

# EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *ARF8* INVOLUCRADO EN EL METABOLISMO DE AUXINAS DURANTE LA TRANSICIÓN DE FLOR A FRUTO EN *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF *ARF8* GENE INVOLVED IN AUXINE METABOLISM DURING THE TRANSITION OF FLOWER TO FRUIT IN *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews

Hernández-Miranda O.A.<sup>1</sup>, Cruz-Ruiz Y.<sup>1</sup>, Campos J.E.<sup>1</sup>, Herrera-Cabrera B.E.<sup>2</sup>, Salazar-Rojas V. M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. de los Barrios, N° 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C. P. 54090. <sup>2</sup>Colegio de Post-graduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla No. 205, San Pedro Cholula, Puebla. C. P. 72760.

\*Autor de correspondencia. adnbic@gmail.com

## RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), presenta un problema de "caída prematura de fruto" poco estudiado en orquídeas. Dado que las auxinas tienen una participación específica en la regulación del proceso de transición de flor a fruto y concretamente que el gen *ARF8* regula la expresión de genes relacionados con la madurez de óvulos y el desarrollo del fruto, el objetivo del presente estudio fue analizar los niveles de expresión del gen *ARF8* durante los 45 días críticos después de la polinización (ddp), en los genotipos CH-I y CH-VI de vainilla. Los resultados muestran diferencias significativas en los niveles de transcritos de *ARF8* a partir del día 25 ddp, e indican que los óvulos del genotipo CH-I maduran antes que los del CH-VI. Debido a que la fertilización ocurre entre los 25 y 45 ddp en el genotipo CH-I, mientras que en el genotipo CH-VI la fertilización no ocurre hasta después del día 45. Por tal razón, el genotipo CH-VI es más susceptible a la "caída". A partir de los resultados, se concluye que no existe fruto cuando hay abscisión, por lo que biológicamente el fenómeno corresponde a un proceso de abscisión de flores no fertilizadas.

**Palabras clave:** Orquídeas, *Vanilla planifolia*, desarrollo floral, caída de fruto, genotipos.

## ABSTRACT

Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), faces a problem of "premature fruit drop" little studied in orchids. Since auxins have a specific participation in the regulation of transition from flower to fruit, and specifically that the *ARF8* gene regulates the expression of genes related to ovules maturity and fruit development, the objective of the present study was to analyze the expression levels of *ARF8* gene during the critical 45 days post-pollination (dpp) in the CH-I and CH-VI genotypes of *V. planifolia*. The results show significant differences in the levels of *ARF8* transcripts from 25 dpp, and indicate that the ovules of the CH-I genotype mature earlier than those of CH-VI. Because fertilization occurs between 25 and 45 ddp in the CH-I genotype, whereas in the CH-VI genotype fertilization does not occur until after day 45. For this reason, the CH-VI genotype is more susceptible to the "fruit drop". From the results it is concluded that there is no fruit when there is abscission, so that biologically the phenomenon corresponds to a process of "abscission of unfertilized flowers".

**Agroproductividad:** Vol. 11, Núm. 3, marzo, 2018. pp: 15-21.

**Recibido:** enero, 2018. **Aceptado:** marzo, 2018.



**Keywords:** Orchids,  
*Vanilla planifolia*,  
floral development,  
fruit drop, genotypes.

## INTRODUCCIÓN

La interrupción en la transición de flor a fruto es un proceso crítico en todas las angiospermas, en varios cultivos comerciales los niveles de caída prematura de frutos puede representar hasta 95% de la producción (Nelson *et al.*, 1998; Guevara y Jiménez, 2006). En la familia Orchidaceae, la situación es similar ya que de manera natural, sólo entre 1 y 3% de las flores logran transformarse en frutos (Rodríguez-Robles *et al.*, 1992). Uno de los factores involucrados en este fenómeno, es el largo proceso de fertilización que experimenta dicha familia, el cual puede ocupar entre 45 y 65 días después de la polinización (ddp). El ovario de las orquídeas 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. 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 (Chen y Fang, 2016).

