede en los tejidos de la **Fig. 21.A**, la baja expresión de *VpERS1* sugiere altas concentraciones de etileno exógeno, lo que reprime a este gen y a su vez a *CTR1*, así *EIN2* queda libre y puede traslocarse al núcleo activando factores de transcripción de respuesta a etileno, tales como *VpEIN3* que presenta ER media-alta. *VpERF* no se expresó, posiblemente porque en su lugar actúan otros factores de transcripción con redundancia de función (genes de la familia *AP2/RAP*, *EDF*).

Año 2016, menor abscisión

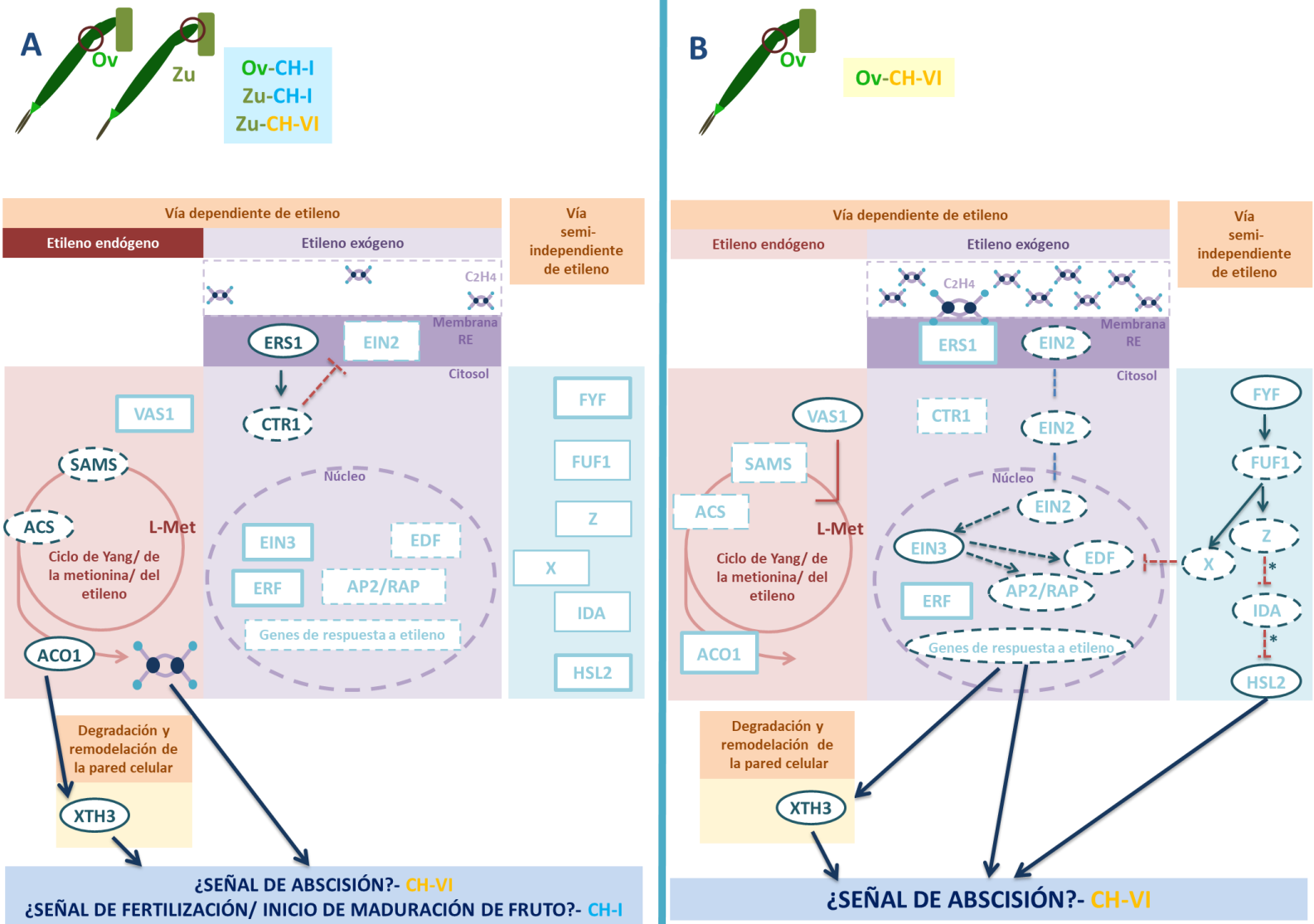
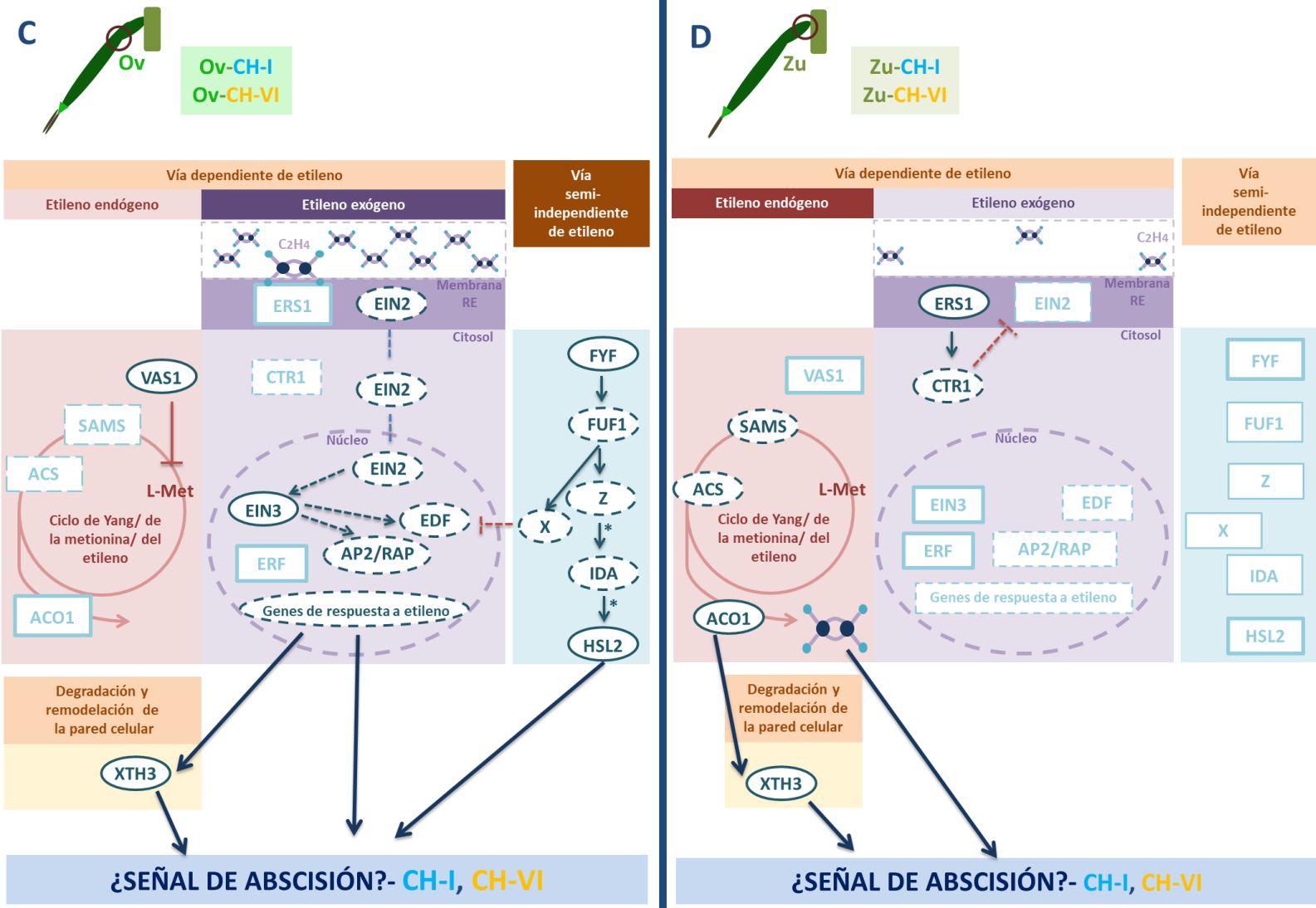


