

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO  
DE PLANTAS**



**"REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE YEMAS FLORALES EN  
TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet) POR RNA-SEQ"**

**Presentada por:**

**CYNTHIA CATHERYNE RAMOS OTINIANO**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN MEJORAMIENTO GENÉTICO  
DE PLANTAS**

**Lima – Perú**

**2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE  
PLANTAS**

**"REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE YEMAS FLORALES EN  
TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet) POR RNA-SEQ"**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**CYNTHIA CATHERYNE RAMOS OTINIANO**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

---

**M.Sc. Ricardo Sevilla Panizo  
PRESIDENTE**

---

**Dr. Jorge Jimenéz Dávalos  
ASESOR**

---

**Dr. Gastón Zolla Benites  
CO-ASESOR**

---

**Mg.Sc. Rolando Egúsquiza Bayona  
MIEMBRO**

---

**Mg.Sc. Amelia Huaranga Joaquin  
MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

Es para mí una gran satisfacción poder dedicar esta tesis con todo mi corazón a mis padres, Lucy y Alejandro, pues sin ellos no lo habría logrado. Su bendición a diario a lo largo de toda mi vida me protege y me lleva por el camino del bien.

A mis hermanos Karen, Diego y Flor por estar siempre a mi lado y apoyar mis decisiones.

A mis abuelos, que desde el cielo me acompañan y que se convirtieron en mis ángeles. Los tengo siempre presente.

A Manuel Hidalgo, por brindarme su apoyo incondicional y enseñarme que con esfuerzo y perseverancia todo lo podemos lograr juntos.

A mis dos grandes amores Sofia Cristal y Daniel Alejandro, ustedes llegaron a mi vida para hacerla plena.

Y sin dejar atrás a toda mi familia, por confiar en mi y por permitirme ser parte de su orgullo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi enorme gratitud y reconocimiento:

A mi Asesor Ph. D. Jorge Jiménez y Co-asesor Ph. D. Gastón Zolla, por su asesoría, sabios consejos y haber brindado el ambiente necesario para realizar el presente trabajo de investigación.

A Innovate Peru-UNALM, convenio 451-PNICP-BRI-2014 por el financiamiento de este proyecto.

A los Miembros del Jurado Mg.Sc. Ricardo Sevilla Panizo, Mg.Sc. Rolando Egúsquiza y Mg.Sc. Amelia W. Huaranga Joaquín, por su gentileza y los conocimientos impartidos en la mejora de la tesis.

A la Estación Experimental Agraria Santa Ana – Huancayo del Instituto Nacional de Innovación Agraria, por proporcionar el material genético.

A todos los integrantes del Laboratorio del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales y Granos Nativos, por hacer del laboratorio un segundo hogar.

A la maestra Mercedes Chaman, por haber contribuido en mi preparación para la evaluación de la parte fisiológica.

¡Muchas gracias a todos!

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. TARWI .....	4
2.1.1. Origen .....	4
2.1.2. Taxonomía .....	5
2.1.3. Descripción botánica .....	6
2.2. FLORACIÓN .....	9
2.2.1. Inicio de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
2.2.2. Los genes integradores florales .....	18
2.2.3. Los genes de identidad del meristemo apical .....	19
2.2.4. Control genético de identidad de los órganos florales .....	21
2.3. FLORACIÓN EN LEGUMINOSAS .....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
3.1. Localización del experimento .....	26
3.2. Material vegetal .....	26
3.3. Caracterización morfométrica de las yemas florales .....	28
3.4. RNA-seq de novo de las yemas florales terminales .....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
4.1. SELECCIÓN DE LA ACCESIÓN PROMISORIA .....	32
4.2. CALIDAD DE SEMILLAS .....	35
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS YEMAS FLORALES .....	37
4.4. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LAS YEMAS FLORALES .....	40
V. CONCLUSIONES .....	58
VI. RECOMENDACIONES .....	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
VIII. ANEXOS .....	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Estadísticas de Ensamblaje y Filtrado del transcriptoma de <i>Lupinus mutabilis</i> . .....	41
Cuadro 2: Genes diferencialmente expresados en las yemas florales de <i>Lupinus mutabilis</i> . .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo vegetativo y reproductivo en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
Figura 2. Representación esquemática del desarrollo floral en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
Figura 3. Rutas que controlan el inicio de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	13
Figura 4. Esquema general del Modelo ABC en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
Figura 5: Diagrama de flujo del análisis de ARN-seq de novo .....	31
Figura 6. Acciones de tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) del Banco de Germoplasma de INIA-Huancayo .....	34
Figura 7. Caracterización de la acción P11 y de la variedad Andenes .....	36
Figura 8. Caracterización morfológica de las yemas florales de tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) .....	39
Figura 9: Enriquecimiento de ontología génica de los genes diferencialmente expresados relacionados a Proceso Biológico, Componente Celular y Función Molecular ....	43
Figura 10: Clasificación de genes según KEGG .....	44
Figura 11. Valores de expresión de genes diferencialmente expresados en E4 y E6 del desarrollo de la inflorescencia en tarwi .....	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos de Pasaporte de las accesiones de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (tarwi) del Banco de Germoplasma del INIA-Santa Ana .....	79
Anexo 2. Evaluación de la integridad del ARN extraído en gel de agarosa.....	80
Anexo 3. Resultados de Control de Calidad del ARN por Macrogen.....	81
Anexo 4. Estadísticas de los datos en crudo por Macrogen.....	83

## RESUMEN

El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), tiene importancia económica por su alto contenido de macro y micronutrientes. La producción de semilla depende de la floración, por lo que es esencial conocer los mecanismos de regulación genéticos. El objetivo de esta investigación fue analizar los cambios en la expresión génica en tarwi durante el crecimiento de las yemas florales por RNA-seq. Se realizó selección por precocidad, peso de 100 semillas, sobrevivencia a estrés hídrico, contenido de microelementos y proteínas solubles totales, determinándose alto potencial en la accesión P11. El secuenciamiento Illumina y análisis bioinformático mostró 2340 genes diferencialmente expresados (DEGs), con 1443 genes sobreexpresados, y 897 subexpresados. La ontología génica mostró 584 genes sobreexpresados y 84 subexpresados relacionados con proceso biológico; 782 genes estuvieron sobreexpresados y 228 subexpresados en componente celular; 877 genes sobreexpresados y 156 subexpresados se encontraron en función molecular. En el análisis de rutas metabólicas, la biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de fenolpropanoides, e interconversión de pentosas y glucuronato se activaron durante el desarrollo de la inflorescencia. Los DEGs más importantes en el desarrollo de la inflorescencia en tarwi fueron factor de transcripción IIIA, diana de monópteros 6, AGAMOUS-LIKE30. Este estudio proporcionó las bases para comprender los mecanismos genéticos que regulan el crecimiento y desarrollo de la inflorescencia del tarwi para ser aplicados en programas de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** Yemas florales, tarwi, *RNA-seq*, factores de transcripción, *familia de dedos de zinc tipo GATA*, *diana de monópteros 6*, *AGAMOUS-LIKE30*.

## ABSTRACT

Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) is important for its high macro and micronutrients. Seed production depends on flowering; thus, it is essential to understand the genetic mechanisms of regulation. The objective of this research was to analyze changes in genetic expression in tarwi during the growth of flower buds, by RNA-seq. Selection by precocity, 100-seed weight, water stress survival, microelements and total soluble protein contents determined the high potential of accession P11. Illumina sequencing and bioinformatic analysis showed 2340 differentially expressed genes (DEGs) with 1443 upregulated genes and 897 downregulated ones. Gen ontology showed 584 upregulated genes and 84 downregulated genes related to biological process; 782 genes were upregulated and 228 downregulated in cellular component; 877 upregulated genes and 156 downregulated genes were found in molecular function. In the metabolic pathways analysis, secondary metabolite biosynthesis, phenolpropanoid biosynthesis and pentose and glucuronate interconversions were activated during flower development. The most important DEGs in tarwi flower development were transcription factor IIIA, target of monoptera 6 and AGAMOUS-LIKE30. This study provided the basis to understand the genetic mechanisms that regulated flower bud growth and development in tarwi, to be applied in tarwi improvement programs.

**Keywords:** Flower buds, tarwi, RNA seq, transcription factors, GATA Zinc finger family protein, target of MONOPTEROS 6, AGAMOUS-LIKE30.

## I. INTRODUCCIÓN

El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), es una leguminosa nativa de los Andes que fue domesticada y cultivada desde épocas preincaicas (INIAP 1997; Mujica 1990). Este cultivo es muy importante debido a la elevada concentración de proteínas (41 a 51 por ciento), aceites (14 a 24 por ciento), fibra cruda (7.65 por ciento), cenizas (4.14 por ciento), carbohidratos (35.77 por ciento), vitaminas y minerales, como hierro y zinc (36 y 40 mg/kg de Zn y Fe), respectivamente) que contienen sus semillas, siendo un excelente alimento para la población (Camarena *et al.* 2012, Castañeda *et al.* 2008); sin embargo, las semillas de tarwi requieren un tratamiento previo a su consumo para eliminar las sustancias antinutricionales que contiene, tales como los alcaloides. Se han reportado la existencia de diferentes tipos de alcaloides quinolizidínicos presentes en las semillas entre los que destacan: esparteína, lupinina y lupanina; los cuales se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de animales. Asimismo, se ha encontrado correlación positiva entre el contenido de proteínas y alcaloides; y correlación negativa, entre proteínas y aceites (Ruiz y Sotelo 2001).

El tarwi se cultiva en las zonas templadas y frías del Altiplano, en valles interandinos de 2.000-3.850 m.s.n.m. En cuanto a la precipitación pluvial, sus requerimientos se sitúan en 350-850 mm. Es susceptible al exceso de humedad y moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado. No tolera las heladas en las fases iniciales y en la formación de vainas, aunque algunos ecotipos cultivados en el Altiplano y a orillas del Lago Titicaca tienen mayor resistencia al frío (Proaño 2011). No obstante, se ha encontrado resistencia a diversos factores adversos en las zonas donde se siembra. Por ejemplo, Jacobsen y Mujica en el 2006 reportan el cultivo tarwi a nivel del mar con buenos rendimientos productivos (800-2.736 kg/ha).

La floración en las leguminosas es un proceso muy importante que ha permitido la expansión y mejoramiento de estos cultivos. El tarwi, es un claro ejemplo de una agricultura dependiente de las angiospermas, comúnmente llamadas plantas con flores, en dónde la época de floración permite alcanzar el óptimo rendimiento y la manipulación de ésta característica proporciona ventajas comparativas tales como: a) el incremento de

los nichos donde se puede cultivar un determinado genotipo (Mujica 1994; Taiz y Zeiger 2006; Petterson 1997), b) la reducción del riesgo por heladas, sequía y enfermedades (Major *et al.* 1975; Marschner 2007) y c) el incremento de los ciclos de cultivo (Amasino 2005).

En la actualidad, los recientes avances en la genómica han acelerado el proceso de la identificación de genes y el análisis funcional, y han abierto nuevas perspectivas del conocimiento molecular en el proceso de la floración en *Pisum sativum* y en *Glycine max* (Weller y Ortega 2015). No obstante, la información sobre los mecanismos genéticos que regulan la floración en tarwi es muy escasa. Algunos estudios en *Lupinus angustifolius* y *Lupinus pilosus*, demuestran que el proceso de regulación en la floración está controlado principalmente por las rutas del fotoperiodo y la vernalización (Rahman y Gladstones 1974). Además, se ha reportado que la precocidad en la floración responde a un carácter recesivo y que, en una floración tardía, como en el genotipo Inti (*Lupinus sp.*), depende más de la vernalización (Clements *et al.* 2008) y de una respuesta a fotoperiodo de día neutro (Hackbarth 1936).

Una técnica moderna empleada en el análisis de expresión genética, es el Secuenciamiento de ARN (RNA-Seq). El RNA-Seq utiliza la tecnología de Secuenciación de la Próxima Generación (NGS) para construir un mapa transcriptómico completo, permitiendo la identificación y cuantificación de miles de genes a la vez, sin la necesidad de conocerlos a priori (Nagalakshmi *et al.* 2010). El secuenciamiento de una parte del genoma de *Lupinus albus* y *Lupinus luteus*, abre la oportunidad de estudiar a *Lupinus mutabilis* Sweet (Oumer *et al.* 2015; Parra-González *et al.* 2012). La importancia del estudio de la regulación del crecimiento de yemas florales en tarwi, radica en que los altos rendimientos en la producción de semillas de calidad dependen de la floración, y que el desarrollo de las yemas florales a ese nivel es crítico. Diversos estudios particularmente en *Arabidopsis thaliana*, han puesto de manifiesto la complejidad genética de la floración.

La floración es controlada por múltiples vías influenciadas por el ambiente en el que la planta se cultiva, así como el estado de desarrollo de la planta (Amasino 1996). Además, se han reportado genes que codifican factores de transcripción, encargados del control de la expresión de otros genes cuyos productos tienen funciones únicas en los órganos

florales (Tofino *et al.* 2010). Sin embargo, se encuentra muy poca información sobre los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo de la inflorescencia. Por este motivo, es fundamental el conocimiento de las bases moleculares que comprenden dicho proceso.

Por lo expuesto anteriormente, los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes: a) Seleccionar la accesión de alto potencial en base a precocidad, peso de 100 semillas, porcentaje de sobrevivencia al estrés hídrico, tamaño de semillas, contenido de microelementos (Zn, Mn, Fe) y proteínas solubles totales; b) Caracterizar los estadios de desarrollo de las yemas florales terminales en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet); c) Evaluar los perfiles transcriptómicos de las yemas florales terminales en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet); d) Evaluar las Rutas Metabólicas según KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) en tarwi; e) Identificar los genes diferencialmente expresados (sobreexpresados y subexpresados) en el desarrollo de la inflorescencia en tarwi.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. TARWI

#### 2.1.1. Origen

Gross (1982), menciona que existen dos grandes regiones genéticas para el género *Lupinus*. Una de ellas, se extiende en el área del Mediterráneo, desde el Sur de Europa hasta África central y las alturas de Etiopía. La segunda región, abarca todo el continente americano, exceptuando únicamente las húmedas llanuras tropicales de la cuenca del Amazonas. Las plantas del género *Lupinus* fueron domesticadas tanto en el viejo como en el nuevo mundo. Según Jacobsen y Mujica (2006), el origen de estas especies se sitúa en dos centros: el centro mediterráneo y el andino. Este género comprende más de 300 especies, pero solo cuatro son de gran importancia para la agricultura: *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus luteus* en el viejo mundo y *Lupinus mutabilis* en América (Camarena *et al.* 2012).

