

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL COMPLEJO *ARF8-IAA25-like-TIR1* DURANTE EL SÍNDROME POST-POLINIZACIÓN EN DOS GENOTIPOS DE VAINILLA

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF *ARF8-IAA25-like-TIR1* COMPLEX ON THE POST-POLLINATION SYNDROME OF TWO GENOTYPES OF VANILLA

Olga A. Hernández-Miranda^{1,4}, David A. Reyes-Mateos¹, Jorge E. Campos¹, Estela Sandoval-Zapotitla², Braulio E. Herrera-Cabrera³ y Víctor M. Salazar-Rojas^{1*}

¹Universidad Nacional Autónoma de México, UBIPRO-Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Los Reyes Iztacala, Tlalhepantla, Estado de México, México. ²Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Ciudad de México, México. ³Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, San Pedro Cholula, Puebla, México. ⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Biológicas, Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia (adnbic@gmail.com)

RESUMEN

La transición de flor a fruto (TFF) es un proceso crítico en la reproducción de las angiospermas. Su regulación responde a un mecanismo hormonal que involucra genes de las familias *ARF*, *Aux/IAA* y *TIR1*; sin embargo, aún no se conoce con detalle su funcionamiento en plantas con síndrome post-polinización como las orquídeas. El conocimiento acerca de los procesos moleculares que dirigen la TFF permitirá atender problemáticas como la 'caída prematura de fruto', que afectan al cultivo de vainilla a nivel global. Con el objetivo de describir el proceso de TFF en vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) se analizó, mediante qPCR, el nivel de expresión relativa (ER) de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* durante 45 días después de la polinización (ddp), en un genotipo 'tolerante a caída' (CH-I) y otro 'susceptible' (CH-VI). Se realizó purificación de ARN, síntesis de ADNc y se cuantificó la ER. Los datos de expresión se analizaron mediante ANOVA de dos factores (genotipo y tiempo de desarrollo) y análisis de conglomerados tipo *Heatmap* (genes, genotipo, fase del desarrollo). Se detectaron diferencias significativas en los niveles de ER de los genes *VpARF8* y *VpTIR1* durante los 45ddp, sin variación entre genotipos; mientras que el gen *VpIAA25-like* presentó diferencias únicamente entre genotipos. En el análisis multivariado se distinguieron dos perfiles de expresión que pueden estar relacionados con las etapas de polinización y fecundación en vainilla, mismas que ocurren en momentos distintos debido al síndrome post-polinización. En el genotipo CH-I la fecundación ocurre alrededor de 45ddp, mientras que en el genotipo CH-VI no se observa. Los tres genes presentaron cambios en los niveles de expresión durante el síndrome post-polinización en CH-I, pero no en CH-VI, lo que sugiere que el fenómeno conocido como 'caída prematura de fruto' es un efecto genotipo dependiente, definido por una diferencia en el mecanismo de regulación del metabolismo de auxinas.

Palabras clave: *Vanilla planifolia* Andrews, auxinas, caída de fruto, expresión diferencial, variación intraespecífica.

SUMMARY

The transition from flower to fruit (TFF) is a critical process in the reproduction of angiosperms. Its regulation responds to a hormonal mechanism that involves genes from the *ARF*, *Aux/IAA* and *TIR1* families; however, its functioning in plants with post-pollination syndrome, such as orchids, is not yet known in detail. In this sense, knowledge about the molecular processes that direct the TFF, will allow to address problems such as the 'premature fall of fruit', that affect the cultivation of vanilla worldwide. In order to describe the TFF process in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews),

the relative expression level (RE) of the *VpARF8*, *VpIAA25-like* and *VpTIR1* genes was analyzed by qPCR for 45 days after pollination (dap), in a 'fruit fall-tolerant genotype' (CH-I) and another 'susceptible' (CH-VI). RNA isolation and cDNA synthesis were performed, and the RE was quantified. Expression data were analyzed using two-factor ANOVA (genotype and development time) and Heatmap cluster analysis (genes, genotype, development phase). The results indicated significant differences in the RE levels of the *VpARF8* and *VpTIR1* genes during the 45ddp, without variation between genotypes, while *VpIAA25-like* gene presented differences only between genotypes. In the multivariate analysis, two expression profiles were distinguished confirming that in vanilla, pollination and fertilization occur at different times due to post-pollination syndrome. Particularly, in the CH-I genotype fertilization occurs around 45ddp, while in the CH-VI genotype it is not observed. The expression levels of the three genes show changes during the post-pollination syndrome of *V. planifolia* and suggest that the phenomenon recognized as 'premature fruit drop' is a genotype-dependent effect defined by a difference in the regulation mechanism of the auxin metabolism.

Key words: *Vanilla planifolia* Andrews, auxins, differential expression, fruit fall, intraspecific variation.

INTRODUCCIÓN

La transición de flor a fruto (TFF) es un proceso crítico en la evolución y desarrollo de la mayoría de las angiospermas. Dicha transición está definida bajo un modelo general que considera dos eventos que ocurren de manera simultánea: (1) La polinización, que es el contacto del polen con el estigma de una flor y (2) la fecundación, que es la unión de los gametos para la formación de un embrión (Lord y Russell, 2002). Bajo este supuesto, se considera que la estructura del óvulo y el saco embrionario se han desarrollado completamente cuando los granos de polen germinan en el estigma, de modo que el tubo polínico se alarga y algunas horas después de la polinización ocurre la unión de las células espermáticas con la ovocélula, es decir, la fecundación (Lord y Russell, 2002).