Figura 21.A. y B. Modelo propuesto de expresión de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no polinizado de *Vanilla planifolia*



Año 2017, mayor abscisión



79



Figura 21.cont. C. y D. Modelo propuesto de expresión de los genes relacionados con el proceso de abscisión del ovario no polinizado de *Vanilla planifolia*





Para el año 2017, la expresión entre tejidos en ambos genotipos es muy similar a lo observado para el genotipo CH VI (susceptible a la abscisión) en el 2016. La vía activa en la Zu de ambos genotipos fue la de etileno endógeno; mientras que en los Ov de ambos genotipos, fueron las vías de etileno exógeno y la semi-independiente de etileno.

Debido a que el etileno participa en diversos procesos durante el desarrollo de la planta, estos perfiles de expresión sugieren que en el año 2016, en el genotipo CH I, el etileno endógeno participa en la señalización de la fertilización e inicio de maduración del fruto, mientras que para CH VI, los perfiles de expresión de las vías sugieren una señal de activación de la abscisión. Como en el año 2017, los patrones de expresión son similares al genotipo CH VI, susceptible a la abscisión, se sugiere que en este año, la señal de abscisión está presente en ambos genotipos, pero debido a la mayor sensibilidad a etileno del genotipo CH VI, ocurrió mayor cantidad de abscisión en este genotipo.

Estos resultados respaldan la idea de una abscisión de ovario no fertilizado y no la abscisión de fruto en *V. planifolia*.

9. CONCLUSIONES

En el año 2016 (con menor caída), se observa una diferencia en los perfiles de expresión de los genes en los tejidos para el genotipo CH VI (diferentes vías activas en Ov y Zu), pero no para el genotipo CH I (las mismas vías activas en ambos tejidos). En el Ov del genotipo CH I y la Zu de ambos genotipos la vía de etileno endógeno esta activa, mientras que en el Ov del genotipo CH VI están activas las vías del etileno exógeno y la semi-independiente de etileno.

Para el año 2017, la expresión de genes entre tejidos en ambos genotipos es muy similar a lo observado para el genotipo CH VI (susceptible a la abscisión) en el 2016. La vía activa en la Zu de ambos genotipos fue la de etileno endógeno, mientras que en los Ov de ambos genotipos, fueron las vías de etileno exógeno y la semi-independiente de etileno las que estaban activas.



Las condiciones meteorológicas diferentes entre años más importantes fueron la precipitación máxima y total, la evaporación total y los días de máxima temperatura. Estos cambios de condiciones pudieron modificar los perfiles de expresión de los genes estudiados.

Existe una diferencia de sensibilidad a etileno entre genotipos de *V. planifolia*, reflejada en la ER de los genes de respuesta a etileno del año 2016, derivada del proceso de selección, donde el genotipo CH VI es el más seleccionado (por su contenido de vainillina, con alta importancia comercial) y muestra mayor sensibilidad a etileno.

Debido a que el etileno participa en diversos procesos durante el desarrollo de la planta, estos perfiles de expresión sugieren que en el año 2016, en el genotipo CH I, el etileno endógeno participa en la señalización de la fertilización e inicio de maduración del fruto, mientras que para CH VI, los perfiles de expresión de las vías sugieren una señal de activación de la abscisión. Como en el año 2017, los patrones de expresión son similares al genotipo CH VI -susceptible a la abscisión- en 2016, se sugiere que en 2017, la señal de abscisión está presente en ambos genotipos, pero debido a la mayor sensibilidad a etileno del genotipo CH VI, ocurrió mayor cantidad de abscisión en este genotipo. Los perfiles génicos respaldan la idea de una abscisión de ovario no fertilizado y no la abscisión de fruto en *V. planifolia*.

Se presenta un modelo de los patrones de expresión de los genes relacionados con la abscisión de ovario no fertilizado de *V. planifolia*. Los resultados obtenidos muestran un proceso de regulación más complejo de los genes sensibles a etileno en esta orquídea a varios niveles, ya que la señalización por esta hormona afecta a una variedad de procesos y en varias etapas de las plantas (fertilización, formación de óvulos, maduración de los frutos, abscisión y respuestas a estrés). Debido a que la percepción de etileno funciona como un integrador de diversas señales, se sugiere que debe haber otras redes génicas basales río arriba, encargadas de la abscisión del ovario no fertilizado en *V. planifolia*.



PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

Un mayor conocimiento acerca de los mecanismos que conducen a la abscisión de ovario sin fertilizar, puede contribuir a la regulación de la producción de *V. planifolia* y a mejorar las prácticas culturales actuales.