El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa que se distribuye en diferentes partes del mundo incluyendo América del Sur, Europa y Australia (Coloma 2009; FAO 2010). Pero principalmente en los Valles Interandinos y el Altiplano de Bolivia y Perú. Su centro de origen está ubicado en los Andes Sudamericanos, donde se encuentra la mayor variabilidad genética (Jacobsen y Mujica 2006). Para esta región Drummond *et al.* (2012) reportan 85 especies del género *Lupinus* con un origen estimado en 1.19 a 3.5 millones de años. Estudios recientes utilizando caracteres morfológicos y secuencias de ADN, señalan como probable progenitor de *Lupinus mutabilis* a *Lupinus piurensis* (Eastwood y Hughes 2008).

El tarwi es la única especie andina del género *Lupinus* domesticada y cultivada de Sudamérica, desde hace aproximadamente 2,000 años y probablemente ha sido la fuente para la nutrición proteica del poblador andino (Chirinos 2015). Su contenido proteico en semillas secas oscila entre 40 - 45%, además de otros elementos nutritivos como grasas y carbohidratos, habiéndose determinado también que el aceite de tarwi tiene efectos antioxidantes, dado su contenido en beta carotenos y tocoferol (Msika *et al.* 1998; Lezama 2010).

La semilla de tarwi se ha mantenido de forma tradicional en países como Ecuador, Perú y Bolivia, aunque en la actualidad se han efectuado introducciones en países como Venezuela, Colombia, Chile, Argentina, México y en algunos países de Europa, donde se han obtenido buenos resultados (Junovich 2003). Recientemente, el interés por el tarwi como fuente de alimento ha aumentado en Europa debido a su alta calidad nutritiva, por ser una fuente valiosa de aceites y proteínas, con contenidos de 14 a 24 % y de 41 a 51% respectivamente (Jacobsen y Mujica 2006).

El tarwi se cultiva principalmente entre los 2000 a 3800 m.s.n.m., en climas templado-fríos, tiene un gran potencial no solo para la alimentación humana, sino también para la alimentación de animales (Chirinos 2015). A pesar de su gran valor nutritivo y resistencia a factores climáticos adversos en las zonas donde se siembra, el cultivo y consumo de esta especie está disminuyendo progresivamente en los países andinos debido a la falta de difusión de sus formas de uso y a la promoción de su consumo y cultivo a pesar de su gran valor nutritivo y resistencia a factores adversos climáticos en las zonas donde se siembra (Jacobsen y Mujica 2006). Otro factor que afecta su consumo es el fuerte sabor amargo que caracterizan a sus granos, debido a su alto contenido de alcaloides quinolizidínicos (esparteína, lupinina, lupanina, lupinidina, etc), además de su crecimiento indeterminado (Ortega *et al.* 2010). Por esta razón, se requiere de un proceso de lavado previo a su consumo para eliminar dichas sustancias; esto constituye un factor limitante frente a otras leguminosas (Ruiz y Sotelo 2001).

### **2.1.2. Taxonomía**

La clasificación actual de la planta en estudio se muestra a continuación (Jacobsen y Mujica 2006; Camarena *et al.* 2012):

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Fanerógama
SUBDIVISION	Angiosperma
CLASE	Dicotiledónea
SUBCLASE	Arquiclamideas
ORDEN	Fabales
FAMILIA	Fabaceae
GÉNERO	<i>Lupinus</i>
ESPECIE	<i>mutabilis</i>
NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet
NOMBRE COMÚN	Tarwi, chocho

### 2.1.3. Descripción botánica

El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), es una especie generalmente anual, de crecimiento erecto y que puede alcanzar desde 0.8 hasta más 2 metros en las plantas más altas. Las principales características se presentan a continuación:

#### a) Raíz

Presenta una raíz pivotante, vigorosa, ramificada, y poco leñosa. Presenta múltiples ramificaciones y gran cantidad de raicillas y pelos radicales (Camarena *et al.* 2012). En la raíz se desarrolla un proceso de simbiosis con bacterias nitrificantes que forman nódulos de diferentes tamaños (1 a 3 cm), estos nódulos se localizan principalmente en la raíz primaria por encima de la ramificación radicular, e incluso en las raíces secundarias y se encargan de la fijación del nitrógeno atmosférico a la planta (Tapia 2000). En los suelos donde hay presencia de estas bacterias, la formación de los nódulos comienza a partir del quinto día después de la germinación, al cortarlos presentan una coloración rojiza (Camarena *et al.* 2012). En el Perú, las plantas de tarwi viven generalmente en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género *Rhizobium*. Estas bacterias se alimentan de las sustancias azucaradas cedidas por la planta y son capaces de fijar químicamente el N<sub>2</sub> atmosférico formando con él moléculas orgánicas que brindan a la planta, debido a que esta es incapaz de fijar el nitrógeno libre por sí misma. Estas

simbiosis en las leguminosas juegan un importante papel en el ciclo del Nitrógeno en la Tierra (Barrera 2015).

#### **b) Tallo**

El tallo es totalmente glabro, grueso, leñoso y ramificado (Camarena *et al.* 2012), su interior está formado por un tejido esponjoso con bastantes ramificaciones, cuya altura dependiendo del ecotipo oscila entre 0.5 a 2 m, siendo lo normal que alcance un valor promedio aproximado de 1 m. El color del tallo varía de verde a gris castaño, según el grado de leñosidad que alcance. Si el contenido de antocianina de la planta es alto, el color verde de la clorofila queda cubierto por un intenso azul – rojizo, como es en las especies silvestres (Camarena *et al.* 2012).

Según el tipo de ramificaciones, la planta puede ser de eje central prominente, con ramas desde la mitad de la planta, tipo candelabro, o ramas terminales; o de una ramificación no prominente, desde la base con inflorescencia a la misma altura. El número de ramas varía desde unas pocas hasta 52 ramas. El número de vainas y de ramas fructíferas tiene correlación positiva con una alta producción (Moreno 2008).

#### **c) Hojas**

Las hojas son de forma digitada, generalmente compuesta por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. En la base del pecíolo existen pequeñas hojas estipulares, muchas veces rudimentarias. Se diferencia de otras especies de *Lupinus* porque las hojas presentan poca pubescencia. El color puede variar de amarillo verdoso a verde oscuro, dependiendo del contenido de antocianina (Tapia 2000).

#### **d) Inflorescencia y flor**

La inflorescencia es un racimo terminal con flores dispuestas en forma verticilada. Las flores del tarwi son grandes, presentan una corola grande de 1 a 2 cm de longitud y tiene la forma típica de las papilionáceas, conteniendo en su corola cinco pétalos, uno en el estandarte, dos la quilla y dos las alas. La quilla envuelve al pistilo y a los diez estambres (Almeida 2015).

La coloración de la flor varía entre el inicio de su formación hasta la maduración, desde el blanco, crema, azul, hasta el color purpura; de allí se origina su nombre científico, *Lupinus mutabilis* Sweet, es decir, que cambia. Los colores más comunes son los tonos azul e incluso púrpura y los menos frecuentes el blanco, crema, rosado y amarillo (Chirinos 2015). El tarwi es una especie autógama y de polinización cruzada, logrando un alcance del 40% de alogamia; según las condiciones ecológicas donde se encuentra la planta (Caicedo y Peralta 2001).

#### **e) Fruto**

El fruto, mide entre 7 a 15 cm de largo y entre 1.5 a 2.5cm de ancho; al estado de madurez es una vaina plana y se presenta agudizada en forma curva en los extremos. Además, son pubescentes cuando están verdes y no presentan una dehiscencia marcada. La vaina contiene una a ocho semillas. El número de vainas y de ramas fructíferas tiene correlación positiva con una alta producción (Camarena *et al.* 2012).

#### **f) Semillas**

Las semillas de tarwi son de diferentes formas: redondas, ovaladas o casi cuadrangulares, su tamaño varía entre 0.5 a 1.5 cm, el número de semillas por vaina es de cinco a doce. Un kilogramo tiene entre 3500 a 5000 semillas. La variación en el tamaño de la semilla depende de las condiciones en que desarrolla el cultivo como del ecotipo o variedad (Camarena *et al.* 2012).

La semilla está recubierta por un tegumento endurecido que puede constituir hasta el 10% del peso total. Los colores del grano incluyen blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón ó colores combinados como marmoleado, media luna, ceja y salpicado (Proaño 2011).

## 2.2. FLORACIÓN

La floración es un cambio en el patrón básico de desarrollo del meristemo apical que se produce en respuesta a diferentes estímulos. Turnbull (2011), menciona que el éxito reproductivo de una planta depende de que la inducción floral y posterior floración tenga lugar en el momento más adecuado de su desarrollo y cuando las condiciones ambientales sean favorables. Debido a la falta de movilidad de las plantas y de sus características particulares de desarrollo, éstas han adquirido mecanismos especializados del control de inicio de la floración que aseguren el éxito reproductivo y la persistencia de la especie (Tan y Swain 2006; Windauer 2013).

Según Windauer (2013), se pueden distinguir entre plantas que completan su desarrollo dentro del año, floreciendo sólo una vez durante su ciclo de vida, llamadas plantas anuales y plantas que viven más de un año, tales como las bianuales o perennes. Tan y Swain (2006) reportan que dentro de éstas últimas, hay especies que florecen una sola vez durante su ciclo de vida (especies monocárpicas) y otras que florecen todos los años en forma recurrente (especies policárpicas).

Normalmente la floración es estacional y requiere de cierto grado de desarrollo vegetativo, es decir, madurez para la floración. Así, plantas de la misma especie en un área geográfica determinada, florecen en forma sincronizada para que pueda producirse el intercambio génico entre ellas (Windauer 2013). Por otro lado, el tiempo en que se produce la transición entre crecimiento vegetativo y reproductivo es de vital importancia en la agricultura (Fernandez Nohales 2011). El momento en que ocurre esta transición es uno de los eventos de desarrollo más plásticos en el ciclo de vida de las plantas y es determinante para asegurar que la floración y fructificación ocurran en condiciones favorables (Ausín *et al.* 2005; Mir Moreno 2013).

En sentido fisiológico, se entiende por floración a la inducción y formación de los primordios florales. Factores internos (hormonales y nutricionales) y externos (fotoperíodo, temperatura y vernalización, principalmente) condicionan el control de la inducción floral. Una característica importante de la adaptabilidad de las plantas, reside en su capacidad de acelerar o disminuir la tasa de desarrollo caracterizado por la división,

el alargamiento y la diferenciación celular en función del ambiente (Fernandez Nohales 2011).

Las plantas poseen diferentes estrategias reproductivas y son múltiples las causas que convergen para regular el desarrollo del meristemo apical. Muchas plantas responden al ambiente para controlar el inicio de la floración y producen señales endógenas que regulan su transición, es decir, el cese de la formación de órganos vegetativos u hojas hacia la producción de órganos reproductivos o flores (Tan y Swain 2006; Mir Moreno 2013). En conjunto, los condicionamientos del medio ambiente sobre la dirección del desarrollo de la planta indicarían un alto grado de adaptación de las especies a su entorno mediante una interacción entre distintos receptores de la planta con los factores cambiantes del medio, los niveles hormonales internos, la distribución de asimilados y el programa genético de la planta (Ausín *et al.* 2005).

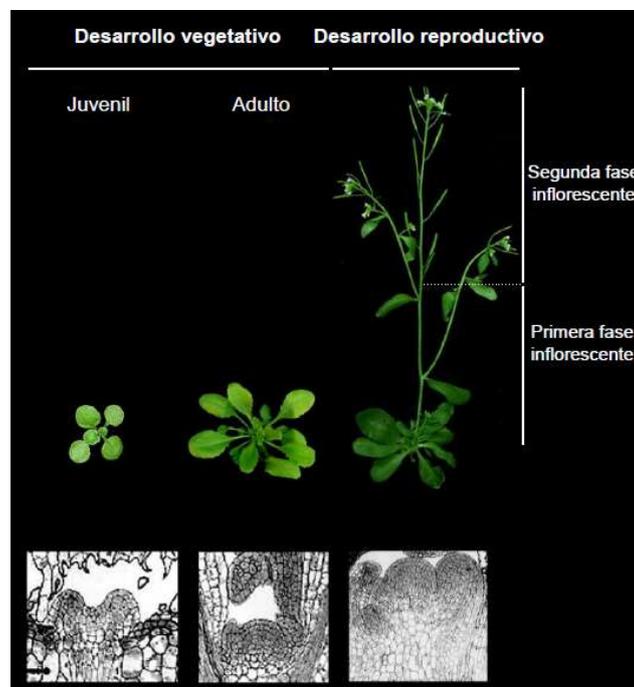
El estudio del inicio de la floración podría no solo enriquecer nuestro conocimiento de este proceso biológico fundamental sino también proporcionar beneficios comerciales prácticos. Por ejemplo, la manipulación de un gen que promueve la floración conduce a la floración en el primer año en un cítrico híbrido, conocido como citrange, el cual normalmente necesita de cinco a 7 años para florecer (Behailu 2008).

### **2.2.1. El inicio de floración en *Arabidopsis thaliana***

Berbel (2005) y Behailu (2008) mencionan que el inicio de la floración es generalmente definido como la transición de la fase de desarrollo vegetativo a la fase reproductiva. El éxito reproductivo de las plantas depende directamente del momento en el que se produce la transición floral, que determina que la producción de semillas tenga lugar en la estación adecuada del año. Por ello, existen mecanismos precisos de control del inicio de este proceso (Ausin *et al.* 2005; Sanchez *et al.* 2008; Mir Moreno 2013). Este proceso involucra un cambio en la identidad del meristemo apical de forma que da lugar a la formación de flores en lugar de las hojas y se encuentra regulado por un complejo circuito que integra señales de desarrollo internos o señales ambientales externas, o ambas (Berbel 2005; Taiz y Zeiger 2006; Behailu 2008).

Durante el ciclo de vida de la planta, el meristemo apical del tallo atraviesa dos fases marcadas de desarrollo, la fase vegetativa y la reproductiva (Taiz y Zeiger 2006). Durante la fase vegetativa, el meristemo apical del tallo es un meristemo que produce órganos vegetativos, típicamente hojas con meristemos axilares en sus flancos. Posteriormente, al percibir las correspondientes señales ambientales y endógenas, ocurre la transición a la fase reproductiva, y el meristemo apical del tallo adquiere una identidad inflorescente (Irish 2010). El meristemo apical del tallo con identidad inflorescente dará lugar a la inflorescencia, la parte de la planta donde se localizan las flores (Berbel 2005; Irish 2010).