Sin embargo, algunos grupos de los órdenes Fagales y Asparagales presentan una serie de modificaciones, tanto

estructurales como funcionales, en el perianto y el ovario durante la TFF, que se conocen como síndrome post-polinización (SPP) (O'Neill y Nadeau, 1997). La familia Orchidaceae es uno de los grupos más representativos del SPP, en donde en la mayoría de las especies el desarrollo de gametófitos femeninos está ausente o incompleto antes de la polinización. En estos casos, el contacto del polen con el estigma es la señal que activa el mecanismo hormonal que permite el desarrollo de los óvulos de manera sincrónica a la elongación del tubo polínico hasta su fecundación, la cual puede ocurrir entre 20 y 70ddp (Chen y Fang, 2016; O'Neill y Nadeau, 1997). Dicho sistema de fecundación es altamente sensible a cambios ambientales a través de la modificación de las señales hormonales (principalmente de auxinas y etileno), que sincronizan el desarrollo de los óvulos y el crecimiento de los tubos polínicos (Chen y Fang, 2016; O'Neill, 1997). Se sabe que el ácido indolacético (AIA) tiene un papel central en los procesos de polinización, fecundación, inducción y maduración del fruto (Pattison et al., 2014). A través de las fluctuaciones en la concentración de la hormona se regula el encendido y apagado de genes correspondientes a las familias: Factores de Respuesta a Auxinas (ARF), Auxina/Ácido indol-3- acético (*Aux/IAA*), así como las Proteína de Respuesta de Inhibición de Transporte 1 (*TIR1*) (Jayasinghege et al., 2019; Li et al., 2016).

En especies con sistema de fecundación modelo, como *Arabidopsis thaliana* L. Heynh (Brassicaceae), *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae), *Musa acuminata* Colla (Musaceae) y *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae), se ha planteado un modelo para la explicación de la TFF, que describe la relación entre los niveles de expresión de los genes *ARF8*, *IAA25* y *TIR1* y el comportamiento de las proteínas *ARF8*, *IAA25* y *TIR1* durante dos etapas del desarrollo: (1) la pre-polinización y (2) la polinización-fecundación (Calderon-Villalobos et al., 2010; Goetz et al., 2007; Hu et al., 2015; Pomares-Viciana et al., 2017; Wu et al., 2012).

Durante la pre-polinización se describe un ambiente de baja concentración de auxinas en el tejido del ovario, relacionado con la sobre-expresión de los genes *ARF8*, *TIR1* y algunos *Aux/IAA* (Goetz et al., 2007; Pomares-Viciana et al., 2017; Wu et al., 2012); mientras que las proteínas *ARF8* e *IAA25* conforman un heterodímero que impide que *ARF8* participe como factor de transcripción de los genes de respuesta a auxinas (Calderon-Villalobos et al., 2010). Por otra parte, el complejo de ubiquitinación SCFTIR1/AFB, que integra a los receptores nucleares *TIR1/AFB* con las proteínas ASK1, CUL1 y RBX, no está formado (Calderon-Villalobos et al., 2010).

Durante la polinización se describe un aumento en las concentraciones de auxinas en el ovario, lo cual disminuye

los niveles de expresión de *ARF8* y *TIR1*, mientras que la expresión de *IAA25* se incrementa (Goetz et al., 2007; Jayasinghege et al., 2019; Wu et al., 2012). En este momento se forma el complejo de ubiquitinación SCFTIR1/AFB, *TIR1* funciona como receptor de AIA, unión que permite acoplar a la proteína *IAA25* al complejo y romper el heterodímero que formaba con *ARF8*, para que RBX1 coloque las marcas de ubiquitina sobre *IAA25* necesarias para su posterior degradación vía proteasoma 26S (Calderon-Villalobos et al., 2010; Pomares-Viciana et al., 2017; Wu et al., 2012). Durante este proceso, la separación del heterodímero permite que *ARF8* quede libre para participar como factor de transcripción de genes de respuesta a auxinas (Li et al., 2016).

Se ha observado que los niveles de expresión genética de *ARF8*, *IAA25* y *TIR1* están influenciados por diversas fuentes de variación, como el estado de desarrollo y la variación intraespecífica (Hu et al., 2015; Pomares-Viciana et al., 2017). En cuanto al estado de desarrollo, se ha identificado en especies como *M. acuminata*, *S. lycopersicum* y *C. pepo* que los niveles de expresión de los genes *ARF8*, *IAA25* y *TIR1* en tejidos del ovario presentan un patrón de sobreexpresión durante la pre-polinización (Hu et al., 2015; Pomares-Viciana et al., 2017; Wu et al., 2012). Esta sobreexpresión disminuye durante la polinización en *M. acuminata*, *S. Lycopersicum*, *C. pepo* y *Pisum sativum* L. (Fabaceae) (Cui et al., 2014; Goetz et al., 2006; Jayasinghege et al., 2019). Por esta razón, se ha sugerido que el comportamiento a lo largo del tiempo de los genes *ARF8*, *IAA25* y *TIR1* es determinante en el desarrollo y maduración de los óvulos, así como en el mecanismo de formación de los frutos (Calderon-Villalobos et al., 2010; Pomares-Viciana et al., 2017; Wu et al., 2012).