Las auxinas tienen una participación esencial en este proceso, inducen el desarrollo y maduración de los óvulos después de la polinización (Wang *et al.*, 2009; Domingos, 2016) e incluso después de la fertilización, una vez formadas las semillas, las auxinas se difunden hacia los demás tejidos del fruto, regulando el creci-

miento y división celular del fruto. Esto ocurre mediante mecanismos moleculares de regulación de auxinas endógenas que involucran etapas de biosíntesis, señalización, transporte y degradación (Pattison *et al.*, 2013). Dichas etapas están reguladas por la expresión de genes, principalmente de las familias *PIN*, *YUCCA*, *TIR*, *AUX/IAA* y *ARF* (Kang *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2015; Domingos, 2016).

En organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) y *Solanum lycopersicum* (Solana-ceae) se ha observado que la regulación transcripcional del metabolismo de auxinas durante las primeras etapas del desarrollo del fruto, está mediada por la heterodimerización de dos familias de genes *AUX/IAA* y *ARF* (Auxin Response Factor) (Pandolfini *et al.*, 2007). Dentro de la familia de genes *ARF* se ha identificado que *ARF8* puede estimular la expresión temprana de genes relacionados con la madurez de óvulos y el desarrollo del fruto (Goetz *et al.*, 2007; Pomares-Vici-ana *et al.*, 2017). En la familia Orchidaceae, no se ha documentado la actividad de *ARF8* en el modelo de regulación de auxinas durante el desarrollo del fruto.

En el caso concreto de México, la producción de vainilla ha disminuido en los últimos 10 años hasta en 80% por un fenómeno reconocido inicialmente como "caída prematura de fruto" el cual se presenta entre los 45 y 55 ddp (Hernández-Hernández, 2011). Hasta el momento se desconocen las causas de dicho fenómeno, sin embargo datos preliminares sugieren que el mecanismo molecular puede estar relacionado con el metabolismo de auxinas en interacción con etileno. Por otra

parte se ha observado, que existe una respuesta diferencial entre los genotipos cultivados, concretamente se ha observado que el genotipo CH-I es un material más tolerante al fenómeno de caída, mientras que el genotipo CH-VI parece ser el más susceptible (Salazar-Rojas *et al.*, 2016).

Dado que no se conocen con detalle los genes específicos y su comportamiento a lo largo del proceso de transición de flor a fruto en vainilla, se planteó como objetivo analizar los niveles de expresión del gen *ARF8* durante la transición de flor a fruto en vainilla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

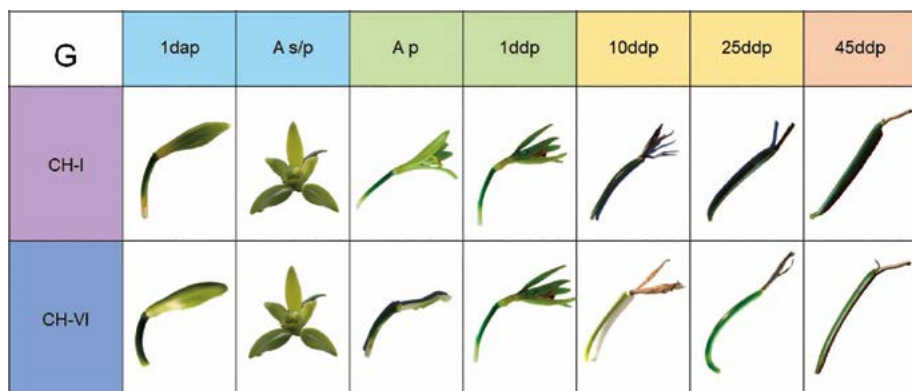
Se colectaron flores de dos genotipos de vainilla: el genotipo tolerante (CH-I) y genotipo susceptible a caída (CH-VI) (Salazar-Rojas *et al.*, 2016; Herrera-Cabrera *et al.*, 2016). El material biológico se almacenó en la solución de preservación RNA-*later*<sup>®</sup> (SIGMA) o en N<sub>2</sub> líquido.

### Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de dos factores completamente al azar. Se consideraron el tiempo (ddp) y el genotipo como fuentes de variación. En el tiempo se incluyeron siete etapas de desarrollo: el botón floral previo a la antesis (-1ddp), la antesis en dos condiciones, sin polinizar (A s/p) y polinizada (A p), también la flor un día después de ser polinizada (1 ddp), 10 días después (10 ddp), 25 días después (25 ddp) y 45 días después de ser polinizada (45 ddp). Los tiempos se basaron en el periodo crítico de desarrollo del fruto en *V. planifolia* (Fig. 1).