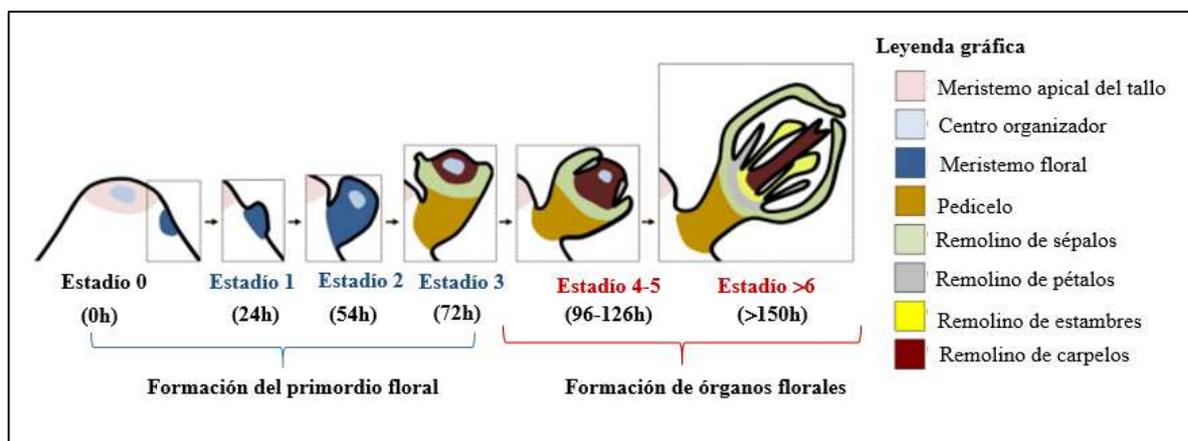
El desarrollo vegetativo en *Arabidopsis* presenta a su vez dos fases conocidas como juvenil y adulta (Figura 1). Estas fases se diferencian por la forma del meristemo, que en la fase vegetativa juvenil es aplanado y en la fase vegetativa adulta es ligeramente convexo; otra diferencia es la disposición y morfología de las hojas. La floración en *Arabidopsis* sólo ocurre en la fase vegetativa adulta, independientemente de que en la fase vegetativa juvenil se den las condiciones ambientales adecuadas y desarrollando dos fases inflorescentes (Berbel 2005).



**Figura 1. Desarrollo vegetativo y reproductivo en *Arabidopsis thaliana*.**

Fuente: Berbel (2005)

Los estadios del desarrollo floral en *Arabidopsis* están asociadas a cambios en la morfología del meristemo apical del tallo (Figura 2). El desarrollo temprano de la flor de *Arabidopsis thaliana* se describe desde la iniciación hasta la apertura de la yema y la aparición de flores en los flancos del meristema apical del tallo sigue un patrón preciso. Las horas indican aproximadamente la edad de la flor al final de un estadio determinado. El brote floral emerge en los flancos del meristema apical del tallo o estadio 0. El crecimiento del brote durante los estadios 1-3 permite establecer un centro organizador de meristemas en el estadio 2. En estadios tempranos se adquiere la identidad floral, lo que conduce a la definición de los verticilos de órganos florales, comenzando con la proliferación de sépalos en el estadio 3. El centro organizador finalmente desaparece en el estadio 6, una vez que todos los órganos florales han sido iniciados y el pedicelo ha comenzado a expandirse.



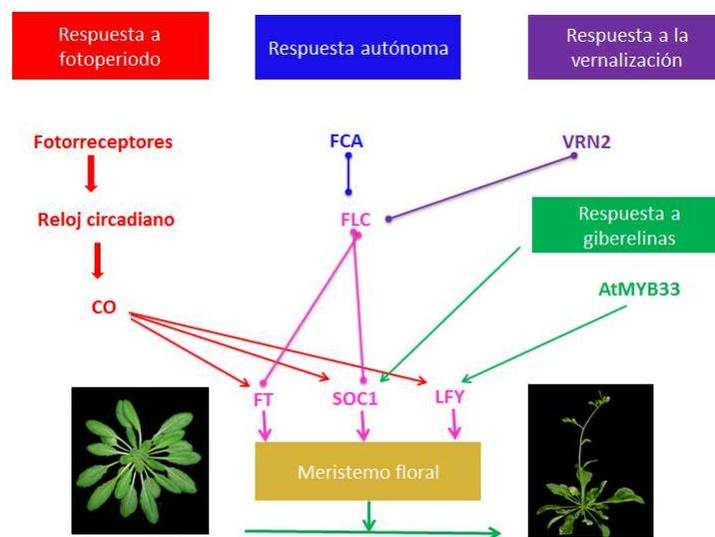
**Figura 2. Representación esquemática del desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana*.**

Fuente: Denay *et al.* (2016)

En *Arabidopsis*, el proceso de la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva del desarrollo está regulada por una compleja red de rutas genéticas que integran información procedente del ambiente y de factores endógenos de la planta. Debido a ello, factores tales como, la longitud del día, la vernalización (tratamiento en frío), hormonas, factores endógenos (la edad), la calidad y la intensidad de la luz (longitud de onda), la temperatura, la nutrición, la disponibilidad de agua, y estreses bióticos y abióticos pueden influir en la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva (Berbel 2005; Taiz y Zeiger 2006; Behailu 2008; Sanchez *et al.* 2008; Mir Moreno 2013). Las interacciones de estos factores externos y endógenos permiten a las plantas a sincronizar su desarrollo reproductivo con el medio ambiente (Behailu 2008).

El proceso de transición floral (Figura 3) ha sido bien estudiado a nivel molecular en *Arabidopsis thaliana* durante las últimas décadas, conociéndose actualmente un gran número de genes responsables, así como el mecanismo de acción de muchas de las proteínas que codifican y regulan el tiempo de floración, y la mayoría de ellos han sido asignados a cuatro rutas genéticas de floración (Mouradov *et al.* 2002; Behailu 2008; Mir Moreno 2013): a) la ruta del fotoperiodo; b) la ruta de la vernalización que promueve la floración en respuesta a baja temperatura; c) la ruta de las giberelinas (GA) la cual promueve la floración en condiciones no inductivas, como los días cortos; y d) la ruta autónoma que promueve la floración en respuesta a factores internos producidos como la edad de la planta (Behailu 2008; Amasino 2010).

Al final, estas cuatro rutas convergen en la regulación transcripcional de un conjunto de genes integradores florales que permiten la integración de las diferentes señales externas e internas para garantizar la floración en el momento apropiado. Estos genes, a su vez, regulan la actividad de los genes de identidad del meristemo floral necesarios para la transición y el desarrollo floral (Behailu 2008; Fernandez Nohales 2011; Mir Moreno 2013; Windauer 2013).



**Figura 3. Rutas que controlan el inicio de la floración en *Arabidopsis thaliana*.**

Fuente: Behailu (2008)

### a) La ruta del fotoperiodo

La regulación de la transición floral mediada por el fotoperiodo garantiza a las plantas la formación de los órganos florales en las condiciones más apropiadas para cada especie. Franklin *et al.* (2005) mencionan que las plantas que florecen en primavera son capaces de percibir un alargamiento paulatino del día, momento a partir del cual activan la formación de flores (plantas de día largo, DL), mientras que en las plantas cuya floración tiene lugar en otoño, la transición floral se produce cuando el número de horas de luz en el ciclo diario se reduce (plantas de día corto, DC). Un tercer grupo de plantas atendiendo a los requerimientos de fotoperiodo para la floración son las plantas de día neutro, las cuales florecen independientemente del número de horas de luz diarias (Mir Moreno 2013).

*Arabidopsis thaliana* es una planta facultativa de días largos, es decir, florece en condiciones normales cuando el número de horas de luz a lo largo del día supera un determinado umbral (DL), pero es capaz de florecer si el número de horas de luz está por debajo de dicho umbral (DC), si bien lo hace más tardíamente (Behailu 2008; Mir Moreno 2013). El uso de esta especie modelo ha permitido elucidar en gran parte los mecanismos moleculares por medio de los cuales la planta percibe el fotoperiodo, así como la direccionalidad y la calidad de la luz ambiental, y cómo esta información es transmitida a genes relacionados con la activación de la transición floral (Franklin *et al.* 2005).

La ruta responsable de la inducción de la floración por fotoperiodo comienza por la percepción de la luz en al menos cinco regiones del espectro visible, a través de distintos tipos de fotorreceptores. En *Arabidopsis thaliana*, se han analizado con detalle dos tipos de fotorreceptores. De acuerdo a Berbel (2005) y Mir Moreno (2013), el primer tipo lo constituyen los criptocromos, que son flavoproteínas que funcionan como receptores de luz azul; se conocen dos genes que codifican para criptocromos, *CRYPTOCROME 1 (CRY1)* y *CRYPTOCROME 2 (CRY2)*. El segundo tipo de fotorreceptores, los fitocromos, son codificados por cinco genes en *Arabidopsis (PHYTOCHROME, PHYA-E)*. Según Berbel (2005), cada uno de los fitocromos existe en dos formas distintas; la forma Pr es convertida a Pfr por exposición de las plantas a luz roja (R), y la reacción inversa ocurre en luz roja lejana (FR).

En *Arabidopsis*, la inducción floral se inhibe con luz roja y se promueve con luz roja lejana (Martínez-Zapater *et al.* 1994). El fenotipo de los mutantes *phyB* sugiere que *PHYB* juega un papel inhibitor de la floración bajo condiciones de alta R/FR pero no está implicado en la percepción de la longitud del día. Por el contrario, *PHYA* está implicado tanto en la percepción de la longitud del día como en la promoción de la floración por fotoperiodos inductivos (Berbel 2005; Mir Moreno 2013).

El reloj circadiano es mecanismo endógeno por el cual las plantas midan la duración del fotoperiodo para el control del tiempo de floración (Sanchez *et al.* 2008). El reloj circadiano, que controla los ritmos diarios en la expresión génica y diversos patrones cíclicos de comportamiento, tal como el movimiento de las hojas, se ha propuesto que actúa como medidor en la respuesta fotoperiódica (Samach y Coupland 2000; Berbel 2005). Los fotorreceptores estarían controlando el acoplamiento del reloj circadiano y los ciclos diarios de luz y oscuridad, captando información asociada a la calidad y cantidad de luz ambiental y generando señales que interaccionan con los componentes del oscilador central del reloj circadiano, tales como *EARLY FLOWERING3 (ELF3)*, *TIMING OF CAB1 (TOC1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1)*, *ZEITLUPE (ZTL)* (Nelson *et al.* 2000; Berbel 2005; Sanchez *et al.* 2008; Mir Moreno 2013).

Se ha demostrado que el reloj circadiano regula la expresión de *GIGANTEA (GI)* y *CONSTANS (CO)*. El gen *GI* codifica una proteína con posibles dominios transmembrana y *CO* codifica un factor de transcripción con dos dedos de zinc relacionado con la familia de factores de tipo GATA (Sanchez *et al.* 2008). Se han propuesto dos modelos fisiológicos para explicar cómo se mide la longitud del día en el control de respuestas de desarrollo, tales como la floración (Samach y Coupland 2000). El modelo de la coincidencia externa propone que el tiempo de coincidencia entre la exposición a luz (señal externa) y una fase circadiana interna promueve la floración en plantas de día largo como *Arabidopsis*. El modelo de la coincidencia interna, propone que la coincidencia de dos ritmos circadianos es lo que promueve la floración bajo condiciones inductivas. Resultados recientes que muestran que la expresión de *CO*, un gen que acelera la floración en respuesta a día largo está regulada por el reloj circadiano y la longitud del día y que la expresión de *FLOWERING LOCUS T (FT)* un gen diana de *CO*, *FT* viaja desde las hojas,

a través del floema (Mathieu *et al.* 2007; Behailu 2008), hasta el meristemo apical donde ejerce su acción inductora de la transición floral, apoyando el primer modelo (Suárez-López *et al.* 2001; Berbel 2005).

### **b) La ruta de la vernalización**

La vernalización es un proceso que consiste en la activación de la transición floral por la exposición de las plantas a bajas temperaturas durante un periodo de tiempo relativamente largo (Behailu 2008) Para las especies anuales de invierno y bianuales el requerimiento de vernalización asegura una floración en primavera después de las bajas temperaturas invernales (Mir Moreno 2013).

Según Behailu en el 2008, los análisis genéticos han detectado dos loci con efectos cualitativos, *FRIGIDA (FRI)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Ambos loci se han aislado a nivel molecular, mostrando que *FRI* codifica una proteína sin homología a otras proteínas conocidas mientras que *FLC* codifica un factor de transcripción con un dominio MADS. El análisis molecular de estos dos genes indica que *FRI* regula positivamente la expresión de *FLC*, mientras que *FLC* reprime la expresión de los integradores florales *SOCI* (Sanchez *et al.* 2008). *FLC* juega un papel clave en la ruta de vernalización pues la exposición a temperaturas bajas tiene como efecto la represión de su expresión. Se ha demostrado que la reducción de los niveles de mRNA de *FLC* es proporcional a la duración del tratamiento de vernalización hasta que se alcanza un nivel de saturación (Sheldon *et al.* 2008; Sanchez *et al.* 2008; Behailu 2008).

En *Arabidopsis*, la vernalización provoca una bajada de los niveles de transcrito de *FLC* que está regulada por cambios epigenéticos a nivel de la cromatina. Así, la exposición a periodos de bajas temperaturas provoca una metilación de histonas H3 en las lisinas 9 (H3K9) y 27 (H3K27) que actúan reprimiendo la expresión de *FLC*, y favorecen por tanto la transición floral (Tofiño *et al.* 2010; Amasino y Michaels 2010; Mir Moreno 2013). Según Kim *et al.* (2005), esta metilación está mediada por la actividad de complejos PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). En *Arabidopsis* se han descrito los genes *VERNALIZATION 2 (VRN2)* y *VERNALIZATION 1 (VRN1)* como componentes de este tipo de complejos (Fernandez-Nohales 2011; Mir Moreno 2013).

### **c) La ruta de las giberelinas**

Las giberelinas tienen un papel importante en la transición floral de *Arabidopsis*, fundamentalmente en condiciones no inductoras de día corto (Behailu 2008; Fernandez Nohales 2011; Mir Moreno 2013). Así en día corto, las giberelinas inducen la floración a través de dos mecanismos independientes de *FLOWERING LOCUS T (FT)*, por un lado, activando a *LEAFY (LFY)* y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)* (Blazquez *et al.* 1998; Mouradov *et al.* 2002; Behailu 2008) y, por otro lado, reduciendo la acción negativa del complejo FLC/SVP al reprimir la expresión de *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (Li *et al.* 2008).

Muchos genes involucrados en la biosíntesis de *GIBERELINAS (GA)* tales como *GAI*, *GA4* and *GA5* y en la señalización de GA tales como *GAI*, *RGA* y *RGL1*, han sido identificados como reguladores del tiempo de floración en la ruta de las giberelinas (Behailu 2008). Además, recientemente se ha visto que las giberelinas inducen la expresión de *FT* en condiciones de días largos de forma independiente de CO (Hisamatsu y King 2008), aunque en estas condiciones su papel en la transición floral es secundario (Fernandez Nohales,2011).

### **d) La ruta autónoma**

La ruta autónoma confiere a la planta la capacidad de florecer independientemente de las condiciones ambientales (Komeda 2004; Berbel 2005; Behailu 2008; Fernandez Nohales 2011). Esta ruta es compleja y está formada por al menos dos mecanismos distintos que promueven la floración de manera independiente. Por un lado, la ruta autónoma clásica la integran una serie de genes, como *FCA* y *FVE*, relacionados, respectivamente, con el metabolismo de RNAs y la modificación de la cromatina, que en última instancia reprimen a *FLC* (Amasino y Michaels 2010; Fernandez Nohales 2011; Mir Moreno 2013).