En cuanto al efecto de la variación intraespecífica, se ha demostrado que la expresión del gen *ARF8* puede variar entre individuos de una misma especie, como se describe para *C. pepo*, donde se asocia la sobreexpresión de *ARF8* con variedades no partenocárpicas y la subexpresión con variedades partenocárpicas (Pomares-Viciana et al., 2017). Además, en *M. acuminata* se ha relacionado la subexpresión de dicho gen con variedades caracterizadas por la alta calidad de producción y la sobreexpresión con variedades resistentes al estrés abiótico (Hu et al., 2015). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de *TIR1* varía entre individuos partenocárpicas de distintos cultivares de *C. sativus*, por lo que se sugiere que existe un mecanismo distinto de formación del fruto entre individuos de una especie (Cui et al., 2014). En este sentido, se conoce con detalle que la TFF en plantas modelo responde a un mecanismo hormonal que involucra cambios en los niveles de expresión de las familias genéticas como ARF, *Aux/IAA* y *TIR1*; sin embargo, aún se desconoce su funcionamiento en

plantas con síndrome post-polinización como las orquídeas (Li *et al.*, 2016; O'Neill y Nadeau, 1997). Particularmente en *Vanilla planifolia* Andrews (Orchidaceae) se ha planteado que el metabolismo de auxinas está relacionado con la respuesta diferencial en la interrupción de la TFF (definida comercialmente como 'caída prematura de frutos'), entre el genotipo silvestre CH-I, considerado como 'tolerante' debido a las altas tasas de éxito reproductivo, y el genotipo comercial CH-VI, reconocido como 'susceptible' debido al bajo porcentaje de éxito en las flores polinizadas (Salazar-Rojas *et al.*, 2016).

Por lo anterior, y dado que no se conocen con detalle los procesos moleculares que dirigen la TFF en organismos con SPP, se planteó como objetivo analizar los patrones de expresión diferencial de los genes *ARF8*, *IAA25* y *TIR1* durante los 45ddp, críticos para el desarrollo y maduración de las flores y estructuras reproductivas en dos genotipos contrastantes de *Vanilla planifolia* Andrews.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material biológico

Flores de los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia* se polinizaron manualmente y se colectaron durante siete momentos del desarrollo: 1) en el botón floral previo a la antesis (1dap), 2) en la antesis sin polinizar (As/p) y 3) polinizada (Ap), 4) en la flor polinizada un día después (1ddp), 5) 10 días después (10ddp), 6) 25 días después (25ddp) y 7) 45 días después (45ddp). El material biológico se almacenó en la solución de preservación RNAlater® (SIGMA) y/o en N2 líquido hasta su procesamiento.

Extracción de ARN total

El gineceo se separó y se trituró con N2 líquido. Posteriormente se realizó la extracción de ARN total, con TRIzol Reagent®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Al ARN obtenido se le aplicó un tratamiento con ADNasa I, para eliminar remanentes de ADN genómico. El ARN se precipitó adicionando 20 µl de acetato de sodio 3 M y 60 µl de etanol frío al 100 % durante 12 h a -80 °C; posteriormente se removió el etanol y la pastilla se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas. Finalmente, se verificó la integridad del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

Síntesis de ADNc

La reacción de síntesis de ADNc se realizó con la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase de Invitrogen® y

oligodT, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, en un termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler, con un ciclo inicial de 42 °C durante 60 min y 70 °C por 10 min.

qPCR

Para amplificar los genes *ARF8*, *IAA25-like* y *TIR1* de *V. planifolia* se diseñaron pares de iniciadores (Cuadro 1) en el programa Geneious 9 ®, con una longitud de 21 pb, Tm de 60 °C, 50 % de GC y un producto de amplificación de 80-120 bases, a partir de secuencias de *V. planifolia*, disponibles en la base de datos de nucleótidos GenBank: *VpARF8* (MK850820.1), *VpIAA25-like* (MK850819.1), *VpTIR1* (MK850821) y *VpACT* (KF513175.1) (Benson *et al.*, 2008). Los productos de amplificación se validaron mediante PCR de punto final y electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

La reacción de qPCR se realizó mediante el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix ajustado a 10 µl con 1 µl de cDNA por reacción, en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR System con el siguiente programa: ciclo inicial de 95 °C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min, 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min y 95 °C durante 15 seg. La expresión genética se calculó por triplicado de acuerdo con la fórmula $E = Peff (-\Delta Ct)$ (Pfaffl, 2004), donde Peff es la primera eficiencia calculada utilizando el programa LinRegPCR v3.0.0. Los niveles de expresión se indican como expresión relativa (ER) comparados con el gen control (House keeping) actina.

Análisis estadístico

Se consideró a las fases del desarrollo del fruto (siete fases) y el genotipo (dos genotipos) como fuentes de variación. Los datos para cada factor fueron analizados mediante un modelo equivalente a un diseño de dos factores completamente al azar balanceado. La comparación de medias entre genotipos, fases del desarrollo y la interacción entre genotipos por fase del desarrollo se realizó mediante una ANOVA de dos factores en el programa SAS (SAS, 2004). Además, se realizó un análisis de conglomerados tipo Heatmap, para conocer el perfil global de expresión relativa de los genes *VpARF8*, *IAA25-like* y *VpTIR1* en las siete fases del desarrollo y en los dos genotipos (CH-I y CH-VI). Se trabajó en línea con la aplicación Heatmapper/Expression HeatMap mediante el método de medición de distancias euclidianas como medida de distancia y método de agrupamiento de enlace promedio (Babicki *et al.*, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de expresión diferencial de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1*

Se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *VpIAA25-like* únicamente entre genotipos, mientras que la expresión de los genes *VpARF8* y *VpTIR1* presentó diferencias significativas entre fases de desarrollo y en todos los genes analizados resultó significativa la interacción entre genotipos y fases de desarrollo ($P < 0.0001$) (Cuadro 2).