### Extracción de RNA<sub>Total</sub>

Se segregaron los ovarios y se trituró el tejido con N<sub>2</sub> líquido para evitar la



**Figura 1.** Diseño experimental con siete fases del desarrollo del ovario de los genotipos CH-I y CH-VI un día antes de la polinización (1dap), antesis sin polinizar (A s/p), antesis polinizada (A p), 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).

degradación del material biológico. Se procedió a la extracción de RNA<sub>Total</sub> con TRIzol<sup>®</sup> Reagent, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se le realizó un tratamiento con DNasa I, para eliminar remanentes de DNA genómico, y se precipitó en 20  $\mu$ L de acetato de sodio 3M y 60  $\mu$ L de etanol frío a 100%, durante 12 h a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se removió el etanol y se resuspendió la pastilla en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Finalmente se verificó la integridad del RNA<sub>Total</sub> mediante una electroforesis en gel de agarosa a 1%.

### Síntesis de cDNA

Las muestras de RNA<sub>Total</sub> se mantuvieron en hielo. La reacción de síntesis de cDNA se realizó con la enzima SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase de Invitrogen<sup>®</sup> y con oligodT, en un termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler con ciclo inicial de  $42^{\circ}$  durante 60 minutos,  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

### qRT-PCR

Se utilizaron pares de primers diseñados en el programa Geneious 9<sup>®</sup> a partir de mapeos con un transcriptoma de referencia de vainilla (en proceso) y secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos GenBank y Phytozome con las claves de acceso: AT5G37020.1 (*Arabidopsis thaliana* ARF8) y como gen de referencia KF513175.1 (*V. planifolia*, actina) (Tabla 1).

La reacción de qRT-PCR se realizó mediante el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix en el termociclador StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System con el programa: Ciclo inicial de  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min, seguido por 45 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  15 seg,  $60^{\circ}\text{C}$  1 min,  $95^{\circ}\text{C}$  15 seg,  $60^{\circ}\text{C}$  1 min y  $95^{\circ}\text{C}$  15 seg. Para

conocer los niveles de expresión de los genes se utilizó el método de cuantificación relativa mediante el comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001).