La investigación molecular de la red de genes que participan en el proceso de abscisión de ovario sin fertilizar de *V. planifolia* podría ayudar a encontrar nuevos marcadores moleculares para su mejoramiento genético.

Se sugiere el estudio de otras redes génicas, tanto en la Zu como a lo largo del ovario y en diferentes etapas de su desarrollo, tales como:

Basales río arriba de la vía del etileno, como los MADs-box y KNOX-Box (*AGL15*, *BOP2*, *EDF1*, *ERV*, *KNAT2*, *NEV*, entre otros).

Otros genes de la vía dependiente de etileno (*EIN2*, *EBF1* y *EBF2*) y de la vía semi-independiente de la señalización por etileno (*FUF1*; *IDL (IDA-LIKE)*).

Genes de biosíntesis y metabolismo de los ácidos fenólicos, debido a que son precursores comunes a vainillina y lignina y podrían aportar evidencia del papel de la lignina en la caída en *V. planifolia* y la diferencia de la formación del tejido de Zu entre tejidos, probablemente debido a que el genotipo CH VI utilice estos precursores para la formación de vainillina en lugar de para la formación de lignina.

El estudio histológico de los tejidos en las diferentes condiciones ayudarán a corroborar si se trata de abscisión de ovario no fertilizado en lugar de fruto inmaduro.

Durante el análisis del transcriptoma de la Zu de los genotipos CH I y CH VI de *V. planifolia* se observó (*in silico*) la presencia de SNPs por lo que se sugieren estudios de polimorfismos genéticos para estos genes y relacionarlos con la regulación de su expresión en el proceso de abscisión del ovario no fertilizado en esta especie.



LITERATURA CITADA

- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L. & Marion-Poll, A. (2013). *ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination*. *Front Plant Sci* 4, 63.
- Aizat, W.M., Able J.A., Stangoulis J.C.R. & Able A. (2013). *Characterisation of ethylene pathway components in non-climacteric capsicum*. *BMC Plant Biology* 13:191.
- 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.
- 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.
- Balaguera-López, H.E., Salamanca-Gutiérrez F.A., García J.C. & Herrera-Arévalo A. (2014). *Etileno y retardantes de la maduración en la poscosecha de productos agrícolas. Una revisión*. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas* 8(2): 302-313.
- Baltazar, N. P. (2010). *Caracteres morfológicos de Vainilla (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.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J. & Wheeler D.L. (2008). *GenBank*. *Nucleic Acids Research* 36:25-30.
- Butenko, M.A., Stenvik G.E., Alm V., Sæther B., Patterson S.E. & Aalen R.B. (2006). *Ethylene-dependent and -independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter: reporter gene constructs in the ida abscission mutant*. *Journal of Experimental Botany* 57(14):3627–3637.
- Cai, S & Lashbrook C.C. (2008). *Stamen Abscission Zone Transcriptome Profiling Reveals New Candidates for Abscission Control: Enhanced Retention of Floral Organs in Transgenic Plants Overexpressing Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN2*. *Plant Physiology* 146: 1305–1321.
- 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 Doctoral. Instituto de Ecología. A.C. Xalapa, Veracruz, México. 93 p.
- Chang, Y.C.A., Lin W.L, Hou J.Y., Yen W.Y, & Lee N. (2013). *Concentration of 1-methylcyclopropene and the duration of its application affect anti-ethylene protection in Phalaenopsis*. *Sci Hortic* 153: 117–123.
- Chen, W.H., Li P.F., Chen M.K., Lee Y.I & Yang C.H. (2015). *FOREVER YOUNG FLOWER Negatively Regulates Ethylene Response DNA-binding Factors (EDFs), by Activating An Ethylene-Responsive Factor (ERF), to Control Arabidopsis Floral Organ Senescence and Abscission*. *Plant Physiology* 168:1666–1683.
- Chen, J.C., Wei M.J. & Fang S.C. (2016a). *Expression analysis of fertilization/early embryogenesis-associated genes in Phalaenopsis orchids*. *Plant Signaling & Behavior*. 11:10, e1237331, DOI: 10.1080/15592324.2016.1237331.
- Chen, J.C. & Fang S.C. (2016b). *The long pollen tube journey and in vitro pollen germination of Phalaenopsis orchids*. *Plant Reproduction* 29: 179-188.
- Chen, W.H., Lee Y.I. & Yang C.H. (2018). *Ectopic Expression of Two FOREVER YOUNG FLOWER Orthologues from Cattleya Orchid Suppresses Ethylene Signaling and DELLA Results in Delayed Flower Senescence/Abscission and Reduced Flower Organ Elongation in Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter* 36:710–724.
- Cho, S.K., Larue C.T., Chevalier D., Wang H., Jinn T.L., Zhang S. & Walker J.C. (2008). *Regulation of floral organ abscission in Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:15629-15634.
- Cho Y.H & Yoo S.D. (2015). *Novel connections and gaps in ethylene signaling from the ER membrane to the nucleus*. *Front. Plant Sci*. 5 (733):1-7- doi: 10.3389/fpls.2014.00733
- Corbacho, S.J. (2015). *Análisis transcriptómico del proceso de abscisión del fruto maduro en Cucumis melo L*. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Universidad de Extremadura. España. 265 p.
- Correll, D. S. (1953). *Vanilla: It's Botany, History, Cultivation and Economic Import*. *Economic Botany* 07:291-358.
- Costa, F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchin M., Dallavia J., Koller B. & Sansavini S. (2005). *Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (Malus domestica Borkh)*. *Euphytica* 141: 181–190.
- Delgado-Alvarado, A., Salazar-Rojas V.V. & Herrera-Cabrera B.E. (2014). *Polimorfismo químico de componentes del aroma en germoplasma de Vanilla spp del a región del Totonacapan Puebla-Veracruz, México*. En: Araya, F.C., Cordero S.R., Paniagua V.A. & Azofeifa B.J.B. (Eds.). *I Seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica*.
- Derveaux, S., Vandesompele J., & Hellemans J. (2010). *How to do successful gene expression analysis using real-time PCR*. *Methods* 50:227–230.



Díaz, V.R.E. (2007). *Farmacología de Terpenoides de Helianthus annuus L.* An. R. Acad. Nac. Farm. 73: 725-746.

Dressler, R.L. (1981). *The Orchids. Natural History and Classification.* Harvard University Press. 332 p.