Esta ruta, aunque presente en *Arabidopsis*, no se da en todas las plantas (Amasino 2010) y en *Arabidopsis* también parece implicada en la percepción de la temperatura ambiental (Kumar y Wigge 2010). Por otro lado, la variante moderna de la ruta autónoma está relacionada con la capacidad para florecer según la edad de la planta y en *Arabidopsis*

implica a los microRNAs codificados por los genes *MIR156* y *MIR172*, así como a los factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL)* y *APETALA 2 (AP2)* (Fernandez Nohales 2011; Zambrano 2013).

### 2.2.2. Los genes integradores florales

Todas las rutas mencionadas convergen en la regulación de la expresión de los genes integradores florales (Behailu 2008). Estos son los que recogen la información recibida por las distintas rutas inductoras de la floración y desencadenan la transición floral, activando la expresión de los genes de identidad del meristemo floral. Por lo tanto, estos genes deben ser considerados como promotores de la transición y las alteraciones en su función se manifiestan en retraso o adelanto en el inicio de la floración (Fernandez Nohales 2011).

Los genes integradores que promueven la transición floral son básicamente cuatro: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPRESOR OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)* y *LEAFY (LFY)*. De los niveles de expresión de estos integradores depende el momento exacto en el que se produce la transición floral (Lee y Lee 2010, Lázaro 2011; Zambrano 2013).

El inductor floral *FT* se expresa en el tejido vascular de las hojas en respuesta al fotoperiodo (Yamaguchi *et al.* 2005; Lázaro 2011; Zambrano 2013). La proteína *FT* se mueve a través del floema hasta el meristemo apical y activa la expresión de *SOC1* y los genes de identidad de meristemo floral, e induce la transición floral bajo las condiciones ambientales adecuadas. Además, es reprimido por el heterodímero formado por *SVP* y *FLC*. De esta manera, *FT* integra toda la información proveniente de cuatro rutas que inducen la floración en *Arabidopsis*: fotoperiodo, autónoma, vernalización y giberelinas (Blázquez y Weigel 2000; Lázaro 2011).

Por su parte, *SOC1* es un factor de transcripción tipo MADS box cuya expresión está regulada por todas las rutas inductoras de la floración. Inicialmente, *SOC1* fue identificado como un mediador de las señales que promueven la floración procedente de las rutas del fotoperiodo, autónoma y de la vernalización (Zambrano 2013). Así, tanto *CO*, vía *FT*, como *FLC* regulan la expresión de *SOC1* mediante la interacción con

diferentes regiones de su promotor (Yoo *et al.* 2005; Li *et al.* 2008). Además, la expresión de *SOCI* es reprimida por *APETALA 2 (AP2)* y regulada por la ruta de los miRNAs 156 y 172, así como por las familias de factores de transcripción *SPL* y *AP2* (Yant *et al.* 2010). Por otra parte, *SOCI* percibe información que procede de la ruta de las giberelinas (Lázaro 2011). En resumen, *SOCI* integra información de varias rutas, siendo un regulador clave de la transición floral.

La expresión de *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*, que codifica un factor de transcripcional de la familia MADS, es inducida por la ruta del fotoperiodo, por una vía independiente de *FT*, y por la vernalización, por una vía independiente de *FLC*, y como consecuencia, la expresión de *AGL24* aumenta gradualmente en el meristemo apical durante la transición floral (Zambrano 2013). De este modo, *AGL24* actúa junto con otros genes como conector de las diferentes rutas que inducen la floración.

Tras la transición floral, *AGL24* y *SOCI* forman un complejo activando mutuamente su expresión en el ápice (Liu *et al.* 2008; Zambrano 2013). Este complejo formado por *AGL24* y *SOCI* induce la expresión del gen *LFY* en el meristemo floral y, por otra parte, en día corto media el efecto de las giberelinas en la floración (Lee y Lee 2010). De esta manera, la actividad de ambos genes en conjunto, promueve la formación de flores en los flancos del meristemo apical, una vez percibidas las señales apropiadas.

Los represores florales *FLC* y *SVP* representan un último punto de conexión entre las rutas que inducen la floración, siendo inhibida su expresión por la actividad de las rutas autónoma y de vernalización. Como se ha descrito anteriormente, las giberelinas también regulan a *SVP*, provocando una reducción de su transcripción en día corto (Li *et al.* 2008; Lázaro 2011; Zambrano 2013).

### **2.2.3. Los genes de identidad del meristemo floral**

Como se ha descrito anteriormente, las rutas inductoras de la floración actúan como sensores del momento en el que las condiciones ambientales y endógenas de la planta son las apropiadas para llevar a cabo la transición floral. William *et al.* (2004) reportan que la información es transmitida a todos los genes integradores florales y estos actúan sobre los genes de identidad de meristemo floral, que desencadenan un nuevo programa de

desarrollo que conduce a la formación de las flores. Los genes de identidad del meristemo floral se expresan en los flancos del meristemo apical del tallo y confieren identidad floral al primordio lateral que se forma (Irish 2010). Para ello, activan y controlan la expresión de los genes homeóticos florales, que finalmente son los encargados de dirigir la formación de los órganos de la flor. En *Arabidopsis* los principales genes de identidad del meristemo floral son: *LEAFY (LFY)*, *APETALA 1 (API)* y *CAULIFLOWER (CAL)* (William *et al.* 2004).

El gen *LFY* codifica un factor de transcripción exclusivo del reino vegetal, presente desde los musgos a las eudicotiledóneas (Maizel *et al.* 2005; Zambrano 2013). Durante el desarrollo de la inflorescencia, *LFY* se expresa fuertemente en los primordios laterales del SAM, especificando la identidad floral de los mismos ya que activa la expresión de otros genes de identidad del meristemo floral como *API* y *CAL* (Wagner *et al.* 1999; William *et al.* 2004; Fernandez Nohales 2011). En estadios posteriores del desarrollo floral, *LFY*, junto con el cofactor *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* también interviene en la regulación de genes homeóticos florales como *APETALA 3 (AP3)*, *PISTILLATA (PI)* y *AGAMOUS (AG)* (Irish 2010).

Los genes *API* y *CAL* codifican factores de transcripción de la familia MADS con funciones redundantes (Mandel *et al.* 1992; Kempin *et al.* 1995). *API* y *CAL*, además de ser activados por *LFY* en el meristemo floral, a su vez mantienen inducida la expresión de *LFY* en el mismo (Kaufmann *et al.* 2010; Zambrano 2013), asegurando el mantenimiento de la identidad del meristemo floral y evitando su reversión a inflorescencia. Posteriormente, la expresión de *API* queda reducida a los dos verticilos más externos de la flor donde participa, junto a *APETALA 2 (AP2)* como gen homeótico floral en el desarrollo de los sépalos y pétalos (Irish y Sussex 1990; Bowman *et al.* 1993; Zambrano 2013).

Aunque *LFY*, *API* y *CAL* son los principales genes que mantienen la identidad del meristemo floral, también se considera a los genes *FRUITFULL (FUL)* y *AP2* como genes de identidad del meristemo floral (Bowman *et al.* 1993).

*FUL* codifica un factor de transcripción de la familia MADS que induce la expresión de *LFY* junto a *API* y *CAL* (Zambrano 2013). Además, participa en diversos procesos del

desarrollo, y su implicación en la identidad de meristemo floral se basa, en gran parte, en la observación de que en el triple mutante *ap1, cal, y ful*, las flores son sustituidas por inflorescencias, como consecuencia de que la expresión de *LEAFY (LFY)* no se induce y de que *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* se expresa ectópicamente en lo que deberían ser los meristemos florales (Ferrándiz *et al.* 2000; Zambrano 2013), y también participa en el desarrollo del fruto.

Por último, *AP2* codifica un factor transcripcional con un dominio característico de unión a DNA, el “domino AP2” que actúa en la identidad de los meristemos florales, reforzando la actividad de *LEAFY* y *API* (Irish 2010). Por otra parte, *AP2* participa en otros procesos del desarrollo de *Arabidopsis*, tales como la transición floral (Yant *et al.* 2010), la especificación de la identidad de pétalos y sépalos, y el desarrollo de las semillas (Zambrano 2013).

#### **2.2.4. Modelo ABC: Control genético de la identidad de los órganos florales**

Quizás uno de los procesos más estudiados en *Arabidopsis thaliana* sea el desarrollo floral, por lo que muchas de las actividades génicas que regulan este proceso han sido identificadas (Berbel 2005). Tal como sucede con los factores de transcripción HOM/Hox, que controlan la identidad de estructuras durante el desarrollo animal (Verakasa *et al.* 2000), existe un conjunto de reguladores transcripcionales que determinan la identidad de cada uno de los órganos en los cuatro verticilos de la flor (Ripoll 2004; Ochando 2005; Romero *et al.* 2010).

Las variaciones en los niveles o en los patrones de expresión de estos genes provocan la transformación homeótica de órganos florales (Meyerowitz 1994). El análisis genético de estos mutantes en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* permitió elaborar el modelo ABC, considerado hoy en día uno de los dogmas de la Biología del desarrollo vegetal (Romero *et al.* 2010). La validez del modelo es importante debido a que ha podido estudiar a otras angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Ambrose *et al.* 2003; Fornara *et al.* 2003).

El modelo propone que la combinación de tres actividades A, B y C especifica cada uno de los órganos florales de los verticilos (Figura 4), donde se observa que en la imagen A,

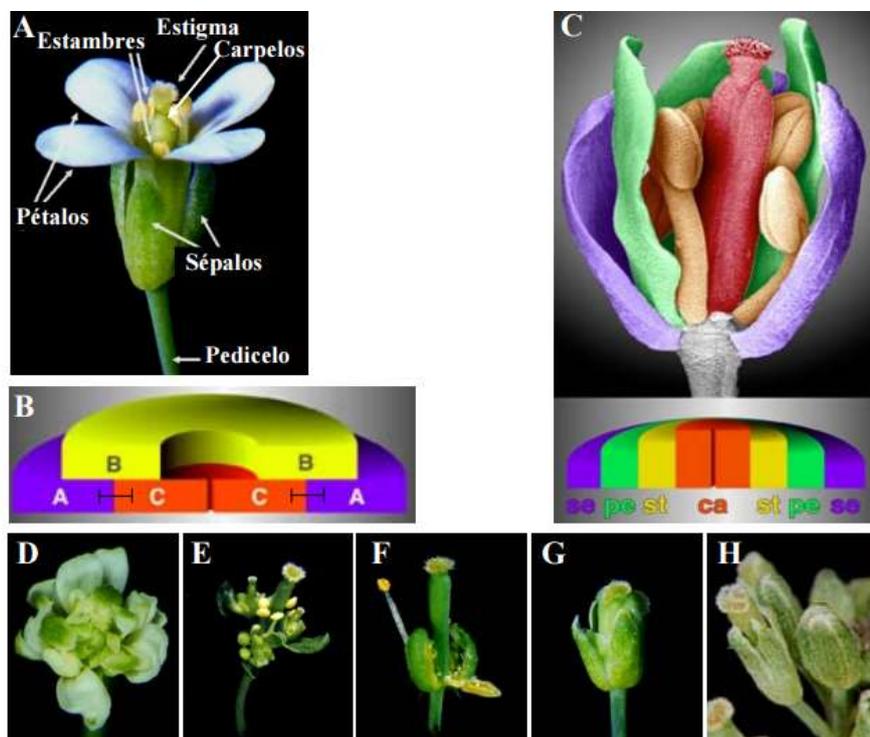
se observa la flor silvestre de *Arabidopsis thaliana* donde se indican los órganos florales. En la imagen B y C, el esquema general del modelo ABC donde se indican los verticilos en una sección transversal de una flor silvestre de *Arabidopsis thaliana*, las funciones A y C se excluyen mutuamente. Las imágenes D, E, F, G y H representan las flores de los mutantes en donde son afectados los siguientes genes: *ag* (D); *ap1* (E); *ap2* (F); *ap3* (G) y *pi* (H).

La actividad A especifica los sépalos, A+B los pétalos, B+C los estambres y solamente C los carpelos. El modelo propone que las actividades de A y C se excluyen mutuamente. En ausencia de C, la actividad A está presente en toda la flor, y viceversa, no viéndose afectada la función B. En ausencia de la función C, el meristemo floral se transforma en indeterminado generando una repetición continua de órganos con alternancia de sépalos y pétalos (Ripoll 2004; Tofiño 2010).

En *Arabidopsis thaliana* los genes *APETALA1* (*AP1*) y *APETALA2* (*AP2*) pertenecen a la clase A (Irish y Sussex 1990; Ochando 2005, Tofiño 2010). El gen *AP1* codifica un factor de transcripción de tipo MADS (Ripoll 2004) y actúa, junto con *AGAMOUS* (*AG*), *WUSCHEL* (*WUS*) y *LEAFY* (*LFY*) confiriendo identidad al meristemo floral. Inicialmente se expresa en todo el meristemo y en etapas posteriores se restringe su expresión al primer y segundo verticilo (sépalos y pétalos). El gen *AP2* también está implicado en la regulación de la identidad del meristemo floral, así como en el desarrollo de la semilla. Codifica una proteína de unión a DNA de tipo EREBP (Ethylene Responsive Element Binding Protein) (Riechmann y Meyerowitz 1998; Tofiño 2010). El gen *AP2* regula negativamente a *AG*, restringiendo la expresión al tercer y cuarto verticilo, de acuerdo con el modelo; sin embargo, aun presentando un papel en el primer y segundo verticilo, el transcrito de *AP2* se localiza en los cuatro verticilos, lo que supondría una excepción a la regla del modelo. Recientemente se ha descrito su regulación postranscripcional mediante microRNA (miRNA). El microRNA miR172 se localiza en el tercer y cuarto verticilo e impide la traducción del transcrito de *AP2*, apoyando el modelo ABC (Chen 2004; Jack 2004). Con el gen *AP2* cooperan otros factores que, en su conjunto, regulan negativamente la expresión de *AG* en los verticilos uno y dos (Klucher *et al.* 1996; Krizek *et al.* 2000).

Los genes de la clase B en *Arabidopsis thaliana*, *APETALA3* (*AP3*) y *PISTILLATA* (*PI*) especifican identidad de pétalos y estambres en el meristemo floral. Codifican factores de transcripción de tipo MADS que pueden formar heterodímeros entre sí (Romero *et al.* 2010). El complejo *AP3-PI* se une a regiones promotoras del gen *AP3* manteniendo sus niveles y patrón de expresión (Hill *et al.* 1998; Honma y Goto 2000). El gen *SUPERMAN* (*SUP*) también presenta un papel en la especificación de función B. Su actividad es necesaria para el mantenimiento de la expresión del gen *AP3*. La desregulación de los genes *PI* y/o *AP3* genera la formación de pétalos y estambres en cualquier parte de la flor (Romero *et al.* 2010).