Al respecto, se ha documentado que entre genotipos de *C. pepo* existe diferencia en los niveles de expresión de *ARF8* y *TIR1* (Pomares-Viciano *et al.*, 2017). Mientras que la variación en la expresión del gen *IAA25* se ha asociado principalmente con cambios durante la TFF (Wu *et al.*, 2012). En *V. planifolia* se observó un patrón de expresión similar únicamente cuando se analiza la interacción entre genotipos y fases de desarrollo, debido a que cada genotipo presentó un patrón de expresión relativa distinto en cada etapa del desarrollo (Cuadro 2).

Perfil de expresión de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1*

El agrupamiento superior presentó horizontalmente tres grupos (A), explicados a partir del patrón de expresión de los genes *VpARF8*, *VpIAA25* y *VpTIR1* (Figura 1). El grupo A1 integró el patrón más alto de expresión de los genes *VpIAA25* y *VpTIR1* observado en el genotipo CH-I (Figura

1). El grupo A2 describe un patrón de expresión bajo para el gen *VpARF8* en el genotipo CH-I. El grupo A3 representó niveles de expresión medios-altos para los tres genes en genotipo CH-VI (Figura 1). El agrupamiento vertical integró tres perfiles de expresión (P), de acuerdo con los patrones de similitud de las fases de desarrollo (Figura 1). P1 agrupó a las fases del desarrollo 45ddp, 1ddp y 25ddp (Figura 1). P2 reunió como a un patrón de expresión genética las fases del desarrollo Ap, As/p y 10ddp. El perfil 3, correspondiente a 1dap, presentó un patrón de expresión único entre las distintas fases de desarrollo evaluadas, donde las diferencias más evidentes se registraron en el genotipo CH-I, el cual presentó los valores más bajos de expresión para los tres genes analizados.

A partir de la relación observada, entre agrupamientos y perfiles mediante el análisis de Heatmap se identificó, en ambos genotipos, un patrón de similitud en el nivel de expresión de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1*, un día después de la polinización (1ddp) y durante los 45ddp. Particularmente, en el genotipo CH-I se observó que la regulación del complejo *ARF8-IAA25-like-TIR1* es prácticamente igual en la etapa de polinización y en la de fecundación (Figura 1).

Las plantas con SPP, como la familia Orchidaceae, presentan un desfase temporal entre las etapas de polinización y fecundación (Mayer *et al.*, 2011; O'Neill, 1997). Este desfase se confirmó en los ovarios de los dos genotipos de *V. planifolia* a partir de los perfiles de ER de *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1*; así como de la observación de preparaciones histológicas (Figuras 2A1 y 2B1).

Cuadro 1. Iniciadores específicos para *VpARF8*, *VpIAA25-like*, *VpTIR1* y *VpACT* con características para qPCR.

Nombre del gen	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	Accesión NCBI
<i>VpARF8</i>	GAGCTAGGGCAGATGTTTGGT	GGTCGTCTCCAAGAAGAAGCA	(MK850820.1)
<i>VpIAA25-like</i>	TCTCCTCTACGAAGACCACGA	GCCTCTTGACCGAAGAAAGGA	(MK850819.1)
<i>VpTIR1</i>	TCGATTACTGGCAAGGAGGATG	ATGTAGAGCTTCTCAACAGGGC	(MK850821)
<i>VpACT</i>	GGTTACTCCTTTACGACCACA	GCTGCTCTTCGCTGTCTCAA	(KF513175.1)

Cuadro 2. Medias y coeficiente de variación de la expresión relativa (ER) de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* de los genotipos CH-I y CH-VI de *V. planifolia*.

Genes	Media (ER)	Coeficiente de variación	Cuadrados medios		
			Genotipo	Fase del desarrollo	Genotipo*Fase del desarrollo
<i>VpARF8</i>	0.413	60.989	0.020 ^{NS}	1.686 ^{***}	1.314 ^{***}
<i>VpIAA25-like</i>	1.220	12.069	0.497 ^{***}	0.071 ^{NS}	0.307 ^{***}
<i>VpTIR1</i>	1.447	51.831	0.280 ^{NS}	3.368 ^{***}	18.15 ^{***}

NS: valores estadísticamente no significativos; ***: diferencia significativa ($P < 0.0001$).

A partir de la descripción del genotipo CH-I se reconocieron cuatro fluctuaciones significativas en la expresión de los tres genes, que sugieren la existencia de cuatro etapas en el síndrome post-polinización: (1) pre-polinización, (2) polinización, (3) post-polinización y (4) fecundación (Figura 3):

(1) Pre-polinización (1dap-As/p). En esta etapa no se identificaron óvulos formados, solamente proyecciones placentarias en estado inmaduro (Figura 3A1), así como niveles marginales de expresión de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* (Figura 3A). Esta información contrasta con los trabajos de Goetz *et al.* (2007), Jayasinghe *et al.* (2019) y Wu *et al.* (2012), quienes