Dubois, M., Van den Broeck L. & Inzé D. (2018). *The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth.* Trends in Plant Science 23 (4): 311-323.

Eccher, G., Begheldo M., Boschetti A., Ruperti B. & Botton A. (2015). *Roles of Ethylene Production and Ethylene Receptor Expression in Regulating Apple Fruitlet Abscission.* Plant Physiology 169:125–137.

Fock-Bastide, I; Palama T.L., Bory S., Lécolier A., Noirot M. & Joët T. (2014). *Expression profiles of key phenylpropanoid genes during Vanilla planifolia pod development reveal a positive correlation between PAL gene expression and vanillin biosynthesis.* Plant Physiology and Biochemistry 74:304-314.

Gallasch, P.T. (1996). *Evaluating new selections of late hanging navel orange.* Proc. Int. Soc. Citriculture 1:193-197.

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.

Giovannoni, J.J. (2004). *Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening.* The Plant Cell 16: S170–S180, Supplement.

Granados H. C.V. (2016). *Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de abscisión del fruto de Vanilla planifolia G. Jack (Orchidaceae).* Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 70 p.

Gross, B.L & Olsen K.M. (2010). *Genetic perspectives on crop domestication.* Trends in Plant Science 15:529-537.

Hall, A.E., Findell J. L., Schaller E., Sisler E.C. & Bleecker A.B. (2000). *Ethylene Perception by the ERS1 Protein in Arabidopsis.* Plant Physiology 123:1449-1457.

Hernández-Hernández, J. (2011). *Mexican Vanilla Production.* En: Havkin-Frenkel, D. & Belanger F.C. (Eds.). *Hankbook of Vanilla Science and Technology.* Ed. Blackwell Publishing Ltd.

Hernández, H. J. (2014). *Beneficiado artesanal de vainilla en México.* En: Araya, F.C., Cordero S.R., Paniagua V.A. & Azofeifa B.J.B. (Eds.). *I Seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica.*

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.



Hernández-Miranda, O.A., Cruz-Ruiz Y., Campos J.E., Herrera-Cabrera B.E., & Salazar-Rojas V. M. (2018). *Expresión diferencial del gen ARF8 involucrado en el Metabolismo de Auxinas durante la transición de flor a fruto en Vanilla planifolia Jacks. Ex Andrews. Agroproductividad 11(3): 15-21.*

Herrera-Cabrera, B.E., Díaz-Bautista M., Salazar-Rojas V.M., Delgado-Alvarado A. (2014). *Variabilidad genética en vainilla (Vanilla planifolia Andrews) de México.* En: Araya, F.C., Cordero S.R., Paniagua V.A. & Azofeifa B.J.B (Eds.). *I Seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica.*

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.

Huang, W.F., Huang P.L. & Do Y.Y. (2016). *Characterization of promoter activity of the ethylene receptor gene OgERS1 from Oncidesa in transgenic Arabidopsis.* *Biologia Plantarum 60 (2): 261-268.*

Huda, M.K. & Wilcock. (2012). *Rapid floral senescence following male function and breeding systems of some tropical orchids.* *Plant Biology 14:278–284.*

Invernón, V.R., De la Estrella G. M., López N.E., Arnelas S.I. & Devesa A.J.A. (2012). *Botánica. El fruto.* Reduca. *Serie Botánica 5(2):1-14.*

Iwai, H., Terao A. & Satoh S. (2013). *Changes in distribution of cell wall polysaccharides in floral fruit abscission zones during fruit development in tomato (Solanum lycopersicum).* *J Plant Res. 126:427–437.*

Jiménez, S.J.C., Moreno F. L.P. & Magnistskiy S. (2012). *Respuesta de las plantas a estrés por inundación. Una revisión.* *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas 6(1):96-109.*

Jin, X., Zimmermann J., Polle A. & Fischer U. (2015). *Auxin is a long-range signal that acts independently of ethylene signaling on leaf abscission in Populus.* *Frontiers in Plant Science 6(634):634.*

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.*

Kim, J.; Lee, J.; Kwon, T.; Lee, S.; Kim, J.; Lee, G.; Park, G.; Jeong, M. (2016). *Sound waves delay tomato fruit ripening by negatively regulating ethylene biosynthesis and signaling genes.* *Postharvest Biology and Technology 110: 43–50.*

Kohler, H. A. (1890). *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.



Kühn, N., Abello C., Godoy F., Delrot S. & Arce-Johnson P. (2014). *Differential Behavior within a Grapevine Cluster: Decreased Ethylene-Related Gene Expression Dependent on Auxin Transport Is Correlated with Low Abscission of First Developed Berries*. PLoS ONE 9(11): e111258. doi:10.1371/journal.pone.0111258.

Lapeyre-Montes, F., Conéjéro G. Verdeil J.L. & Odoux E. (2010). *Anatomy and Biochemistry of Vanilla Bean Development (Vanilla planifolia G. Jackson)*. En: Odoux E. & Grisoni M. (Eds.). *Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. CRC Press:149-172.

Lashbrook, C.C., Tieman D.M. & Klee H.J. (1998). *Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development*. Plant J 15:243–252.

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, C., Wang Y., Huang X., Li J., Wang H. & Li. (2015). *An improved fruit transcriptome and the identification of the candidate genes involved in fruit abscission induced by carbohydrate stress in litchi*. Front. Plant Sci. 6:439. doi: 10.3389/fpls.2015.00439

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

Liu, X., Shiomi S., Nakatsuka A., Kubo Y., Nakamura R. & Inaba A. (1999). *Characterization of Ethylene Biosynthesis Associated with Ripening in Banana Fruit*. Plant Physiology 121(4):1257-1265.

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. doi: 10.1186/1471-2229-10-60.

Liu, J., Zhang Z., Li H., Lin X., Lin S., Joyce D.C. & He S. (2018). *Alleviation of effects of exogenous ethylene on cut 'Master' carnation flowers with nano-silver and silver thiosulfate*. Postharvest Biology and Technology 143:86–91.

Llop-Tous, I., Barry C.S. & Grierson D. (2000). *Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers*. Plant Physiol 123:971–978.

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.

Mao, L., Begum D., Chuang H.W., Budiman M.A., Szymkowiak E.J. Irish E.E. & Wing R.A. (2000). *JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower AZ development*. Nature 406:910-913.