El gen de la clase C, *AGAMOUS* (*AG*) en *Arabidopsis thaliana*, se expresa en el tercer y cuarto verticilo, confiriendo la identidad de carpelo y estambre. La expresión ectópica del gen *AG* es suficiente para la formación de carpelos y estambres en el primer y segundo verticilo. Algo similar sucede en los mutantes *ap2*, donde *AG* se encuentra reprimido (Jack 2004; Ochanda 2005; Tofiño 2010).



**Figura 4. Esquema general del Modelo ABC en *Arabidopsis thaliana*.**

Fuente: Ripoll (2004)

### 2.3. FLORACIÓN EN LEGUMINOSAS

La familia Fabaceae, comprende aproximadamente 750 géneros con más de 19.000 especies (Lim *et al.* 2014). Las leguminosas son el segundo cultivo alimenticio más importante después de los cereales y se caracterizan por sus flores en forma de mariposas, llamadas papilionadas, y sus frutos tipo vaina (Weller *et al.* 2009; Foley *et al.* 2015). La floración en leguminosas es un rasgo agronómico importante que determina el rendimiento de los cultivos y el momento óptimo de floración está altamente asociado a la producción adecuada de semillas para maximizar la reproducción sexual exitosa (Jarillo y Piñeiro 2011).

El proceso de floración ha estado sujeto al análisis genético en *Arabidopsis thaliana*. Esta especie ha proporcionado una gran cantidad de información sobre los mecanismos genéticos y rutas genéticas que controlan el proceso de floración, las respuestas al fotoperiodo, temperatura, vernalización, desarrollo de flores, percepción de la luz y señales endógenas (Sung y Amasino 2005; Gardner *et al.* 2006; Turck *et al.* 2008). Es así que, tanto la duración del día, así como la temperatura también, tienen una influencia importante en la floración y el hábito de crecimiento de muchas especies de cultivos de leguminosas y la capacidad de respuesta a estos factores es una característica de interés fundamental (Weller *et al.* 2009).

La variación genética de la floración, también se ha documentado en muchas especies de leguminosas, con varios loci florales conocidos en plantas de día corto (DC) como la soja (*Glycine max*) y frijol común (*Phaseolus spp*), y al menos un locus mendeliano o QTL de efecto mayor identificado en muchos otros, incluyendo las plantas de día largo (DL) como garbanzo *Cicer arietinum*, lenteja *Lens culinaris*, trébol *Trifolium spp*, barrel *Medicago truncatula* y el guisante *Pisum sativum* (Cogan *et al.* 2006, Millan *et al.* 2006; Phan *et al.* 2007; Pierre *et al.* 2008; Weller *et al.* 2009).

El guisante (*Pisum sativum*) se ha utilizado durante varias décadas como un sistema modelo para la genética fisiológica de la floración. Se ha logrado buscar secuencias de secuencia expresadas y secuencias del genoma de bases de datos para identificar los genes implicados en el proceso de floración de genes relacionados con secuencias de *Medicago truncatula*, *Glycine max* y *Lotus japonicus* (Hecht 2005).

Casi tres décadas de análisis genético y molecular han dado lugar a información casi detallada sobre muchos de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de la floración y en la identificación de un gran número de reguladores que controlan estos procesos. A pesar de este impresionante progreso, muchas preguntas sobre el control del desarrollo floral en diferentes especies de leguminosas permanecen sin respuesta (Riechmann and Wellmer 2014), como en el caso del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet).

Estudios en *Lupinus angustifolius* y *Lupinus pilosus*, demuestran que el proceso de regulación en la floración está controlado principalmente por las rutas del fotoperiodo y la vernalización (Rahman y Gladstones 1974). Además, se ha reportado que la precocidad en la floración responde a un carácter recesivo y en una floración tardía, como en el genotipo Inti (*Lupinus sp.*), depende más de la vernalización (Clements *et al.* 2008) y de una respuesta a fotoperiodo de día neutro (Hackbarth 1936).

El secuenciamiento de una parte del genoma de *Lupinus albus* y *Lupinus luteus*, abre la oportunidad de estudiar a *Lupinus mutabilis* Sweet (Parra-González *et al.* 2012; Oumer *et al.* 2015). Comprender la estructura y función de los genes involucrados en la floración permitiría a los mejoradores genéticos de plantas desarrollar nuevas variedades de cultivos con tiempos de floración alterados en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). La introducción de genes que participan en la floración temprana puede facilitar múltiples cosechas en una sola temporada. Además, la introducción de los genes de floración tardía puede conducir al aumento de los rendimientos del cultivo prolongando el período de crecimiento vegetativo (Putterill *et al.* 2004, Roux *et al.* 2006; Moon *et al.* 2013).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente experimento fue realizado en la casa malla del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Distrito de la Molina, Provincia de Lima, Departamento de Lima, cuya ubicación geográfica es 12°15'06'' de Latitud Sur, 76°57'09'' de Longitud Oeste y a una altitud de 243.7 m.s.n.m.

#### 3.2. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron 25 accesiones precoces de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) procedentes del Banco de Germoplasma del INIA-Huancayo.

##### 3.2.1. Selección del material vegetal

Para seleccionar la accesión de alto potencial, se utilizaron los criterios de selección de acuerdo a precocidad, peso de 100 semillas y porcentaje de sobrevivencia a estrés hídrico en condiciones controladas

- a) **Precocidad de días a la floración:** se trabajó con los datos proporcionados por el Banco de Germoplasma del INIA-Huancayo. Se seleccionaron aquellas accesiones que presentaron precocidad con menos de 95 días a la floración según la fórmula  $\text{Media} \pm \text{SD}$  del total de 25 accesiones. Las accesiones seleccionadas fueron utilizadas para evaluar el peso de 100 semillas.
- b) **Peso de 100 semillas:** se tomaron los pesos de 100 semillas de las accesiones que presentaron precocidad con menos de 95 días a la floración y se les comparó con el peso de 100 semillas de la variedad comercial Andenes. El peso de 100 semillas se determinó siguiendo la metodología de Castañeda *et al.* (2009). Se utilizó una balanza analítica con cuatro dígitos. Cada accesión se consideró como un tratamiento y cada

tratamiento contó con tres repeticiones. Las accesiones que presentaron igual o mayor peso de 100 semillas que Andenes se utilizaron para la evaluación del porcentaje de sobrevivencia a estrés hídrico.

- c) **Porcentaje de sobrevivencia a estrés hídrico en condiciones controladas:** para seleccionar las accesiones que expresen mayor respuesta al déficit por estrés hídrico, se aplicó el método de Harb (2010), se suspendió el riego por 10 días tomando como referencia el trabajo realizado por Hidalgo (2015) y luego se reestableció el riego a capacidad de campo (CC) por seis días consecutivos, y se le comparó con la variedad comercial Andenes. Las accesiones que presentaron mayor tolerancia a estrés hídrico en forma de porcentaje de sobrevivencia fueron seleccionadas para evaluar la calidad de semillas.

### 3.2.2. Calidad de semillas:

La calidad de semillas fue evaluada en base a los siguientes criterios: tamaño de semillas, contenido de microelementos y proteínas solubles totales.

- a) **Tamaño de semillas:** se determinó el tamaño de semillas en la accesión de alto potencial, midiendo la altura y diámetro de estas con la ayuda de un vernier electrónico Tactix y se comparó con la variedad comercial Andenes. Cada accesión se consideró como un tratamiento y cada tratamiento contó con 25 repeticiones.
- b) **Contenido de microelementos:** la composición mineral se determinó a partir de la harina obtenida de semillas completas. Se pesó 3g de harina de semillas y se determinó el contenido de Zn, Mn y Fe en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina. El análisis se realizó mediante digestión húmeda en mezcla nitro-perclorica. La lectura de los elementos Zn, Mn y Fe se realizó por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados fueron medidos con el espectroscopio de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200 ® y expresados en partes por millón (ppm).

- c) **Contenido de proteínas solubles totales:** se determinó el contenido de proteínas solubles totales (*PST*) según el método de Bradford (1976) en las semillas de tarwi. Se pesó 0.5 g de harina. Se utilizó como 3 ml de buffer de extracción fosfato de sodio 100 mM y pH 7. El homogenizado obtenido se centrifugó a 14 000 g durante 20 minutos a 4°C, tres veces; enseguida el sobrenadante se utilizó para cuantificar las proteínas. Se tomó 10 ul del sobrenadante y se llevó al volumen final de 3 ml con el reactivo de Bradford, luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para determinar la cantidad de proteínas se utilizó albúmina de suero bovino (*BSA*) como estándar en la curva de calibración.

### 3.2.3. Análisis de datos

A menos que se indique lo contrario, la unidad experimental fue una maceta con cuatro plantas acomodadas en un diseño completamente al azar (DCA), con modelo aditivo lineal  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$ , donde  $Y_{ij}$  es la respuesta,  $\mu$  es la media del experimento,  $\tau_i$  es el efecto de tratamientos y  $\varepsilon_{ij}$  es el error experimental. Los resultados fueron procesados con el software estadístico SAS (<https://www.sas.com>) para establecer las diferencias significativas entre tratamientos, mediante el análisis de varianza y las comparaciones múltiples fueron hechas con HSD de Tukey.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LAS YEMAS FLORALES

La caracterización morfométrica del desarrollo de las yemas florales de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) se realizó en base a los caracteres morfológicos de las flores de Fabaceae (Rodríguez-Riaño *et al.* 1999) y los descriptores morfológicos propuestos para el género *Lupinus* (IBPGR 1981) y la terminología usada por Tucker (1987). Los individuos de *Lupinus mutabilis* fueron cultivados en la casa malla del PIPS en Cereales y granos nativos de la UNALM. Todas las medidas morfológicas necesarias se realizaron con ayuda de un estereoscopio Zeiss modelo Stemi DRC y un vernier electrónico Tactix.

Las evaluaciones fueron realizadas en doce plantas con inflorescencias inmaduras, en desarrollo floral tardío (Prenner 2013). Las inflorescencias fueron colectadas y fijadas en FAA (90 partes de etanol, 5 de ácido acético y 5 formaldehído). Las inflorescencias

inmaduras de *L. mutabilis* fueron agrupadas de manera artificial en 6 estadios (E1, E2, E3, E4, E5, E6) en función a su altura, diámetro y peso. En los estadios E2, E4 y E6 se realizó la descripción morfológica de ellos.

### **3.4. RNA-SEQ DE NOVO DE LAS YEMAS FLORALES TERMINALES**

#### **3.4.1. Tratamientos**

Las plantas de la accesión seleccionada fueron desinfectadas y germinadas utilizando el método descrito en la sección Material vegetal. Se sembraron cinco plántulas en cada maceta de plástico, usando el sustrato descrito en la sección Material vegetal. El cultivo se realizó en la casa malla del Laboratorio de Biotecnología del Programa de Cereales. Los brotes fueron seleccionados de la siguiente manera:

Tratamiento 01: Brotes florales en estadio E4

Tratamiento 02: Brotes florales en estadio E6.

Para minimizar la variación entre muestras, se hizo un pool de brotes florales conforme fueron alcanzando los estadios E4 y E6. De esta manera, se utilizaron tres repeticiones técnicas de cada una de las unidades experimentales, las cuales estuvieron compuestas por dos macetas con cinco plantas cada una. El flujograma seguido para el desarrollo del ARN seq de novo es mostrado en la Figura 5.

#### **a. Extracción de ARN, construcción de las librerías y secuenciamiento**

La extracción de ARN total y la remoción de ADN genómico se hicieron según las indicaciones del kit Direct-zol™ RNAMiniprepPlus (ZYMO RESEARCH, Irvine, CA). La calidad del ARN extraído es presentada en el Anexo 3.

El manejo y preparación de la librería de RNA-seq, y el secuenciamiento de próxima generación (NGS) fueron hechas por MACROGEN Inc., Seoul, Korea (<http://macrogen.com>). El experimento incluyó 2 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, lo cual originó 6 librerías de RNA-seq.

## **b. Filtrado de reads, ensamblaje de novo y análisis de expresión diferencial**

Los reads pareados (lecturas) en crudo, fueron examinados para obtener reads de alta calidad. Para ello, se realizó el filtrado de los reads de baja calidad (score Phred de calidad  $\geq 30$ ), la remoción de adaptadores Illumina y contaminación por PCR utilizando el software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Al carecer de genoma de referencia para *L. mutabilis*, los datos fueron unidos con los reads provenientes del experimento de Hidalgo *et al.* (2020), para obtener un ensamblaje más completo.

El ensamblaje de novo del transcriptoma se realizó utilizando la herramienta Trinity (Grabherr *et al.* 2011), de acuerdo con el protocolo de análisis de RNA-seq (Haas *et al.* 2013). La cantidad de cada transcripto fue estimada por el software RSEM (Haas *et al.* 2013). Utilizando el paquete TransDecoder (Haas *et al.* 2013), se identificaron los ORFs (marcos abiertos de lectura) con más de 200pb, para predecir los genes a partir de los ensamblados.

## **c. Anotación y enriquecimiento**

Al carecer de un genoma de referencia para *Lupinus mutabilis*, se utilizó la base de datos de secuencias proteicas no redundantes (nrNCBI), utilizando el software BLASTX para obtener las funciones putativas de las secuencias únicas. El filtrado se realizó con los siguientes parámetros: valor  $E \leq 1e-20$ , porcentaje de identidad  $\geq 50\%$  y porcentaje de cobertura del gen  $\geq 50\%$ . Posteriormente, se utilizó el software EdgeR para la determinación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) (Robinson *et al.* 2010).

La anotación mediante términos de Ontología Génica (GO), que incluyó Función Molecular, Proceso Biológico y Componente Celular, así como el análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados (DEGs), se realizó de acuerdo a Alafiatayo *et al.* (2020).

#### d. Evaluación de Rutas Metabólicas de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).

Los genes diferencialmente expresados con valores de  $\log_2FC$  mayores de 2, menores que -2 y con  $FDR < 0.05$  fueron evaluados con el software GProfiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Se analizaron las rutas según la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) utilizando *Arabidopsis thaliana* como organismo de referencia, con rango de dominio estadístico en solamente genes anotados, empleando como límite de significancia Benjamini-Hochberg  $FDR \leq 0.05$ .

#### e. Análisis de datos

Los valores de FPKM (Fragmentos por millón de kilobases), fueron procesados con el software estadístico SAS (<https://www.sas.com>) para establecer las diferencias significativas entre tratamientos, mediante el análisis de varianza y las comparaciones múltiples fueron hechas con HSD de Tukey.