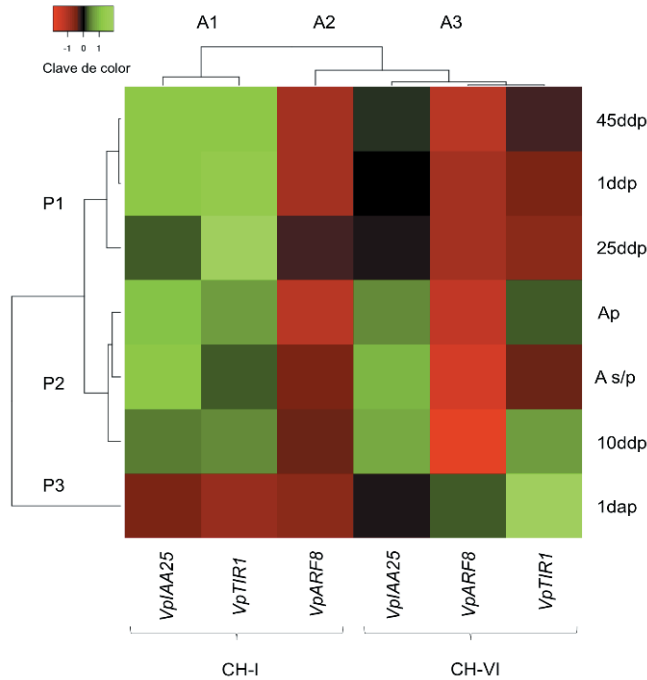


Figura 1. Dendrograma *Heatmap* de los niveles ER para los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* en dos genotipos de *V. planifolia* CH-I ('tolerante') y CH-VI ('susceptible'), durante siete fases del desarrollo. Análisis realizado mediante el método de medición de distancias euclidianas y método de agrupamiento por enlace promedio. Fases de desarrollo: un día antes de la polinización (1dap), botón floral en antesis sin polinizar (As/p), botón floral en antesis después de ser polinizado (Ap), un día después de la polinización (1ddp), diez días después de la polinización (10ddp), 25 días después de la polinización (25ddp) y 45 días después de la polinización (45ddp).

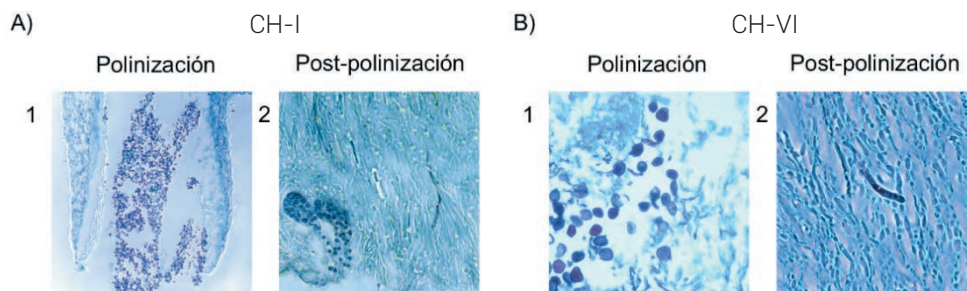


Figura 2. Preparaciones histológicas de la cavidad estigmática. Germinación de polinios y tubos polínicos durante la polinización y post-polinización de los dos genotipos: A) Genotipos CH-I en la etapa de polinización (1) y post-polinización (2). B) Genotipo CH-VI en la etapa de polinización (1) y post-polinización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

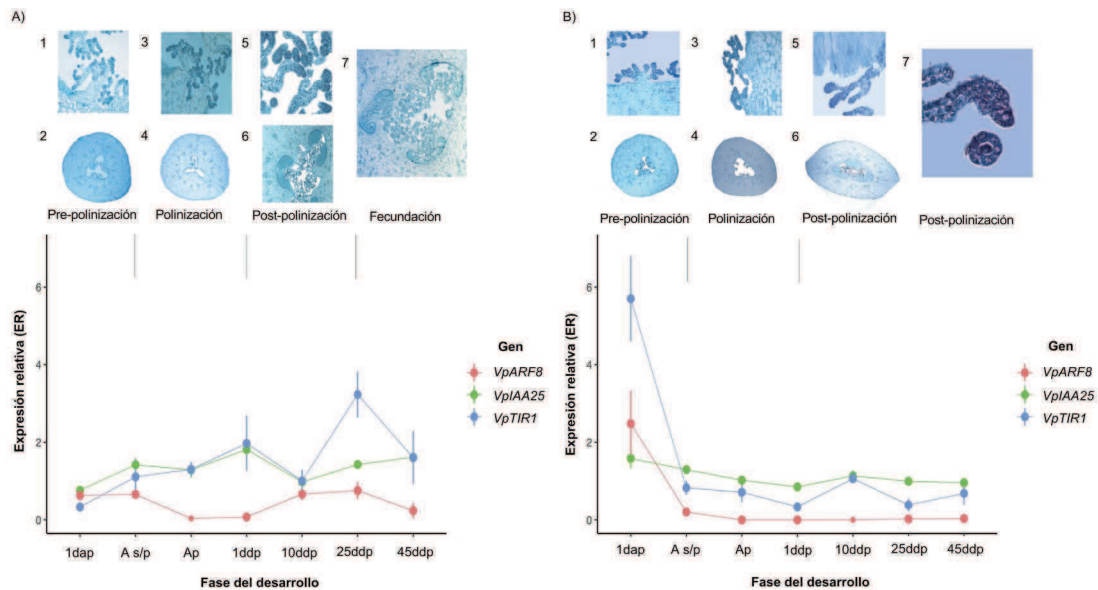


Figura 3. Niveles de expresión relativa (ER) para los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* en los genotipos CH-I y CH-VI en diferentes fases del desarrollo: un día antes de la polinización (1dap), en la antesis sin polinizar (As/p), la antesis una vez polinizada la flor (Ap), un día después de la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

mencionan que los niveles altos de transcritos de los genes *ARF8*, *IAA25* y *TIR1* son característicos de la etapa de pre-polinización en plantas modelo que presentan óvulos funcionales en el momento de antesis.