Meir, S., Philosoph-Hadas S., Riov J., Tucker M.L., Patterson S.E. & Roberts J.A. (2019). *Re-evaluation of the ethylene-dependent and -independent pathways in the regulation of floral and organ abscission*. Journal of Experimental Botany 70(5):1461–1467.

Merchante, C., Vallarino J.G., Osorio S., Aragüez I., Villareal N., Ariza M.T., Martínez G.A., Medina-Escobar N., Civello M.P., Fernie A.R., Botella M.A. & Valpuesta V. (2013). *Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner*. Journal of Experimental Botany 64(14): 4421–4439.



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

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.

Müller, R., Stummann B.M. & Serek M. (2000). *Characterization of an ethylene receptor family with differential expression in rose (Rosa hybrida L.) flowers*. Plant Cell Reports 19(12):1232–1239.

Nagtong, T., Thanonkeo S., Klanrit P. & Thanonkeo P. (2009). *Cloning and Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase Gene from Orchid (Dendrobium Spp.)*. World Applied Sciences Journal 7 (1): 11-18.

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.

NCBI. (2016). [en línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Consulta digital, 2016.

NCBI. *AP2/B3 transcription factor family protein [Arabidopsis thaliana (thale cress)]*. [en línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/839143>. Consulta digital, Octubre 2017.

Niederhuth, C.E., Cho S.K., Seitz K. & Walker J.C. (2013). *Letting Go is Never Easy: Abscission and Receptor-Like Protein Kinases*. Journal of Integrative Plant Biology 55 (12):1251–1263.

Odoux, E. (2010). *Vanilla Curing*. En: Odoux E. & Grisoni M. (Eds.). *Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. CRC Press:173-188.

O'Neill, S.D. (1997). *Pollination regulation of flower development*. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology 48:547–574.

O'Neill, S.D. & Nadeau J.A. (1997). *Postpollination Flower Development*. En: Janick J. (Ed.). *Horticultural Reviews* 19:1-44. ISBN 0-471-16529-8.

O'Neill, D.S, Bui A. Q., Potter D., & Sheng Z. X. (2017). *Pollination of Orchid Flowers: Quantitative and Domain-Specific Analysis of Ethylene Biosynthetic and Hormone-Induced Gene Expression*. International Journal of Plant Sciences. 178(3):188-210.

Olsen, A., Lütken H., Nymark H.J. & Müller R. (2015). *Ethylene resistance in flowering ornamental plants –improvements and future perspectives*. Horticulture Research 2, 15038; doi:10.1038/hortres.2015.38.

Ookawara, R., Satoh S., Yoshioka T. & Ishizawa K. (2005) Expression of α -expansin and xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes associated with shoot elongation enhanced by anoxia, ethylene and carbon dioxide in arrowhead (*Sagittaria pygmaea* Miq.) tubers. Annals of Botany 96:693–702.

Ordóñez, B.J.C. (2016). Anexo 2. Guías Curso Teórico – Práctico de Taxonomía De Orquídeas y Manejo de Colecciones de Orquídeas. Investigación e Innovación Tecnología y Apropiación Social del Conocimiento



Científico de Orquídeas Nativas de Cundinamarca. Bogotá, Colombia. [en línea]. Consulta digital, Agosto, 2018. Disponible en: <http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/32665/2016-Ordonez-Tallerorquideas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

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.

Owczarzy, R., Tataurov A.V., Wu Y., Manthey J.A., McQuisten K.A. Almabrazi H.G. Pedersen K.F., Lin Y., Garretson J., McEntaggart N.O., Sailor C.A., Dawson R.B. & Peek A.S. (2008). *IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers*. Nucleic Acids Research 36: W163–W169. doi:10.1093/nar/gkn198.

Orzáez, D., Blay R. & Granell A. (1999). *Programme of senescence in petals and carpels of Pisum sativum L. flowers and its control by ethylene*. Planta 208:220–226.

Paniagua, C.G.L., Monroy P.E. & Vaca P.S. (2011). *PCR EN TIEMPO REAL para detectar Candida albicans*. UNAM. FESI. Edo. Mex, México. 75 p.

Parra, E.R. (2017). *Modificaciones de la pared celular durante el proceso de abscisión del fruto maduro en Olea europea L*. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura, España. 189 p.

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

Patterson, S.E. & Bleecker A.B. (2004). *Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in Arabidopsis*. Plant Physiology 134:194–203.

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.

Pfaffl, M. (2004). *Quantification strategies in real-time PCR*. En: Bustin S.A (Ed.). A-Z of quantitative PCR. IUL biotechnology series. University Line La Jolla. 882 p.

Phetsirikoon, S., Paull R.E., Chen N., Ketsa S. & Van Doorn W.G. (2016). *Increased hydrolase gene expression and hydrolase activity in the abscission zone involved in chilling-induced abscission of Dendrobium flowers*. Postharvest Biology and Technology 117: 217–229.

Primack, R.B. (1985). *Longevity of Individual Flowers*. Annual Review of Ecology and Systematics 16:15-37.

Ramírez, P.B.R. & Goyes A.R.I. (2004). *Botánica. Generalidades, Morfología y Anatomía de Plantas Superiores*. Ed. Universidad del Cauca. Serie Estudios Aplicados. Popayán, Colombia.

Raven, P.H., Evert R.F. & Euborn S.E. (1992). *Biología de las plantas*. Ed. Reverté. Barcelona, España. 777 p. 195 p.

Reyes, L.D., González A.M.T., Menchaca G.R.A., Cruz P.M.I., Tovar S. A. Kelso B.H.A., Barcenas G.J. & Pérez S.A. (2014). *Rescate, conservación, investigación y utilización de la biodiversidad de la vainilla en México*.



En: Araya, F.C., Cordero S.R., Paniagua V.A. & Azofeifa B.J.B. (Eds.). *I Seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica.*

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*.

Salazar-Rojas, V.M., Herrera-Cabrera, B.E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo- González, F., & Cobos-Peralta M. (2012). *Chemotypical variation in Vanilla planifolia Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59 (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.

Salazar, C., Hernández C. & Pino M.T. (2015). *Plant water stress: Associations between ethylene and abscisic acid response*. *Chilean Journal Of Agricultural Research* 75 (Supl. 1):71-79.

Salazar, R.V.M., Sandoval E.Z., Granados H.C.V., Cruz R.Y., Herrera C.B.E. & Campos C.J.E. (2016). *Descripción estructural y funcional de caída prematura de frutos de Vanilla planifolia Jacks ex Andrews*. *Agroproductividad* 9:17-18.