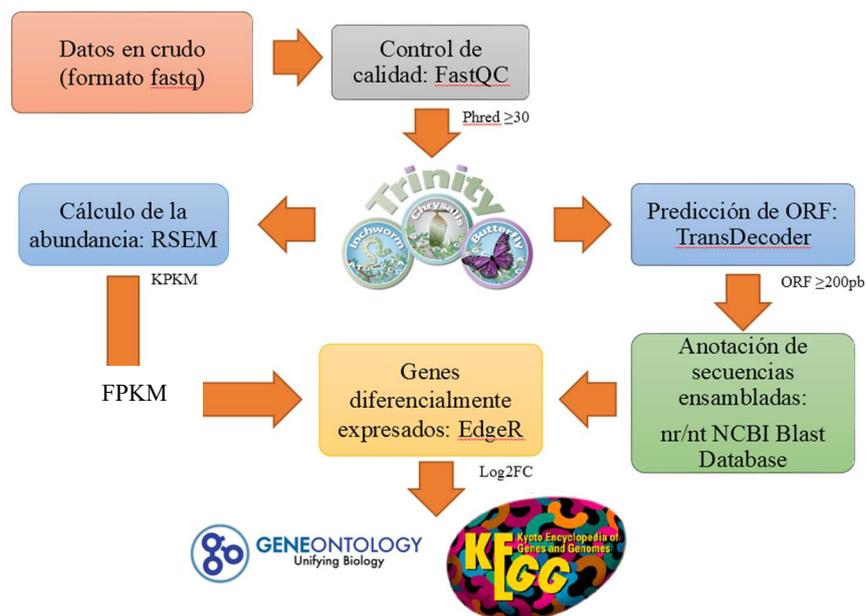


Figura 5: Diagrama de flujo del análisis de *ARN-seq* de novo.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mejoramiento genético ha permitido el desarrollo de variedades que combinen precocidad, buen rendimiento y tolerancia a factores abióticos (Chávez *et al.* 2009).

### 4.1. SELECCIÓN DE LA ACCESION PROMISORIA

#### a) Precocidad de días a la floración

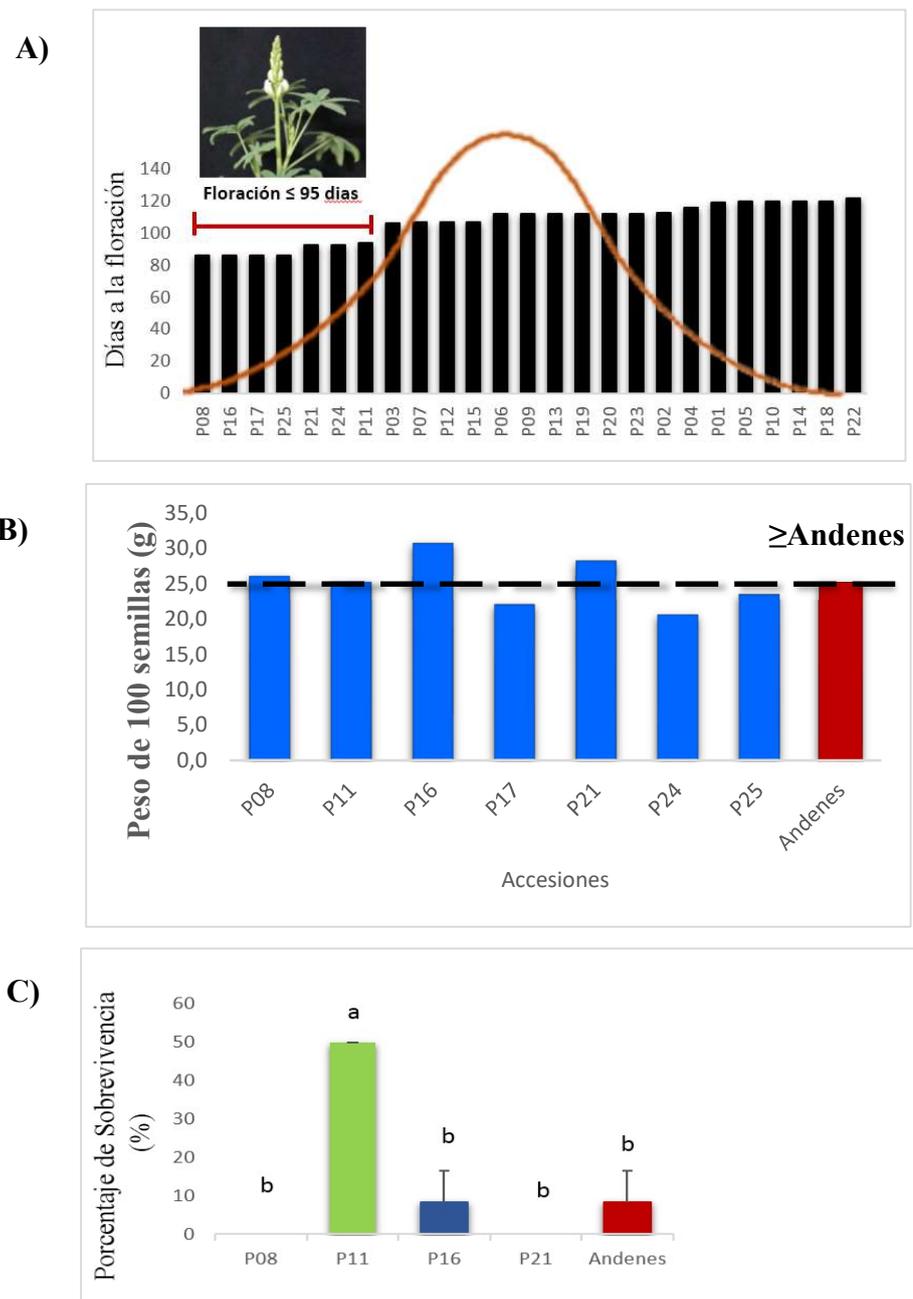
La precocidad puede ser utilizada en el incremento del grado de certidumbre en la cosecha del tarwi, debido a que se reduce el riesgo de pérdidas ocasionadas por factores medioambientales adversos, llegando a reducir su rendimiento. La Figura 6A, representa las 25 accesiones precoces de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) del Banco de Germoplasma de INIA-Huancayo. Esta gráfica muestra que la precocidad de días a la floración varía de 86 a 120 días entre accesiones (P08 y P22 respectivamente). Las accesiones seleccionadas P08, P11, P16, P17, P21, P24 y P25, son aquellas que presentaron precocidad con menos de 95 días a la floración, y se encuentran dentro de la línea horizontal, en la curva de distribución normal ( $\text{Media} \pm \text{SD}$ ).

#### b) Peso de 100 semillas

El peso de 100 semillas es uno de los componentes principales para evaluar el rendimiento en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). En la Figura 6B, se presenta el peso de 100 semillas de las accesiones precoces con menos de 95 días a la floración. El peso de 100 semillas fluctúa entre 20.57 y 30.54 g correspondientes a las accesiones P24 y P16 respectivamente. Se observó que las semillas de las accesiones P08, P11, P16 y P21 superaron en peso de semillas con valores de 25.97, 25.17, 30.64 y 28.16 g respectivamente cuando se compararon con la variedad comercial Andenes (25 g). En contraste, las accesiones P17, P24 y P25 presentaron los valores más bajos de peso de 100 semillas por debajo de Andenes con 21.99, 20.57 y 23.50 g respectivamente ( $\text{Media} \pm \text{SD}$ ).

### **c) Porcentaje de sobrevivencia a estrés hídrico**

La tolerancia frente al estrés por déficit hídrico es asegurar que los cultivos utilicen eficientemente el agua disponible, sin afectar su productividad. En la Figura 6C, al comparar el porcentaje de sobrevivencia a estrés hídrico de las accesiones precoces con menos de 95 días a la floración y peso de 100 semillas superiores con la variedad comercial Andenes se observó que la accesión P11 tuvo mejor respuesta al estrés hídrico (50%) a las accesiones P16, P08, P21 y Andenes, quienes mostraron valores de 8, 0, 0 y 8% de sobrevivencia, respectivamente (Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Accesiones de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) del Banco de Germoplasma de INIA-Huancayo. A) Días a la floración de 25 accesiones (Media±SD). La curva naranja indica la distribución de las accesiones y la línea horizontal indica el punto en el que se encuentran las accesiones con menos de 95 días a la floración ( $\chi$ - $\delta$ ). B) Peso de 100 semillas de accesiones con menos de 95 días a la floración (Media±SD). C) Porcentaje de sobrevivencia a estrés hídrico de accesiones con menos de 95 días a la floración. Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ). Las líneas sobre las barras expresan la desviación estándar.

## 4.2. CALIDAD DE SEMILLAS

### a) Tamaño de semillas

El tamaño de la semilla es un factor relacionado con la producción y calidad de las semillas. La Figura 7A muestra el tamaño de semillas de la accesión P11 y Andenes, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las semillas de la accesión P11, superando en altura a la variedad comercial Andenes (10.28 y 9.63 mm, respectivamente). La misma tendencia se observó, al evaluar el diámetro de las semillas en P11 y Andenes (8.04 y 7.37 mm, respectivamente), siendo la accesión P11 las que tuvieron el mejor tamaño de semillas. El tamaño de las semillas es una característica deseable en la presentación del producto durante su comercialización, se ha observado que productores y consumidores muestran preferencia por granos de tamaños grandes. Seleccionando genotipos sobresalientes, como los que presenta la accesión P11, se podrá satisfacer o superar las exigencias del mercado nacional e internacional.

### b) Contenido de microelementos

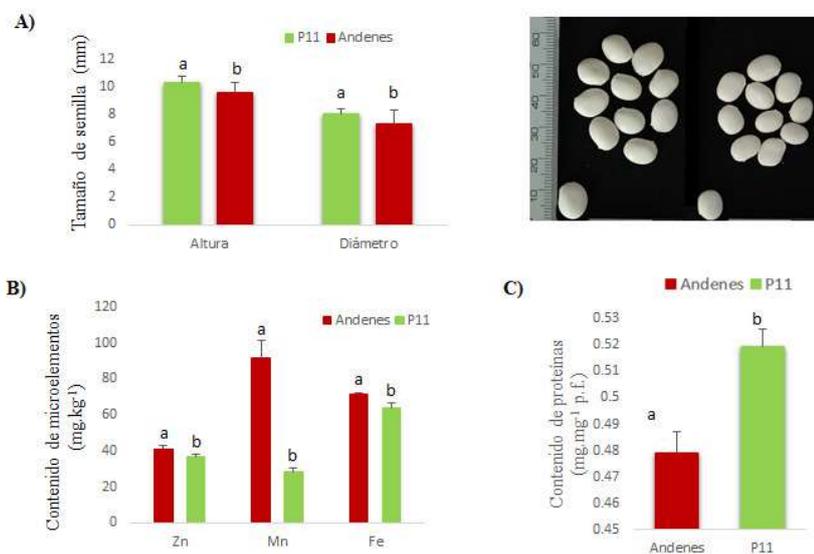
Respecto al contenido de micronutrientes, la Figura 7B presenta el contenido de Zn, Mn y Fe en semillas. Las semillas de Andenes presentaron mayor contenido de Zn (40.07 mg/Kg) que la accesión P11 (36.67 mg/Kg). De igual manera, el contenido de Fe fue superior en Andenes que P11 (71.67 y 64 mg/Kg, respectivamente); sin embargo, ambas semillas presentaron altos niveles de estos micronutrientes según reporta el Centro Nacional de Alimentación del Instituto Nacional de Salud para granos nativos (1.38 y 1.40 mg/Kg de Zn y Fe, respectivamente). Además, los valores de Fe son mayores a los mostrados por Ortega *et al.* (2010) en la testa (58 mg/Kg) y cotiledones (46 mg/Kg) en semillas de *Lupinus mutabilis*.

A nivel mundial las deficiencias mas comunes de micronutrientes en la dieta de las personas son para Zn y Fe, y cerca del 60% de la población en el mundo presenta deficiencias de Fe (Yang *et al.* 2007). En este sentido las semillas de tarwi ayudarían a reducir estas deficiencias debido a sus altos contenidos de este micronutriente. Por otro lado, Andenes presentó elevado contenido de Mn con valores superiores a 90 mg/Kg, mientras que la accesión P11 tuvo valores menores a 30 mg/Kg. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud, el contenido de este microelemento no debe superar

los 33 mg/Kg debido a que una ingesta elevada de Mn puede producir daños en el cerebro y al feto.

### c) Contenido de proteínas solubles totales

Las semillas de tarwi son ricas en proteínas y grasas, razón por la cual debería ser utilizado con mayor frecuencia en la alimentación humana, su contenido proteico es superior al de la soya, por lo que son excepcionalmente nutritivas. La Figura 7C muestra el contenido de proteínas solubles totales en semillas de la accesión P11 y Andenes. Los valores muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el contenido de proteínas solubles totales de semillas en la accesión P11 (0.52 mg/mg de tejido fresco) superando a la variedad comercial Andenes (0.48 mg/mg de tejido fresco). Estos valores son superiores a los reportados por Tapia (2015), donde se citan contenidos de 45% de proteínas en semillas. Aunque, otros investigadores reportan ecotipos estudiados de tarwi con valores máximos de 49.22% de proteínas en cotiledones. El valor proteico de la semilla entera y los cotiledones es superior al de otras materias primas comúnmente utilizadas en la industria alimentaria, como la soya que tiene valores aproximados de 40%.