(2) Polinización (Ap-1ddp). Justo en el momento en que el polen toca el estigma se presentó una disminución a niveles basales de expresión de *VpARF8* y un aumento de expresión en *VpIAA25-like* y *VpTIR1*, particularmente en 1ddp (Figura 3). Dicho patrón de expresión coincide con el comportamiento de los niveles de expresión de *TIR1*, *IAA25* y *ARF* registrados durante la etapa de polinización en *A. thaliana*, *Pisum sativum*, *S. lycopersicum*, *C. pepo* y *Cucumis sativus* L. (Cui et al., 2014; Goetz et al., 2007; Jayasinghege et al., 2019; Pomares-Viciana et al., 2017; Wu et al., 2012). En esta etapa se observó la germinación de los polinios en el estigma de ambos genotipos (Figuras 2A1 y 2B1) y en la pared interna del ovario, además de un incremento en el número de proyecciones placentarias alargadas (Figura 3A3).

(3) Post-polinización (10ddp-25ddp). En esta etapa se distinguió un aumento en la expresión de *VpARF8* y una disminución de *VpIAA25-like* y *VpTIR1* durante los 10ddp, seguido de un incremento en la expresión de *VpIAA25-like* y *VpTIR1* a los 25ddp (Figura 3A). Durante esta etapa se observó el desarrollo de tubos polínicos y tejido de transmisión en el estigma (Figura 2A2), así como la proliferación de las proyecciones placentarias y la diferenciación de sus extremos apicales, donde se

distingue claramente la célula madre de la megaspora (Figuras 3A5 y 3A6). Esto coincide con lo descrito para *Pisum sativum* por Jayasinghege et al. (2019), quienes plantean que el aumento en la ER de *TIR1* es característico de los momentos previos a la fecundación.

(4) Fecundación (45ddp). En esta etapa se registró una disminución en la expresión de *VpARF8* y *VpTIR1*, al mismo tiempo que se observó un incremento en la expresión de *VpIAA25-like* (Fig. 3A). Además, las paredes internas del ovario se han diferenciado completamente y se distinguen estados iniciales de semillas (Figura 3A7). Al respecto, se ha descrito previamente en *C. pepo*, *A. thaliana* y *S. lycopersicum* que existe una disminución en la expresión de *ARF8* y *TIR1*, justo cuando comienza el crecimiento y desarrollo del fruto (Goetz et al., 2006; Pomares-Viciana et al., 2017).

En el caso del genotipo CH-VI se observó un patrón de expresión contrastante respecto al del genotipo CH-I. En éste se distinguió que en la fase de pre-polinización el genotipo CH-VI inicia con niveles de expresión marcadamente altos de *TIR1* en 1dap y después de la polinización se identifica un patrón de disminución en los tres genes hasta los 45ddp (Figura 3B). Este comportamiento también se percibe en el tejido interno del ovario, donde después de la polinización inicia la proliferación de las proyecciones placentarias, pero su diferenciación se realiza de forma lenta y progresiva (Figura 3B1 y Figura 3B3). Posteriormente se incrementa la cantidad de células madre de la megaspora y se observa

la presencia de tejido de transmisión y tubos polínicos; sin embargo, los óvulos aún no están diferenciados (Figura 3B5), lo cual sugiere que hasta los 45ddp del tejido del genotipo CH-VI se mantiene aún dentro de la fase post-polinización.

Modelo de expresión de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* durante la transición de flor a fruto en *V. planifolia*

A partir de la integración de los resultados observados en los dos genotipos de *V. planifolia* respecto a la fluctuación en la expresión de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* y del conjunto de señales que inducen la formación del fruto en especies modelo con óvulos formados en el momento de antesis (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010; Goetz *et al.*, 2007; Pomares-Viciano *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2012) se plantea la siguiente propuesta para explicar el proceso de TFF en condiciones normales de desarrollo durante el SPP de *V. planifolia*:

1) La primera etapa corresponde a pre-polinización (1dap-As/p), donde las altas concentraciones de *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* sugieren la presencia de bajas concentraciones de auxinas en el botón floral, la heterodimerización de la proteína *VpARF8* con *VpIAA25-like*, que impide la transcripción de genes de respuesta a auxinas y la inducción de óvulos, por lo que en esta etapa no existen óvulos formados (Figura 4A y Figura 3A1) (Goetz *et al.*, 2006; Pomares-Viciano *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2012).