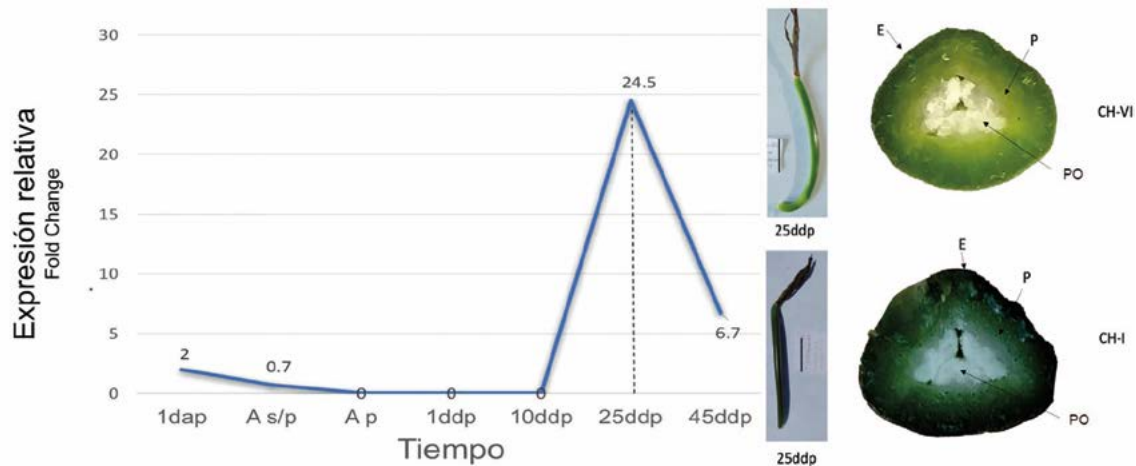
## RESULTADOS

Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en los niveles de expresión del gen *ARF8* tanto en el tiempo (a lo largo de los 45 ddp), como entre los genotipos CH-I (tolerante) y CH-VI (susceptible). El genotipo CH-I registró los mayores niveles de expresión de *ARF8* en todos los tiempos analizados; desde 1dap se observó una diferencia en la expresión relativa (ER) de 2.02 veces más expresión del gen *ARF8* en el genotipo CH-I en comparación con la expresión del genotipo CH-VI. Posteriormente, fue hasta los 25 ddp que se observó 24.5 veces más ER de *ARF8* en el genotipo CH-I en comparación con el genotipo CH-VI. Y una disminución en la ER a los 45 ddp pero 6.7 veces más alta que en el genotipo CH-VI (Fig. 2-A). Asimismo, en las imágenes preliminares de los cortes de ovario que corresponden con 25 ddp se puede apreciar que en el genotipo CH-VI no hay diferenciación de la placenta, y aun se observan primordios de óvulos (Fig. 2B); mientras que en el genotipo CH-I se puede apreciar la formación del tejido de la placenta y los ovarios más diferenciados (Fig. 2B).

Los niveles de expresión del gen *ARF8* indican que previo a la antesis de la flor, existe una expresión basal de transcritos de *ARF8* en ambos genotipos. Cuando la flor está en antesis, el estigma está receptivo, los niveles de

**Tabla 1.** Primers diseñados para el estudio de la expresión del gen ARF en vainilla (*V. planifolia*).

Gen	Primer	%GC	$\Delta\text{G}$ Máxima	$\Delta\text{G}$ Mínima	T <sub>m</sub> ( $^{\circ}\text{C}$ )
VpARF8	F: GAGCTAGGGCAGATGTTTGGT	52.4	-39.58	-39.9	60.1
	R: GGTCGCTCTCCAAGAAGAAGCA	52.5	-39.9	-39.9	60.0
VpActin	F: GGGTTACTCCTTTACGACCACA	52.4	-39.58	-39.9	60.1
	R: GCTGCTCTTCGCTGTCTCAA	52.5	-39.9	-39.9	60.0



**Figura 2.** A) Gráfica expresión relativa (ER) del gen *ARF8* del genotipo CH-I en comparación con el genotipo CH-VI, se observa que en 25 ddp el nivel de expresión del gen *ARF8* del genotipo CH-I es 24.5 veces más alto que el CH-VI. \*1dap: 1 día antes de la polinización, A s/p: Antesis sin polinizar, A p: Antesis flor polinizada: 1ddp, 10ddp, 25ddp y 45ddp (ddp=días después de la polinización). 2B) Cortes transversal del ovario de los genotipos CH-I y CH-VI en 25ddp, donde se observa el ovario (O), placenta (P) y epidermis (E).

transcritos de *ARF8* disminuyen parcialmente en los dos genotipos evaluados. Únicamente en el genotipo CH-I el nivel de expresión de *ARF8* se incrementa a partir de 1 ddp y continúa esa tendencia con diferenciación evidente de óvulos en el ovario, hasta el día 25 ddp que es el momento en que se presenta la fertilización de los óvulos y posterior a ello los niveles de *ARF8* disminuyen hacia el día 45 ddp.

En el genotipo CH-VI los niveles de expresión se mantienen en cero desde la polinización hasta los 10ddp. En 25 ddp, se incrementa ligeramente la expresión de *ARF8* y se mantiene en niveles bajos ER (0.5) hasta 45 ddp con un bajo nivel de diferenciación en los óvulos, lo que sugiere, que se impide su fertilización y provoca la abscisión de las flores no fertilizadas (Fig. 3).