**Figura 7.** Caracterización de la accesión P11 y de la variedad comercial Andenes. A) Tamaño de semillas (Media $\pm$ SD). B) Contenido de Zn, Mn y Fe en semillas C) Contenido de proteínas solubles totales (Media  $\pm$  SD). Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ). Las líneas sobre las barras expresan la desviación estándar.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LAS YEMAS FLORALES

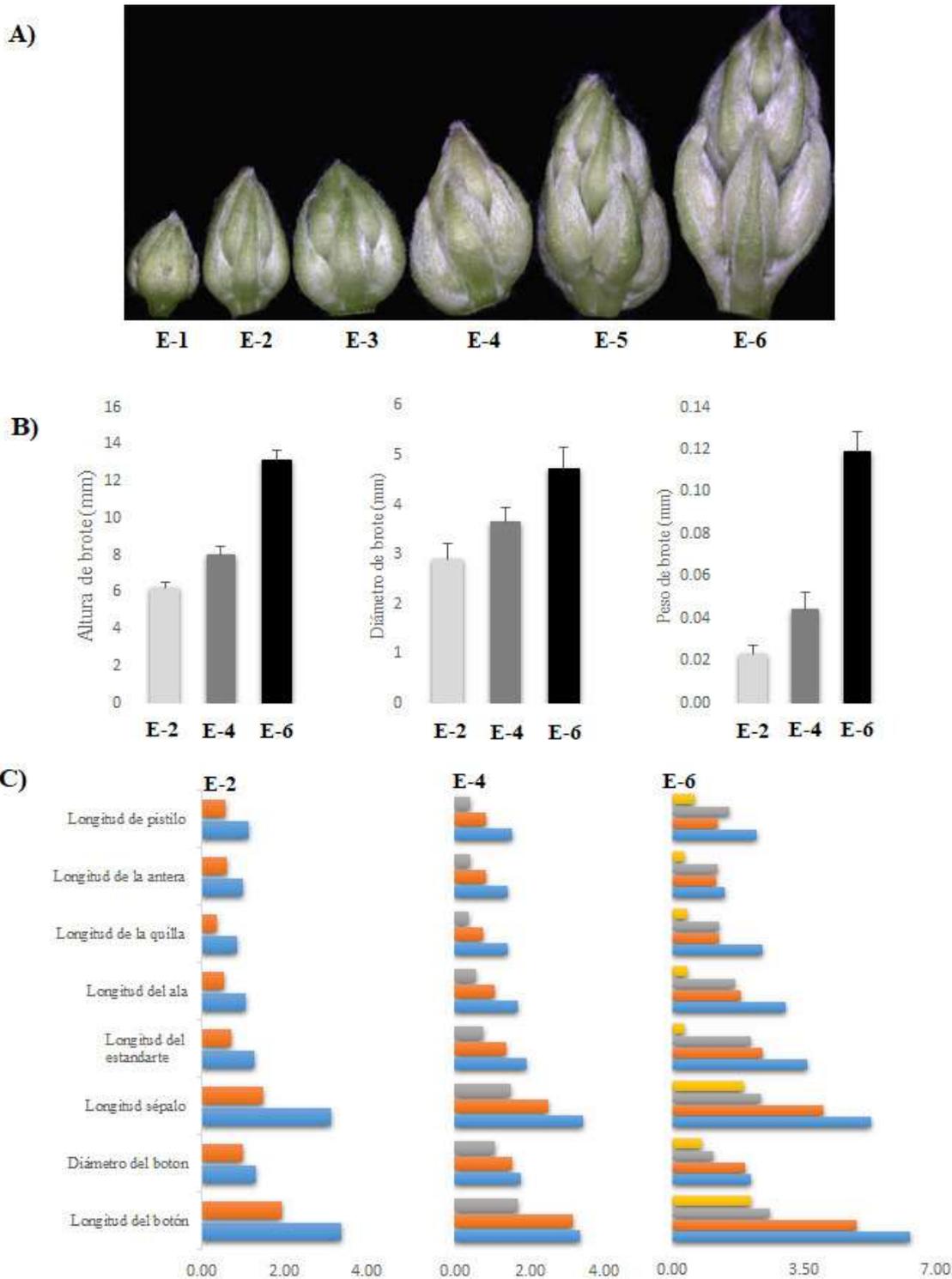
La inflorescencia en tarwi es un racimo terminal que, al igual que otras especies de la subfamilia Papilionoideae, inicia su desarrollo con la formación acropétala de brácteas de manera helicoidal (Movafeghi *et al.* 2010). La Figura 8A, muestra la caracterización morfológica de las yemas florales de la accesión P11 en tarwi. El desarrollo del crecimiento de las yemas florales, fueron agrupadas de manera artificial en 6 estadios: E1, E2, E3, E4, E5, y E6, en función a la altura, diámetro y peso de las yemas florales, seleccionándose así aquellos estadios que mostraban diferencias morfológicas respecto a la maduración de los verticilos florales E2, E4 y E6.

La Figura 8B, muestra la altura, diámetro y peso de las yemas florales de los estadios E2, E4 y E6. La inflorescencia del estadio E2 presenta una altura entre 5.9-6.7 mm, diámetro 3.2-4.7mm y peso 0.02-0.027g. Además, presenta 2 verticilos de botones florales. La inflorescencia del estadio E4 presenta 3 verticilos, y tiene una altura entre 7.4-9.44 mm, diámetro 4.9-5.9 mm y peso 0.042-0.06 g. La inflorescencia del estadio E6, presenta una altura entre 12.8-13.6 mm, diámetro 5.8-7.1 mm, peso 0.09-0.1.

Además, cuenta con 4-5 verticilos bien formados. La diferencia del estadio E2 y E4 no es muy significativa respecto a la altura y diámetro; sin embargo, es superior al 20% en las dimensiones de las estructuras florales y el peso aumenta considerablemente. Por otro lado, en el estadio 6, el aumento de la altura por la extensión del eje de la inflorescencia es considerablemente elevado, no obstante, el aumento en el diámetro no resulta estadísticamente significativo, el peso aumenta en más del 100% respecto al estadio E4.

La Figura 8C, muestra la caracterización de los verticilos florales evaluados en los tres estadios seleccionados E2, E4 y E6. En el estadio E2, los verticilos de los botones florales se disponen, aun, de manera semihelicoidal. La distancia entre dos verticilos consecutivos no es mayor 1mm. Las brácteas son de mayor longitud que los botones florales por lo cual cumplen la función de protección. El cáliz es ligeramente zigomorfo y presenta un indumento piloso. El estandarte del primer verticilo es menor a 2mm. Los pétalos que conforman la quilla menor a 1 mm y aún no se encuentran soldados. El androceo monadelfo se encuentra formado; sin embargo, no hay una clara diferenciación entre el

ciclo externo e interno de estambres. Las anteras del ciclo externo son de mayor tamaño y estas no presentan polen. El pistilo es piriforme con un estilo inconspicuo y un estigma no desarrollado. En el estadio E4, las brácteas son de similar longitud que los botones florales del primer verticilo. El estandarte se encuentra completamente formado. Los pétalos de la quilla subiguales a las alas y no están soldados. Las anteras del ciclo externo presentan ocasionalmente polen. El pistilo presenta una ligera elongación; sin embargo, esta no es muy prominente. El estigma no está claramente diferenciado. Finalmente, en el estadio E6, las brácteas son de menor longitud que los botones florales, en los cuales el cáliz toma la función de protección. El cáliz es claramente zigomorfo. Inicia la fusión de los pétalos que forman la quilla. Los verticilos del androceo se encuentran claramente diferenciados siendo los estambres del ciclo externo mucho más largos y voluminosos que los del ciclo interno los cuales detienen su crecimiento. Las anteras de los estambres del ciclo externo cuentan con polen en su interior. El estilo es notoriamente elongado y el estigma papiloso se encuentra desarrollado.



**Figura 8.** Caracterización morfológica de las yemas florales de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). A) Estadios del desarrollo de yemas florales de la accesión P11 de tarwi. B) Altura, diámetro y peso de brotes de los estadios E2, E4 y E6. C) Caracterización de los verticilos florales de los estadios E2, E4 y E6.

#### 4.4. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE NOVO DE LAS YEMAS FLORALES

El RNA-seq es una técnica de análisis de expresión de alto rendimiento, que permite identificar y cuantificar de manera precisa los genes que se están expresando en un momento determinado (Nagalakshmi *et al.* 2010). Además, es factible realizar este análisis incluso si no existe un genoma de referencia, tal como ocurre en *L. mutabilis*. Esto se logra por la evaluación de la similitud de los transcritos de la especie evaluada con especies relacionadas (Nagalakshmi *et al.* 2010; Costa-Silva *et al.* 2017)

##### a) Secuenciamiento, ensamblaje y filtrado de datos

El secuenciamiento de ARN total mediante RNA-seq de Illumina, se realizó con el secuenciador HiSeq 2500, obteniéndose en promedio 5 037 201 196 bases totales en 49 873 279 reads (Anexo 4). Tras el filtrado de datos, se obtuvieron 48 437 437 reads de alta calidad (score Phred de calidad  $\geq 30$ , con remoción de adaptadores y longitud  $\geq 20$ pb), con 204 187 671 pares de bases en total. El ensamblaje produjo contigs con porcentaje de GC de 39.31%. Los contigs tuvieron un N50 de 1879, con un promedio de 1184,59. En el ensamblaje con Trinity, se obtuvieron 172 370 transcritos, de los cuales se encontraron 83 145 genes totales (Cuadro 1).

Se hizo la determinación de la abundancia con el software RSEM y luego se realizó el filtrado de los transcritos que tuvieron FPKM  $\geq 0.1$ , valor  $E \leq 1e-20$ , porcentaje de identidad  $\geq 50$  y porcentaje de cobertura  $\geq 50$ . Estos valores correspondieron un total de 143 021 471 bases ensambladas en contigs con un porcentaje de 39.31% GC. Los contigs tuvieron un N50 de 2096, con un promedio de 1680.23. En cuanto al ensamblaje, los 85 120 transcritos, originaron 37 044 genes totales. Los datos se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1: Estadísticas de Ensamblaje y Filtrado del transcriptoma de *Lupinus mutabilis*.**

	<b>Resumen de ensamblaje</b>	<b>Resumen de filtrados</b>
<b>Genes totales según Trinity</b>	83145	37 044
<b>Transcriptos totales según Trinity</b>	172370	85 120
<b>Porcentaje de GC (%)</b>	38.62	39.31
<b>N50 de los contigs</b>	1879	2096
<b>Promedio de contigs</b>	1184.59	1680.23
<b>Total de bases ensambladas</b>	204187671	143021471

En contraste, en el transcriptoma de *L. albus* con déficit de fosfato trabajado por O'Rourke *et al.* (2013), se encontraron 277 224 180 reads de Illumina con 125 821 secuencias únicas con un tamaño promedio de 1 155 pb.

#### **b) Análisis de expresión diferencial**

Tras el cálculo de la abundancia relativa con el software RSEM, y la detección de secuencias con ORFs (marcos abiertos de lectura) mayores a 200 pb, se procedió a determinar los genes con expresión diferencial con el paquete EdgeR. Estos genes fueron filtrados según su significancia  $p < 0.05$ , dando como resultado un total de 2 340 genes diferencialmente expresados. De estos, 1 443 genes estuvieron sobreexpresados, en tanto que 897 genes fueron subexpresados (Cuadro 2). En comparación, O'Rourke *et al.* (2013), encontró 2 128 transcritos diferencialmente expresados en *L. albus* (2 veces sobreexpresados;  $P < 0,05$ ;  $RPKM > 3$ ). Al realizar un filtrado según su nivel de expresión ( $\log FC < -2$  y  $\log FC > 2$ ) y según el valor de False Discovery Rate ( $FDR < 0.05$ ) se observaron 533 genes diferencialmente expresados. De entre estos 427 genes estuvieron sobreexpresados y 106 genes subexpresados (Cuadro 2).

**Cuadro 2: Genes diferencialmente expresados en las yemas florales de *Lupinus mutabilis*.**

<b>Resumen de los transcritos del experimento de las yemas florales</b>	
Número de genes significativos con valor ( $p < 0.05$ )	2 340
Genes sobreexpresados	1 443
Genes subexpresados	897
<b>Resumen de filtrado de transcritos según FDR y FC</b>	
Número de genes significativos con valor ( $FDR < 0.05$ y $\log FC < -2$ y $\log FC > 2$ )	533
Genes sobreexpresados	427
Genes subexpresados	106

### c) Anotación funcional y enriquecimiento

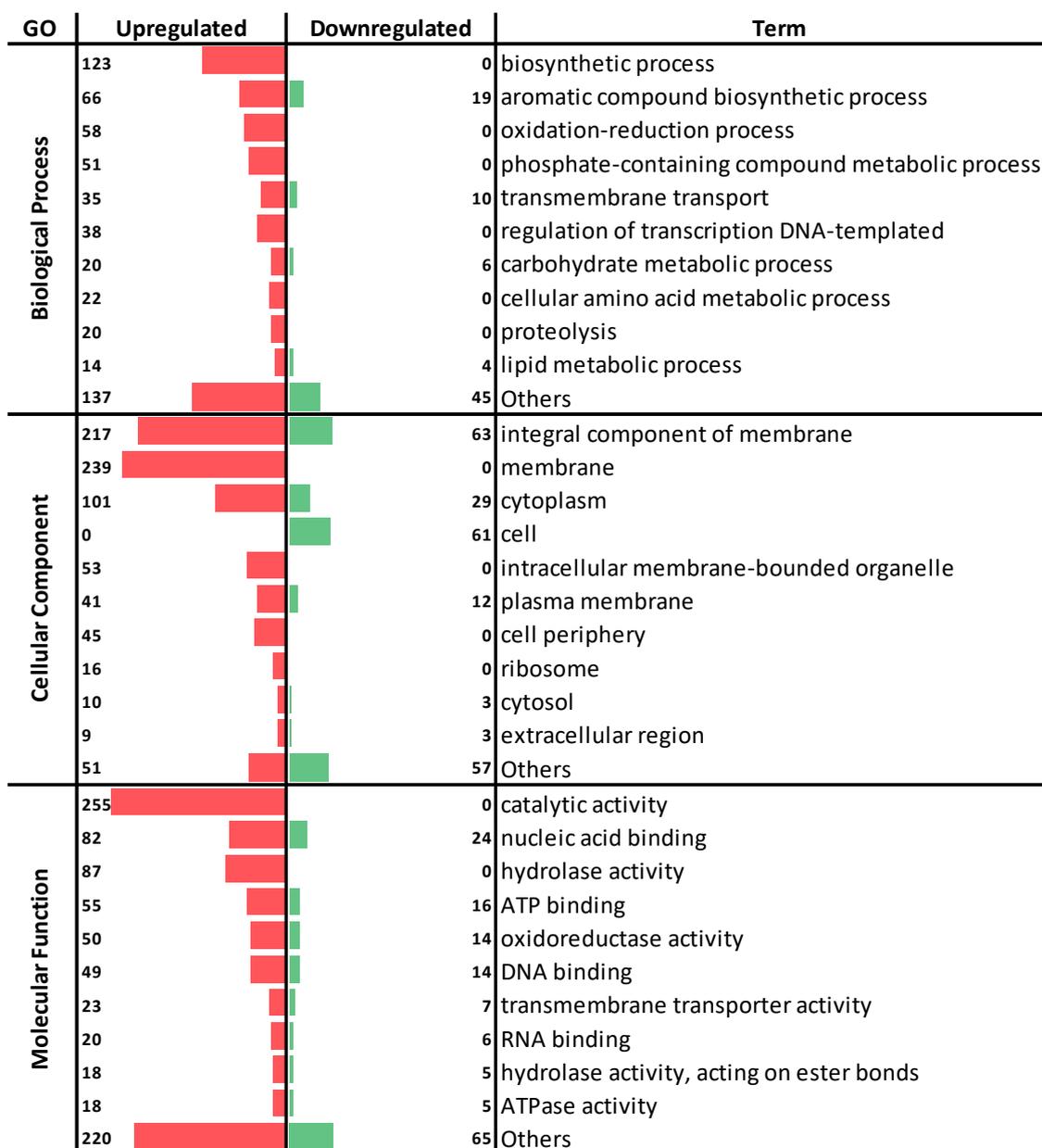
Para realizar la anotación funcional del transcriptoma de tarwi, se utilizaron los datos de expresión ensamblados en transcritos, para comparar con los genomas de *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, y también la base de datos nrNCBI. Se enriqueció la anotación mediante el análisis de ontología génica y rutas metabólicas, tal como fue descrito en la metodología (Figura 5). De esta manera, se logró la identificación de los términos de ontología génica subexpresados y sobreexpresados según proceso biológico, componente celular y función molecular, y las rutas metabólicas en las cuales están involucrados.