Saladié, M., Rose J.K., Cosgrove D.J. & Catalá C. (2006). *Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action*. *Plant Journal* 247(2):282-95.

Santamaría, R. (2009). *Análisis Visual de Datos de Expresión Génica mediante Biclustering*. Tesis para obtener el grado de Doctor. Facultad de Ciencias. Universidad de Salamanca, España.

Sauceda, R. & Neryda E. (2011). *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas*. *Ra Ximhai*. 7(1):153-170.

Savada, R.P., Ozga J.A., Jayasinghege C.P.A., Waduthanthri K.D. & Reinecke D.M. (2017). *Heat stress differentially modifies ethylene biosynthesis and signaling in pea floral and fruit tissues*. *Plant Molecular Biology* 95:313–331.

Serrano, G.R. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos*. Colección Ciencias Experimentales. Publicaciones de la Universidad Jaume. Castellón de la Plana, Comunidad Valenciana, España. 193 p.

Sexton, R. & Roberts J.A. (1982). *Cell biology of abscission*. *Annual Reviews of Plant Physiology* 33:133-62.



Shakeel, S., Gao Z., Amir M., Chen Y. F., Rai M.I., Haq N.U. & Schaller E. (2015). *Ethylene Regulates Levels of Ethylene-Receptor/CTR1 Signaling Complexes in Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry 290:12415–12424. doi: 10.1074/jbc.M115.652503

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

Singh, A.P., Tripathi S.K., Nath P. & Sane A.P. (2011). *Petal abscission in rose is associated with the differential expression of two ethylene-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes, RbXTH1, and RbXTH2*. Journal of Experimental Botany 62(14):5091–5103.

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. [en línea]. Consulta digital, Diciembre, 2017. Disponible 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.

Stø, I.M., Orr R.J.S., Fooyontphanich K., Jin X., Knutsen J.M.B., Fischer U., Tranbarger T.J., Nordal I. & Aalen R.B. (2015). *Conservation of the abscission signaling peptide IDA during Angiosperm evolution: withstanding genome duplications and gain and loss of the receptors HAE/HSL2*. Front. Plant Sci. 6:931:1-12.

Suwarso, W.P. & Utama A.E. (2002). *The new variant of the sandmeyer modification reaction by in-situ generated formaldehyde: semi-synthesis of vanillin from guaiacol*. MAKARA, SAINS 6(2):90-98.

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

Tamay de Dios, L., Ibarra C., & Velasquillo C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Medigraphic 2(2):70-78.

Tang, X. & Woodson W.R. (1996). *Temporal and spatial expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers*. Plant Physiol 112:503–511.

Taylor, J.E. & Whitelaw C.A. (2001). *Signals in abscission*. New Phytologist. 151:323–339.

Tieman, D., Ciardi J.A., Taylor M.G, & Klee H.J. (2001). *Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development*. Plant Journal 26(1):47-58.



Tournier, B., Sanchez-Ballesta T., Jones B., Pesquet E., Regad F., Latché A., Pech J.C. & Bouzayen M. (2003). *New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element*. FEBS Letters 550:149-154.

Tranbarger, T.J., Fooyontphanich K., Roongsattham P., Morcillo., Serret J., Dussert S., Collin M., Amblard P., Tangphatsornruang S., Jantasuriyarat C. & Verdeil J.L. (2018). *Conserved and novel mechanisms underlie oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) fruit abscission: A model for studying fruit abscission in the palm family (Arecaceae)*. En: Proceedings Plant and Animal Genome XXVI Conference. PAG. San Diego: PAG, Resumen, 1 p. [en línea]. Consulta digital, Agosto, 2018. Disponible en: [http://agritrop.cirad.fr/586600/1/PAG%202017 Tranbarger%20abstract.pdf](http://agritrop.cirad.fr/586600/1/PAG%202017%20Tranbarger%20abstract.pdf)

Tsai, W.C., Hsiao Y.Y., Pan Z.J., Kouh C.S. Chen W.H. & Chen H.H. (2008). *The role of ethylene in orchid ovule development*. Plant Science 175:98–105.

Tsuchiya, M., Satoh S. & Iwai H. (2015). *Distribution of XTH, expansin, and secondary-wall-related CesA in floral and fruit abscission zones during fruit development in tomato (Solanum lycopersicum)*. Frontiers in Plant Science 6 (Art 323):1:9. doi: 10.3389/fpls.2015.00323.

Tucker, M.L. & Yang R. (2012). *IDA-like gene expression in soybean and tomato leaf abscission and requirement for a diffusible stelar abscission signal*. AoB PLANTS pls035:1-14.

Tucker, M.L. & Kim J. (2015). *Abscission research: what we know and what we still need to study*. Stewart Postharvest Review 2:1-7.

Van Doorn, W.G. (2002). *Effect of Ethylene on Flower Abscission: a Survey*. Annals of Botany 89: 689-693.

Vie A.K., Najafi J., Liu B., Winge P., Butenko M.A., Hornslien K.S., Kumpf R., Aalen R.B., Bones A.M. & Brembu T. (2015). *The IDA/IDA-LIKE and PIP/PIPLIKE gene families in Arabidopsis: phylogenetic relationship, expression patterns and transcriptional effect of the PIPL3 peptide*. Journal of Experimental Botany 66(17):5351–5365.

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

Walton, N.J., Mayer M.J. & Narbad A. (2003). *Vanillin*. Phytochemistry 63(5):505-15.

Wang, F., Cui X., Sun Y. & Dong C.H. (2013). *Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses*. Plant Cell Rep. 32:1099–1109.

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.

Wilmowicz, E., Kućko A., Ostrowski M. & Panek K. (2018). *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION-like is an abscission associated and phytohormone-regulated gene in flower separation of Lupinus luteus*. Plant Growth Regulation 85, 91–100.



Wu, X.M., Yu Y., Han L.B., Li C.L., Wang H.Y., Zhong N.Q., Yao Y. & Xia G.X. (2012). *The Tobacco BLADE-ON-PETIOLE2 Gene Mediates Differentiation of the Corolla Abscission Zone by Controlling Longitudinal Cell Expansion*. *Plant Physiology* 159:835–850.