## DISCUSIÓN

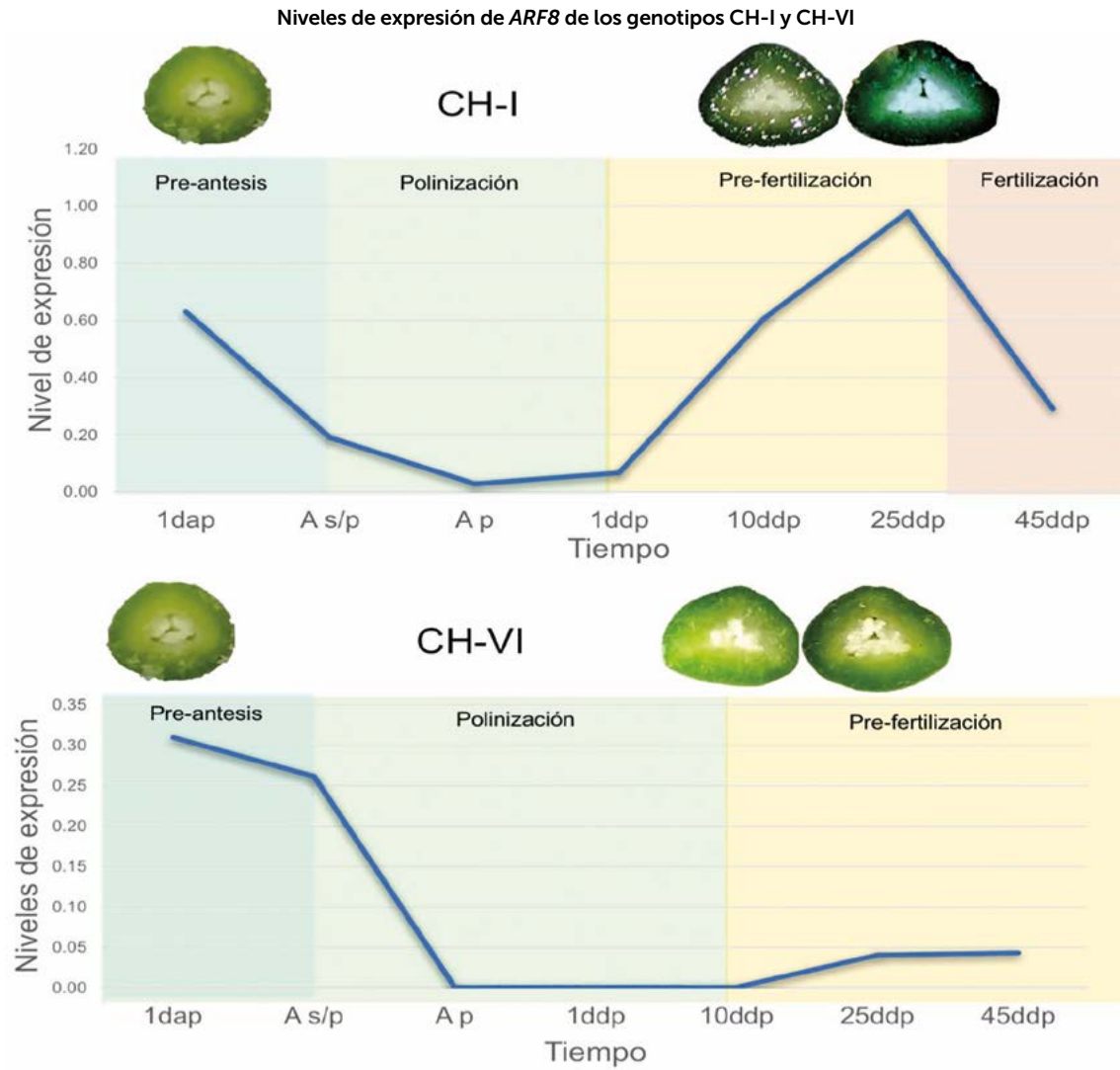
En las plantas la inducción, desarrollo y maduración de los óvulos durante la transición de flor a fruto, son procesos regulados a nivel transcripcional por la interacción de un complejo de auxinas (ácido indolacético) y un módulo de genes de las familias *ARF* y *Aux/IAA* (Si-Bei *et al.*, 2016). Se conoce que el gen *ARF8* junto con *IAA9*, forman un complejo represor transcripcional de la respuesta a auxinas antes del inicio de la fertilización. En ausencia de auxinas o una baja concentración en el tejido, la proteína *IAA9* retiene a *ARF8* y no permite que esta proteína active los genes de respuesta a auxinas que están involucrados con el desarrollo y crecimiento del fruto después de la fertilización de los óvulos. En presencia de

auxinas o en concentraciones altas, *IAA9* se ubiquitina y *ARF8* queda libre para poder participar como factor de transcripción de los genes de crecimiento y desarrollo del fruto (Goetz *et al.*, 2007) (Fig. 4).