2) Cuando ocurre la polinización aumenta la concentración de auxinas exógenas que provienen del polen (O'Neill, 1997), lo cual disminuye la expresión de transcritos de *VpARF8* y aumenta la expresión de *VpIAA25-like* y *VpTIR1*. Durante antesis y el día posterior a la polinización, el complejo SCFTIR1/AFB recluta a la proteína *VpIAA25-like* uniéndose al receptor *VpTIR1*, mientras que RBX1 podría ubiquitinar a la proteína *VpIAA25-like* para su degradación vía proteosoma 26S, lo cual permite que la proteína *VpARF8* quede libre y active los genes de

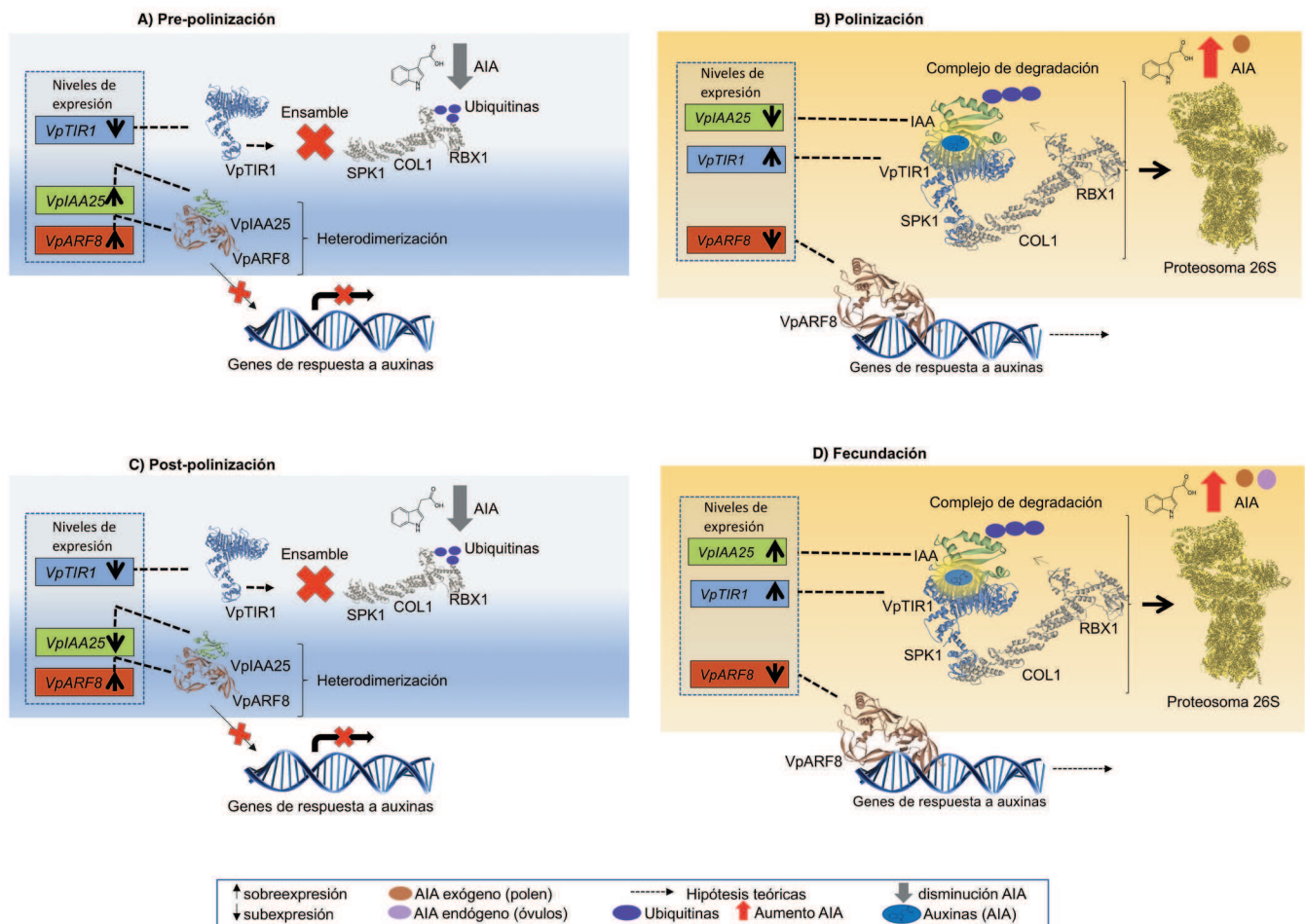


Figura 4. Modelo de transición de flor a fruto en *V. planifolia* basado en los resultados obtenidos en el genotipo CH-I y en los trabajos de Calderon-Villalobos *et al.* (2010), Goetz *et al.* (2007) y Pandolfini *et al.* (2007). A) Pre-polinización: 1dap-As/p. B) Polinización: Ap-1ddp. C) Post-polinización: 10ddp-25ddp. D) Fecundación: 45ddp.

inducción, desarrollo y maduración de óvulos (Figura 4B) (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010). Posteriormente, durante la etapa de post-polinización disminuye la concentración de auxinas en el tejido, aumenta la expresión de *VpARF8*, mientras disminuye la expresión de *VpTIR1* y *VpIAA25-like* (Figura 4C) y la heterodimerización de las proteínas *VpARF8* con *VpIAA25-like* impiden la transcripción de genes de inducción para el desarrollo de fruto (Figura 4C) (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010; Goetz *et al.*, 2006).

3) Finalmente, durante la etapa de fecundación se incrementa la concentración de auxinas endógenas (por biosíntesis en óvulos maduros) y exógenas (provenientes del polen) (Goetz *et al.*, 2007; Sundberg y Østergaard, 2009). Posteriormente se fertilizan los óvulos y con ello disminuye la expresión de *VpARF8*, se aumentan los niveles de *VpIAA25-like* y *VpTIR1* alcanza su mayor expresión y disminuye hacia los 45ddp (Figura 4D). Por esto se asume que el complejo SCF*TIR1*/AFB recluta a la proteína *VpIAA25-like* uniéndose al receptor *VpTIR1*, mientras que RBX1 podría ubiquitinar a la proteína *VpIAA25-like* para su degradación vía proteosoma 26S, lo cual permite que la proteína *VpARF8* quede libre y active los genes de inducción, desarrollo y maduración de frutos (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010; Goetz *et al.*, 2007) (Figura 4D).