Xie, Q., Hu Z., Zhu Z., Dong T., Zhao Z., Cui B. & Chen G. (2014). *Overexpression of a novel MADS-box gene SIFYFL delays senescence, fruit ripening and abscission in tomato*. *Nature. Scientific Reports* 4, 4367. DOI: 10.1038/srep04367.

Yang, L., Wen K.S., Ruan X., Zhao Y.X., Wei F. & Wang Q. (2018). *Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors*. *Molecules* 23 (762). doi:10.3390/molecules23040762.

Ying, P., Li C., Liu X., Xia R., Zhao M. & Li J. (2016). *Identification and molecular characterization of an IDA-like gene from litchi, LcIDL1, whose ectopic expression promotes floral organ abscission in Arabidopsis*. *Scientific Reports* 6, 37135.

Yokotani, N., Nakano R., Imanishi S., Nagata M. Inaba A. & Kubo Y. (2009). *Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated*. *Journal of Experimental Botany* 60(12):3433–3442.

Zhang, Z. X. & O'Neill S. D. (1993). *Ovary and Gametophyte Development Are Coordinately Regulated by Auxin and Ethylene following Pollination*. *The Plant Cell*. 5:403-418.

Zhang, G., Chen M., Li L., Xu Z. Chen X., Guo J & Ma Y. (2009). *Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco*. *Journal of Experimental Botany* 60:3781–3796.

Zhang, L., Li Z., Quan R., Li G., Wang R. & Huang R. (2011). *An AP2 domain-containing gene, ESE1, targeted by the ethylene signaling component EIN3 is important for the salt response in Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157:854–865.

Zhang, X., Qi M., Xu T., Lu X. & Li T. (2015). *Proteomics profiling of ethylene-induced tomato flower pedicel abscission*. *Journal of Proteomics* 121: 67-87.

Zhang, Z., Wang N., Jiang S., Xu H., Wang Y., Wang C., Li M., Liu J., Qu C., Liu W., Wu S., Chen X., & Chen X. (2017). *Analysis of the Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Gene Family during Apple Fruit Ripening and Softening*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(2):429-434.

Zheng, Z., Guo Y., Novák O., Dai X., Zhao Y., Ljung K, Noel J.P. & Chory J. (2013) *Coordination of auxin and ethylene biosynthesis by the aminotransferase VAS1*. *Nat Chem Biol.* 9(4): 244–246.

Zhu, Q., Zhang J., Gao X., Tong J., Xiao L. & Zhang H. (2010). *The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses*. *Gene* 457:1–12.

Zhu, Z., An F., Feng Y., Li P., Xue L., A M., Jiang Z., Kim J.M., To T.K., Li W., Zhang X., Yu Q., Dong Z., Chen W.Q., Seki M., Zhou J.M. & Guo H. (2011). *Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:12539–12544.



http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/vanpla_dcgw.xml?_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc.html.xsl&_indent=no

Consulta digital, Octubre 2017

<https://bioinformaticanabi.wordpress.com>

Consulta digital, Octubre 2017

<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3 WWW.CGI>

Consulta digital: Septiembre, 2016.

https://www.cs.us.es/~fran/curso_unia/diferenciales.html

Consulta digital: Junio, 2017.

https://help.xlstat.com/customer/es/portal/articles/2062435-heat-maps-omics-tutorial-en-excel?b_id=9283

Consulta digital: Junio, 2017.

<https://help.xlstat.com/customer/es/portal/articles/2062437-expresi%C3%B3n-diferencial-omics-tutorial-en-excel>

Consulta digital: Junio, 2017.

<https://help.xlstat.com/customer/es/portal/articles/2062222-análisis-de-componentes-principales-en-excel>

Consulta digital: Junio, 2018.

www.idtdna.com/calc/analyzer

Consulta digital: Septiembre, 2016.

<http://orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw/orchidstra2/index.php>

Consulta digital, 2016

<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

Consulta digital, 2016

<http://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica>

Consulta digital, Octubre 2017

<http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Paginas/recursos-fitogeneticos.aspx>

Consulta digital: Noviembre, 2017.





ANEXOS

ANEXO 1. Valores de Expresión Relativa de los genes relacionados con el proceso de abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i>								
Gen	Zu CHI 2016	Ov CHI 2016	Zu CHVI 2016	Ov CHVI 2016	Zu CHI 2017	Ov CHI 2017	Zu CHVI 2017	Ov CHVI 2017
<i>VpERS1</i>	0.3072	0.4833	0.5506	0.3006	0.4539	0.1810	0.3010	0.1795
<i>VpEIN3</i>	0.2574	0.2576	0.4268	0.2138	0.5484	1.0650	0.3266	0.8565
<i>VpERF</i>	0.0141	0.0104	0.0064	0.0022	0	0	0	0
<i>VpACO1</i>	0.3333	0.4782	0.4346	0.1949	0.2446	0.3156	0.0480	0.1923
<i>VpVAS1</i>	0.2410	0.3588	0.5100	0.1380	0.1793	0.6506	0.0525	0.5465
<i>VpFYF</i>	0.1506	0.2334	0.2602	0.1284	0.9279	1.1498	0.6494	1.0751
<i>VpHSL2</i>	0.0101	0.0058	0.0365	0.0369	0.0373	0.1337	0.0453	0.1846
<i>VpXHT3</i>	1.0547	0.4071	0.4342	0.1400	0.1795	0.5091	0.3818	0.6506

Zu: Zona de unión raquis-ovario/fruto; Ov: Ovario adyacente; CHI: Genotipo CH I; CHVI: Genotipo CH VI; 2016: Año 2016; 2017: Año 2017.