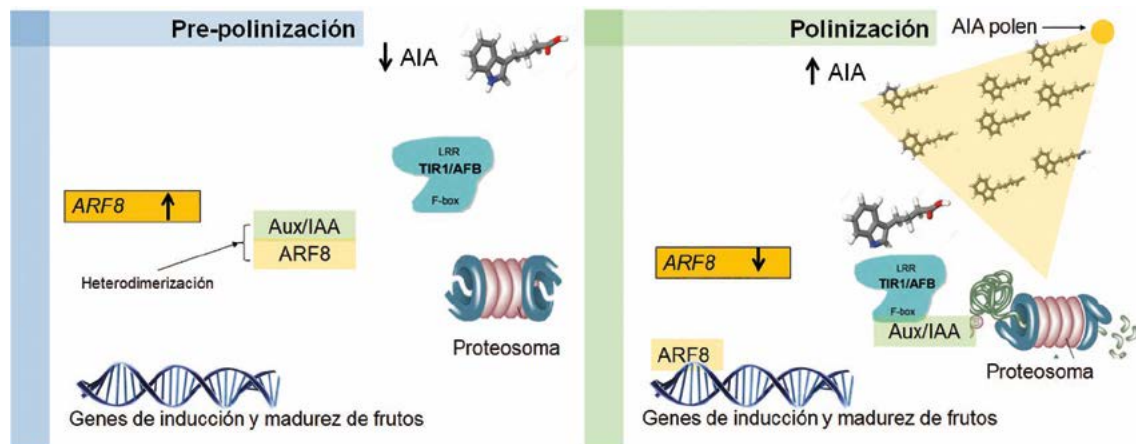
En la familia Orchidiaceae la polinización es la señal que induce el desarrollo y maduración de los óvulos. Previo al contacto del polen con el estigma, no existen óvulos en el ovario por lo que el proceso de fertilización es muy largo y tarda entre 45 y 55 días en el caso de vainilla (O'Neill, 1997; Chen y Fang, 2016).

De acuerdo con Pandolfini (2007), en la mayoría de las angiospermas solo es posible identificar un evento de cambio en los niveles de expresión de *ARF8* en el ovario después de la polinización en su transición a fruto. Sin embargo en vainilla y concretamente en el genotipo CH-I, se observan dos fluctuaciones en la expresión de *ARF8* en el ovario, las cuales se explican cómo dos cambios en la concentración de auxinas, uno asociado con la polinización y otro con la fertilización de los óvulos.

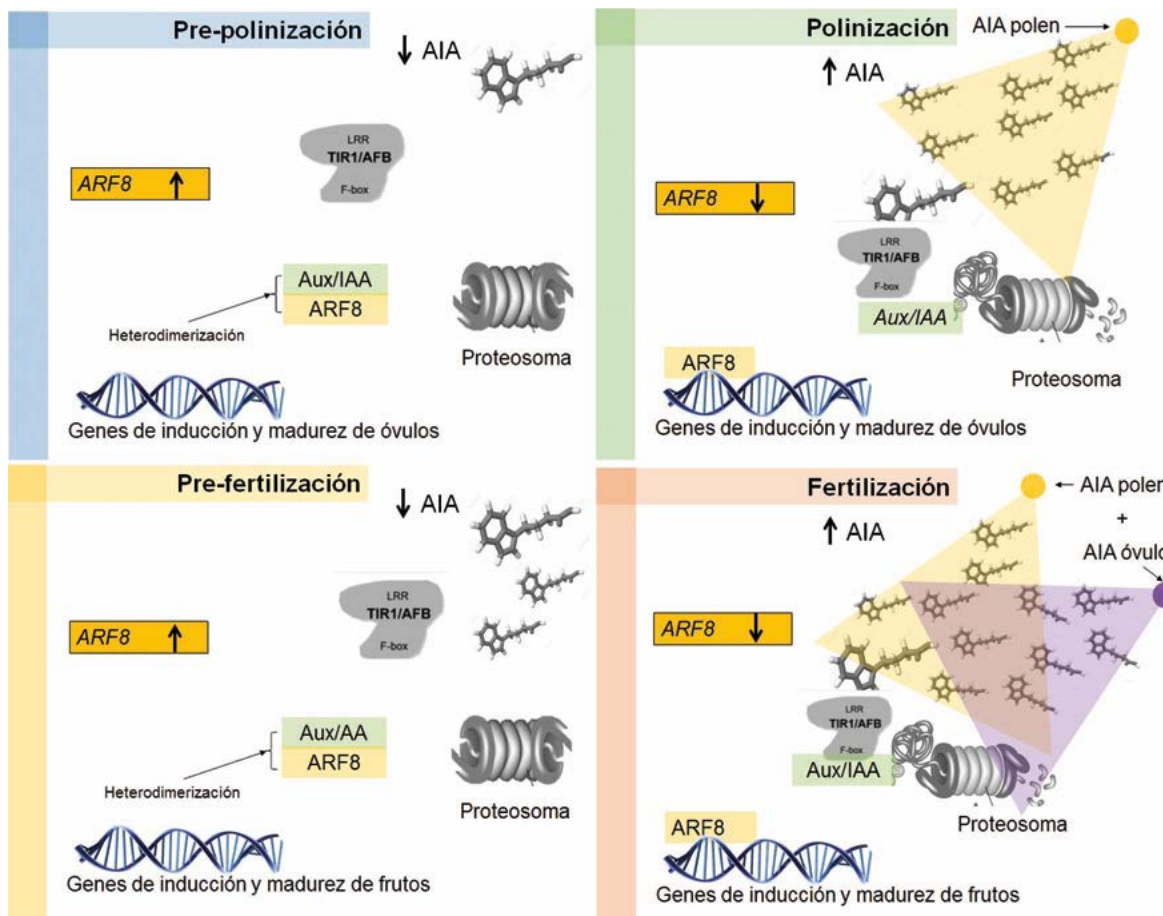
Por esta razón se propone que en vainilla y probablemente en otras orquídeas, el proceso de transición de flor a fruto presenta cuatro etapas de interacción en la expresión de genes del complejo *ARF8* e *IAA9*, las cuales modulan el encendido y apagado de los genes asociados con la inducción y madurez de óvulos, así como con el crecimiento y desarrollo del fruto después de la fertilización (Fig. 5) (Goetz *et al.*, 2007; Pandolfini 2007).