CONCLUSIONES

La expresión temporal de los genes *VpARF8*, *VpIAA25-like* y *VpTIR1* presentó un efecto genotipo dependiente durante el síndrome post-polinización en *V. planifolia*. El genotipo CH-I ('tolerante a caída de fruto') presentó cambios en los niveles de expresión de los tres genes durante las etapas del desarrollo, tuvo un desarrollo acelerado de las proyecciones placentarias que derivó en la conformación inicial de la semilla. El genotipo CH-VI ('susceptible') mantuvo niveles bajos de expresión y un desarrollo lento del ovario. En vainilla, lo que comercialmente se reconoce como caída prematura de frutos corresponde a 'caída prematura de flor'.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la educación (SEP- CONACYT), Convocatoria de investigación Científica Básica 2015, Proyecto 255952. La Biol. Olga Andrea Hernández-Miranda agradece a CONACYT, por la beca para estudios de Posgrado en México.

BIBLIOGRAFÍA

Babicki S., D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J. R. Grant, A. Maciejewski y D. S. Wishart (2016) Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids*

- Research* 44:147–153, <http://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
- Benson D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell y D. L. Wheeler (2008) GenBank. *Nucleic acids research* 36:25–30, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn723>
- Calderon-Villalobos L. I., X. Tan, N. Zheng, M. Estelle (2010) Auxin perception-structural insights. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:1–17, <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a005546>
- Chen J. C. y S. C. Fang (2016) The long pollen tube journey and in vitro pollen germination of *Phalaenopsis* orchids. *Plant Reproduction* 29: 179–188, <http://doi.org/10.1007/s00497-016-0280-z>
- Cui L., T. Zhang, J. Li, Q. Lou y J. Chen (2014) Cloning and expression analysis of Cs-*TIR1*/AFB2: The fruit development-related genes of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 36:139–149, <http://doi.org/10.1007/s11738-013-1394-7>
- Goetz M., L. C. Hooper, S. D. Johnson, J. C. M. Rodrigues, A. Vivian-Smith y A. M. Koltunow (2007) Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145:351–366, <http://doi.org/10.1104/pp.107.104174>
- Goetz M., A. Vivian-Smith, S. D. Johnson y A. M. Koltunow (2006) AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18:1873–1886, <http://doi.org/10.1105/tpc.105.037192>
- Hu W., J. Zuo, X. Hou, Y. Yan, Y. Wei, J. Liu, ... Z. Jin (2015) The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 6:1–16, <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00742>
- Jayasinghege C. P. A., J. A. Ozga, C. D. Nadeau, H. Kaur y D. M. Reinecke (2019) *TIR1* auxin receptors are implicated in the differential response to 4-Cl-IAA and IAA in developing pea fruit. *Journal of Experimental Botany*, 70:1239–1253, <http://doi.org/10.1093/jxb/ery456>
- Li S. B., Z. Z. Xie, C. G. Hu y J. Z. Zhang (2016) A review of Auxin Response Factors (ARFs) in plants. *Frontiers in Plant Science* 7:1–7, <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>
- Lord E. M. y S. D. Russell (2002) The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18:81–105, <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.083438>
- Mayer J. L. S., S. M. Carmello-Guerreiro y B. Appezzato-da-Glória (2011) Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (ORCHIDACEAE). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206:601–609, <http://doi.org/10.1016/j.flora.2011.01.009>
- O'Neill S. D. and J. A. Nadeau (1997) Postpollination flower development. *Horticultural Reviews* 19:1–58, <http://doi.org/10.1002/9780470650622.ch1>
- Pandolfini T., B. Molesini y A. Spena (2007) Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science* 12:327–329, <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.011>
- Pattison R. J., F. Csukasi y C. Catalá (2014) Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiologia Plantarum* 151:62–72, <http://doi.org/10.1111/ppl.12142>
- Pfaffl M. W. (2004) Quantification strategies in real-time PCR: A-Z of Quantitative PCR. S.A. Bustin (eds.) International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA. pp:87–112.
- Pomares-Viciano T., J. Die, M. Del Río-Celestino, B. Román y P. Gómez (2017) Auxin signalling regulation during induced and parthenocarpic fruit set in zucchini. *Molecular Breeding* 37:2–14, <http://doi.org/10.1007/s11032-017-0661-5>
- Salazar-Rojas V. M., E. Sandoval-Zapotitla, C. V. Granados-Hernández, Y. Cruz-Ruiz, B. E. Herrera-Cabrera y J. E. Campos-Contreras (2016). Descripción estructural y funcional de caída prematura de frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew. *Agroproductividad* 9:17–20
- SAS, Statistical Analysis System (2004) SAS/STAT User's Guide. Version 9.1, SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA. 5136 p.
- Sundberg E. and L. Østergaard (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1:1–14, <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a001628>
- Wu J., Z. Peng, S. Liu, Y. He, L. Cheng, F. Kong, ... G. Lu (2012) Genome-wide analysis of *Aux/IAA* gene family in Solanaceae species using tomato as a model. *Molecular Genetics and Genomics* 287:295–311, <http://doi.org/10.1007/s00438-012-0675-y>