ANEXO 2. Secuencias contrastadas con el transcriptoma de <i>V. planifolia</i> para el diseño de primers para el análisis de ER de genes relacionados con el proceso de abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i>			
Gen	Especie de secuencia de referencia	Base de datos	Accesión
<i>VpERS1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NCBI	NM_129658
	<i>Dendrobium hybrid cultivar Khao Sanan</i>	NCBI	FJ628419
	<i>Persea americana</i>	NCBI	AF500121
	<i>Vanilla planifolia</i>	Orchistra 2.0	VPTC023340 y VPTC023341 AUTC011488
	<i>Apostasia wallichii</i>	Orchistra 2.0	
<i>VpEIN3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NCBI	NM_112968
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	--
	<i>Zea mays</i>	Phytozome	--
<i>VpERF</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	--
	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	NCBI	GU593720
	<i>Cymbidium insigne</i>	NCBI	ERF654657
	<i>Dendrobium officinale</i>	NCBI	KJ004762
<i>VpACO1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	--
	<i>Cymbidium hybrid cultivar</i>	NCBI	AB257311
	<i>Petunia x hybrid</i>	NCBI	PETACO1A
	<i>Vanilla planifolia</i>	Orchistra 2.0	VPTC009126 y VPTC009125 AUTC017189
	<i>Apostasia wallichii</i>	Orchistra 2.0	
<i>VpVAS1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	--
	<i>Phalaenopsis aphrodite</i>	NCBI	PATC150586
<i>VpFYF</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NCBI	NM_125610
	<i>Oncidium Gower Ramsey</i>	NCBI	HQ591455
	<i>Vanilla planifolia</i>	Orchistra 2.0	VPT001268
	<i>Cypripedium formosanum</i>	Orchistra 2.0	CFTC011381
<i>VpHSL2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	--
	<i>Triticum aestivum</i>	Phytozome	--
<i>VpXHT3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome	--
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NCBI	NM_113409
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	NCBI	AY497476
	<i>Solanum lycopersicum</i>	NCBI	NM_001247543
<i>VpACT</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	NCBI	KF513175



ANEXO 3. Información meteorológica de los sitios de colecta del material para el análisis de ER de relacionados con el proceso de abscisión de ovario no fertilizado de <i>V. planifolia</i> (SNN, CONAGUA)								
Ameluca, Pantepec, Puebla (CH I)					El Raudal, Nautla, Veracruz (CH VI)			
2016		2017			2016		2017	
Abril								
Temperatura (°C)								
	°C	Día	°C	Día	°C	Día	°C	Día
Máxima en el mes	39	27	43.0	26	35	1	33	27 y 29
Mínima en el mes	16	3 y 5	17.0	30	16.5	3	27	6,7 y 8
Media en el mes	26.03		26.5		25.14		25.1	
σ de temperatura máxima, entre años	2.828427125				1.414213562			
σ de temperatura mínima, entre años	0.707106781				7.424621202			
σ de temperatura media, entre años	0.308769961				0.006259634			
Precipitación (m.m)								
	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día
Maxima en 24 hrs	42	18	38.0	18	26	18	16.5	19
Mínima en 24 hrs	0.5	2 y 14	0.5	17	1	20	1	8
Total en el mes	74		43.5		58		51.00	
σ de precipitación máxima, entre años	2.828427125				6.717514421			
σ de precipitación mínima, entre años	0				0			
σ de precipitación total, entre años	21.56675683				4.949747468			
Evaporación (m.m)								
	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día
Máxima en 24 hrs	7.1	23	4.80	2	5.8	18 y 27	6.8	26
Mínima en 24 hrs	0.2	14	0.85	7	3.7	14	4.5	18
Media en el mes	2.45		3.14		4.55		5.8	
Total en el mes	73.6		94.10		136.5		167.42	
σ de evaporación máxima, entre años	1.626345597				0.678822672			
σ de evaporación mínima, entre años	0.459619408				0.551543303			
σ de evaporación media, entre años	0.485546656				0.864864709			
σ de evaporación total, entre años	14.49568901				21.86374072			



Mayo

Temperatura (°C)								
	°C	Día	°C	Día	°C	Día	°C	Día
Máxima en el mes	39	1	35.0	26	33.5	18 y 31	34.0	26
Mínima en el mes	14	8	16.0	6	18.5	7 y 8	18.0	6
Media en el mes	28.25		27.4		27.83		26.9	
σ de temperatura máxima, entre años	2.828427125				0.353553391			
σ de temperatura mínima, entre años	1.414213562				0.353553391			
σ de temperatura media, entre años	0.632974619				0.666733265			
Precipitación (m.m)								
	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día
Máxima en 24 hrs	14	2	67.5	4	17	2	60	4
Mínima en 24 hrs	0.5	26	0.1	11	2	18	3	14, 27 y 31
Total en el mes	26		227.7		46.2		148.00	
σ de precipitación máxima, entre años	37.83021279				30.40559159			
σ de precipitación mínima, entre años	0.282842712				0.707106781			
σ de precipitación total, entre años	142.6234378				71.98347032			
Evaporación (m.m)								
	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día
Máxima en 24 hrs	6.9	2	7.30	15	6.6	28	6.76	1
Mínima en 24 hrs	0.6	13	0.55	8	4.6	4	3.23	4
Media en el mes	2.39		3.29		5.64		5.6	
Total en el mes	73.9		98.75		174.8		156.51	
σ de evaporación máxima, entre años	0.282842712				0.113137247			
σ de evaporación mínima, entre años	0.035355339				0.968736277			
σ de evaporación media, entre años	0.637574614				0.049741293			
σ de evaporación total, entre años	17.57160351				12.93298287			

Junio

Temperatura (°C)								
	°C	Día	°C	Día	°C	Día	°C	Día
Máxima en el mes	36	14	42.0	30	36	9	33.0	8, 18, 21, 22 y 24
Mínima en el mes	18	30	20.0	22	21	11	22.0	21
Media en el mes	27.05		27.3		27.63		27.7	
σ de temperatura máxima, entre años	4.242640687				2.121320344			
σ de temperatura mínima, entre años	1.414213562				0.707106781			
σ de temperatura media, entre años	0.176776695				0.031819805			



Precipitación (m.m)								
	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día
Máxima en 24 hrs	53	25	63.0	24	38.5	3	72.0	25
Mínima en 24 hrs	0.5	3	0.5	1	2	26	1.0	9
Total en el mes	215		106.6		132.2		176.30	
σ de precipitación máxima, entre años	7.071067812				23.68807717			
σ de precipitación mínima, entre años	0				0.707106781			
σ de precipitación total, entre años	76.65037508				31.18340905			
Evaporación (m.m)								
	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día	m.m	Día
Máxima en 24 hrs	7.3	25	6.10	26	7.5	30	7.49	26
Mínima en 24 hrs	0.8	11	1.25	1	4.1	12	3.01	1
Media en el mes	3.39		3.20		6.18		5.9	
Total en el mes	101.7		95.85		185.3		152.97	
σ de evaporación máxima, entre años	0.848528137				0.00707123			
σ de evaporación mínima, entre años	0.318198052				0.770746398			
σ de evaporación media, entre años	0.137885822				0.209684369			
σ de evaporación total, entre años	4.13657467				22.86076255			