**Figura 3.** 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: 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).



**Figura 4.** Modelo de actividad de las proteínas *ARF8* y Aux/ IAA9 en el control de la iniciación del fruto, basado en Goetz et al. (2007).



**Figura 5.** Modelo de funcionamiento del complejo ARF8 - AUX/IAA y su comportamiento en las fases de pre-antesis, polinización, pre-fertilización y fertilización en *V. planifolia* (modificado Goetz et al., 2007).

En la Etapa de pre-fertilización, se observa que los niveles de expresión de *ARF8* son altos, lo cual sugiere bajas concentraciones de auxinas en las que la proteína *ARF8* se encuentra en complejo con *IAA9* y en consecuencia la transcripción de los genes de inicio del fruto se encuentra apagada (Fig. 5). Esto coincide con la imagen del corte transversal del ovario en 1dap, en el que no se observan óvulos formados ni otro tejido diferenciado (Fig. 3).

Durante la Etapa de polinización, se incrementa la concentración de AIA y disminuye el nivel de expresión de *ARF8* debido a que actúa como factor de transcripción en genes de desarrollo y maduración de los óvulos de vainilla (Fig. 5).

En la Etapa de pre-fertilización, en una condición normal (genotipo CH-I), los niveles de expresión de *ARF8* vuelven a incrementarse debido a la disminución en la concentración de auxinas, producida por la señal recibida de los óvulos maduros que están listos para ser fertilizados. En una condición susceptible a "caída" (genotipo CH-VI), no se incrementa la expresión de *ARF8* debido a que los óvulos siguen inmaduros y en proceso de desarrollo, concentraciones altas de auxinas en el tejido del ovario (Figuras 3 y 5).

Etapa de fertilización solo se observó en el genotipo CH-I, la cual se manifestó en un decremento de los niveles de expresión de *ARF8* después de los 25dpp, inducido por el incremento en la concentración

de auxinas, característico de la formación de semillas en las etapas de desarrollo y crecimiento de frutos (Goetz et al., 2007; Pandolfini 2007).

En el caso del genotipo CH-VI, después de los 25dpp no se observaron cambios en los niveles de expresión de *ARF8* ni en la diferenciación de los óvulos en el ovario. Lo que se sugiere que en dicho genotipo no ocurre la fertilización y esta señal provoca la abscisión de las flores no fertilizadas. De acuerdo con Pandolfini (2007), después de la polinización y la fertilización los niveles de expresión de *ARF8* disminuyen, lo cual coincide con nuestros resultados observados en el genotipo CH-I de vainilla, que mantiene dicho patrón

de expresión tanto después de la polinización como en la fertilización (Fig. 3).

Con base en los resultados obtenidos, en el genotipo CH-I la fertilización ocurre entre los 25 y 45 ddp, mientras que en el genotipo CH-VI es posterior o no sucede, lo cual lo convierte en un material más susceptible a las modificaciones ambientales provocadas por el cambio climático.

La información obtenida sobre el papel de *ARF8* en la regulación del metabolismo de auxinas durante la transición de flor a fruto en vainilla, abre una línea de investigación aplicada para el desarrollo a mediano y corto plazo de estrategias de intervención, que eviten la interrupción de la fertilización en la flores y su abscisión en el genotipo CH-VI, posiblemente a través del silenciamiento o supresión del gen *ARF8* o de algunos otros genes del complejo *TIR-AUX/IAA-ARF* en el germoplasma de vainilla.

## CONCLUSIÓN

Existe diferencia en los niveles de expresión de del gen *ARF8* en los genotipos CH-I y CH-VI de vainilla. La respuesta más evidente de la expresión diferencial de *ARF8* entre genotipos, ocurre a los 25 ddp y se manifiesta como fertilización en el genotipo CH-I mientras que en el genotipo CH-VI se expresa como ovarios con óvulos inmaduros. El evento reconocido como "caída prematura de fruto" corresponde biológicamente con la abscisión de flores no fertilizadas.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (SEP-CONACYT), Convocatoria de investigación Científica Básica 2015, Proyecto 255952. El Dr. Salazar-Rojas agradece la beca postdoctoral, otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## LITERATURA CITADA

- 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.
- Domingos, S., J. Fino, O.S. Paulo, C.M. Oliveira y L.F. Goulao. 2016. Molecular candidates for early-stage flower-to-fruit transition in stenopericarpic table grape (*Vitis vinifera* L.) inflorescences ascribed by differential transcriptome and metabolome profiles. *Plant Science* 244: 40-56.
- Goetz, M., L. C. Hooper, S. D. Johnson, J. Carlyle, M. Rodrigues, A. Vivian-Smith, A. M. Koltunow 2007. Expression of Aberrant Forms of Auxin Response Factor8 Stimulates Parthenocarpy in Arabidopsis. *Plant Physiology* 145: 351-366.
- Guevara, E. y V. Jiménez. 2006. La reproducción de las plantas. Editorial Universidad de Costa Rica. pp. 47-48.
- Hernández-Hernández J. 2011. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). [www.inifap.gob.mx/Documents/inicio/paquetes/vainilla\\_establecimiento.pdf](http://www.inifap.gob.mx/Documents/inicio/paquetes/vainilla_establecimiento.pdf). Fecha de acceso: agosto 2017.
- Herrera-Cabrera B.E., Hernández-Ruiz J. y A. Delgado-Alvarado. 2016. Variación del aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews silvestre y cultivada. *Agroproductividad* 9: 10-17.
- Kang, C., O. Darwish, A. Geretz, R. Shahan, N. Alkharouf y Z. Liu. 2013. Genome-Scale Transcriptomic Insights into Early-Stage Fruit Development in Woodland Strawberry *Fragaria vesca*. *The Plant Cell* 25: 1960-1978.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Nelson, J., P. Quintanilla y C.S.S. Cifuentes. 1998. La caída de flores y frutos en mango (*Mangifera indica* L.) cv Ataulfo y su impacto económico. *Facultad de Ciencias Agrícolas* 2: 14-24.
- O'Neill, S. D. 1997. Pollination Regulation of Flower Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 547-574.
- Pandolfini, T., B. Molesini y A. Spina 2007. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *ScienceDirect* 12: 327-330.
- Pomares-Viciana, 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: 1-14.
- Rodríguez-Robles J.A., E. J. Melendez y J. D. Ackerman. 1992. Effects of Display Size, Flowering Phenology and Nectar Availability on Effective Visitation Frequency in *Comporettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 79: 1009-1017.
- Salazar, R. V. M., E.Z. Sandoval, C. V. H. Granados, Y. R. Cruz, B.E. C. Herrera, J. E. C. Campos. 2016. Descripción estructural y funcional de caída prematura de frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad* 9: 17-18.
- Shin, S., J. Lee, D. Rudell, K. Evans, y Y. Zhu. 2016. Transcriptional regulation of auxin metabolism and ethylene biosynthesis activation during apple (*Malus domestica*) fruit maturation. *Journal of Plant Growth Regulation* 35: 655-666.
- Si-Bei L., X. Zong-Zhou, H. Chun-Gen y Z. Jin-Zhi. 2016. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-7.