#### Términos de Ontología Génica

El análisis de Ontología Génica (Figura 9) permitió establecer la clasificación de genes según Proceso Biológico, Componente Celular y Función Molecular.

Los cinco principales términos con mayor expresión diferencial dentro de procesos biológicos, estuvieron relacionados con procesos biosintéticos (123), procesos biosintéticos de compuestos aromáticos (85), procesos de oxido-reducción (58), procesos metabólicos de compuestos que contienen fosfato (51), transporte de transmembranas (45). Con respecto a Componente Celular, los 5 términos con más genes diferencialmente expresados fueron: componente integral de membrana (280), membrana (239), citoplasma (130), célula (61), organelos unidos a la membrana intracelular (53). Los términos de Función Molecular con mayor cantidad de genes diferencialmente

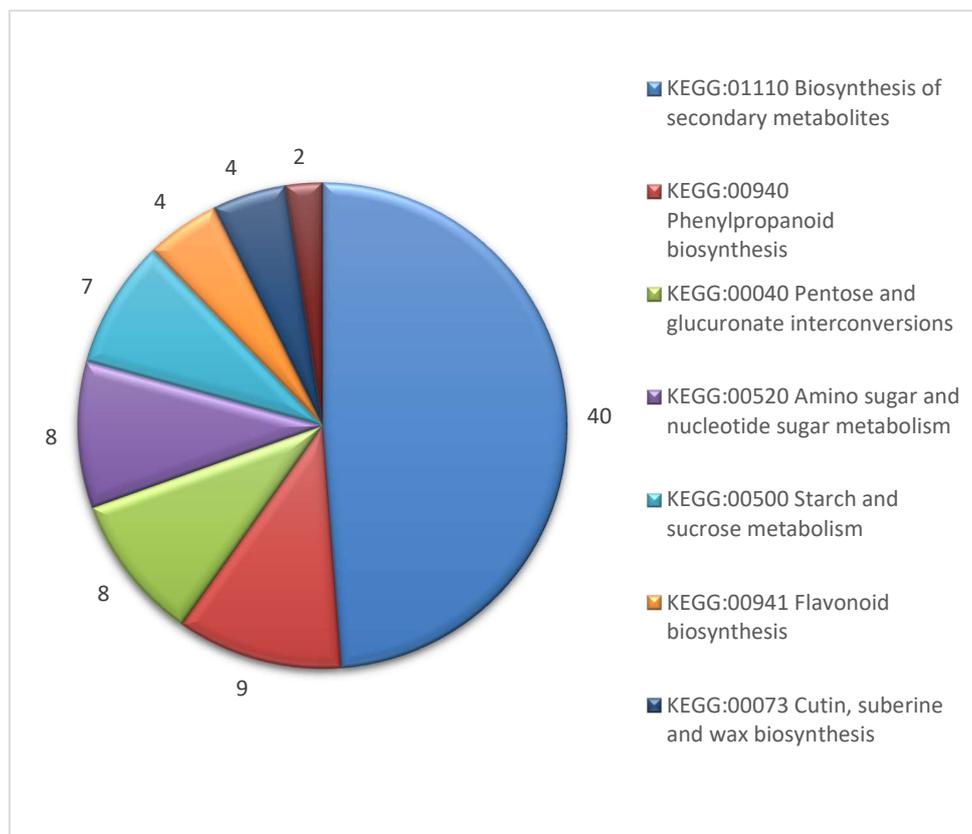
expresados fueron actividad catalítica (255), acoplados ácidos nucleicos (106), actividad hidrolasa (87), acoplado a ATP (71), actividad oxidorreductasa (64).



**Figura 9:** Enriquecimiento de ontología génica de los genes diferencialmente expresados relacionados a Proceso Biológico, Componente Celular y Función Molecular.

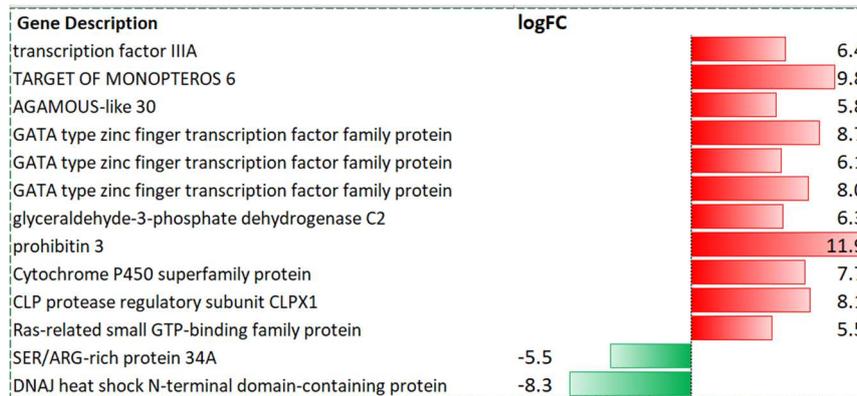
#### d) Evaluación de Rutas Metabólicas de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG)

El análisis con Gprofiler permitió la clasificación de 108 genes diferencialmente expresados (DEGs) según KEGG (Figura 10). Se anotaron 108 genes. (GProfiler parameters: Organism: *A. thaliana*, Statistical Domain Scope: Only annotated genes, Significance Threshold: Benjamini-Hochberg  $FDR \leq 0.05$ ). Estos fueron incluidos en los grupos de Biosíntesis de metabolitos secundarios (40), Biosíntesis de fenilpropanoides (9), Interconversiones de Pentosa y glucuronato (8), Metabolismo de aminoazúcares y azúcares de nucleótidos (8), Metabolismo de almidón y sacarosa (7), Biosíntesis de flavonoides (4), Biosíntesis de cera, suberina y cutina (4), Biosíntesis de gingerol, estilbenoide y diarilheptanoide (2)

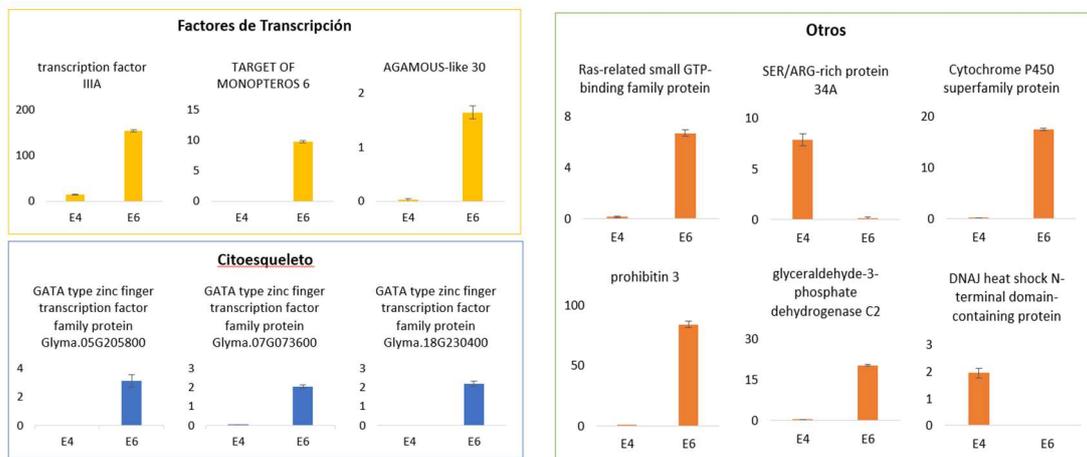


**Figura 10:** Clasificación de genes según KEGG.

A)



B)



**Figura 11.** Valores de expresión de genes diferencialmente expresados en E4 y E6 del desarrollo de la inflorescencia en tarwi. A) Expresión según logFC y b) Expresión según FPKM.

### e) Factores de Transcripción

#### *Transcription Factor IIIA*

La variante AT1G72050.2 del factor de transcripción IIIA (Figura 11A) codifica una proteína con nueve dedos de zinc Cys(2)-His(2), presente en el núcleo, incluyendo el nucléolo (Pasha 2020). Esta proteína regula la transcripción de los genes de ARN ribosomal 5S por la ARN polimerasa III (Latchman 2008). Se une a la región de control interno de los genes de ARNr 5s por la región interna durante la primera etapa de la transcripción, permitiendo el reclutamiento de TFIIC, TFIIB and pol III (Mathieu *et al.*

2003). El factor de transcripción IIIA, anotado como AT1G72050.2 estuvo sobreexpresado en el Estadio 6 (logFC 6.4) en *L. mutabilis*.

Según Vimont *et al.* (2019), el homólogo de TFIIIA (AT1G72050) en *Prunus avium* L. se ha encontrado sobrerrepresentado en brotes florales en desarrollo, indicando su relación e importancia con los procesos de transición floral y floración (Vimont *et al.* 2019). Teniendo en cuenta que en *Prunus avium*, las flores se desarrollan de forma individual y no en inflorescencias como en *L. mutabilis*, la mayor expresión en esta última especie debe expresarse en los verticilios más jóvenes.

Por otro lado, en seres humanos y *Drosophila melanogaster*, se ha encontrado la interacción con bases experimentales de TFIIIA con las proteínas FIE (FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM, AT3G20740.1, STRING score 0.633), la cual codifica una proteína similar al regulador transcripcional del grupo Polycomb, y está involucrado en la regulación del establecimiento del eje de polaridad antero-posterior en el endosperma, y en la represión de la floración durante la fase vegetativa (Satijn *et al.* 2001; Wang *et al.* 2004).

Se ha reportado la interacción de TFIIIA con Protein phosphatase 2C en diferentes organismos (AT2G20050.1; STRING score 0.871), incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*. En los cuales AT2G20050.1 es una proteína capaz de regular la actividad quinasa de proteína dependiente de AMPc, actuar como una quinasa de proteínas, proteína de serina/treonina con actividad fosfatasa, actividad catalítica y de unión a ATP, y está involucrada en la fosforilación y defosforilación de residuos aminoácidos proteicos. El gen AT2G20050.1 es expresado en *A. thaliana* durante diversas etapas del desarrollo, incluyendo floración, diferenciación y expansión de pétalos y en la maduración del embrión (Schweighofer *et al.* 2004; Xue *et al.* 2008), por lo cual, la expresión de una proteína asociada a este gen podría indicar procesos de diferenciación dentro de los verticilios florales.

Además, TFIIIA interactúa (STRING score 0.897) con RING/U-box superfamily protein (AT4G10150.1), en el ser humano y ratón (Rolland *et al.* 2014; Gontan *et al.* 2012). RING/U-box es una proteína que actúa como factor de unión a iones de Zn, capaz de actuar durante procesos de ubiquitinación y expresada en las células guardián como parte

de la respuesta a factores de estrés como altas temperaturas, frío y estrés oxidativo (Luhua *et al.* 2013), lo cual indica que TFIIIA constituye también un punto de comunicación con estrés abiótico.

Por último, TFIIIA interactúa (STRING score 0.871) con RPL5A, llamada 60S ribosomal protein L5-1 (AT3G25520.1). Esta proteína L5 es un componente ribosomal de unión al ribosoma 5S, estando involucrado en su exportación desde el núcleo hasta el citoplasma e involucrado en el patrón de tejido vascular en hojas y el destino celular adaxial (Chang *et al.* 2005; Carroll *et al.* 2007).

### ***Target of Monopteros 6***

En el estadio E6, el transcripto correspondiente al gen Target of Monopteros 6 (AT2G28510.1) se encuentra altamente sobreexpresado (logFC: 9.8), ver Figura 11B Este gen codifica para una proteína nuclear Dof zinc finger protein DOF2.1, un factor de transcripción dedos de Zn con un dominio DOF conservado (Moghaddas *et al.* 2018). En *Arabidopsis*, se han encontrado 37 genes DOF, que corresponden al 10% de todos los genes que codifican proteínas dedos de Zn (Riechmann y Ratcliffe 2000). DOF2.1 es expresado en las etapas preprocambiales en diferentes tejidos de la planta, tras lo cual restringe su expresión a los sitios del desarrollo de venas durante el desarrollo vegetal a nivel foliar en *A. thaliana* (Gardiner *et al.* 2010).

Las proteínas DOF de los grupos 1 y 7 son expresados en flores. Además, diversas proteínas de los grupos 2, 7, 8 son expresados en brotes florales (Noguero *et al.* 2013). Según Konishi y Yanagisawa (2007), las proteínas DOF 2.4 se expresan en las etapas del desarrollo procambial en *A. thaliana*. En ese sentido, su expresión podría relacionarse con el desarrollo vascular presente en el eje de la inflorescencia en el estadio E6 de *L. mutabilis*. En arroz, estas proteínas están relacionadas con la regulación del fitocromo (Iwamoto *et al.* 2009), estos complejos proteicos son capaces de regular la transición y desarrollo floral (Ward *et al.* 2005). También en maíz, DOF2 actúa como regulador metabólico al bloquear la transactivación del promotor de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa C4 (PEP C4) ejercida por DOF1, reprimiendo la expresión de PEP C4, por lo cual se especula que restringe su expresión en hojas (Noguero *et al.* 2013).

Estas proteínas controlan procesos biológicos que son exclusivos en vegetales, como el desarrollo vascular, la señalización a través del fitocromo, germinación de semillas, asimilación de N, procesos fotosintéticos y resistencia a factores de estrés (Moghaddas *et al.* 2018). Los transcritos de DOF se han encontrado sobrerrepresentados en brotes florales de cerezo dulce (*Prunus avium*) que se encontraban en dormancia (Vimont *et al.* 2019). En *Arabidopsis*, el gen relacionado DOF5.1, se ha encontrado sobreexpresado en hojas, tallos y raíces, lo cual puede indicar que este gen pertenece a una compleja de red de interacción que permite controlar diversos procesos de desarrollo a nivel vegetal (Hyung-Sae *et al.* 2010). Esto indica que este gen es capaz de actuar junto con otros genes, dando como resultado redes de interacción que deben ser estudiadas de forma más específica. Todo esto demuestra, la importancia de las proteínas DOF en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Otro de los transcritos cuya expresión está relacionada con Target of Monopteros, son los factores de transcripción Basic helix-loop-helix (bHLH) (AT4G29100). Según Heim *et al.* (2003) esta proteína nuclear se expresa durante diversas etapas de desarrollo en el tejido vascular. Además, su sobreexpresión ha sido relacionada con mayor sensibilidad a ABA (Le Hir *et al.* 2017). El gen BHLH68, de la misma familia, se ha encontrado diferencialmente expresado en las etapas de floración, diferenciación de pétalos y etapa de expansión floral (Schmid *et al.* 2005). La expresión de AT4G29100 ha sido asociada con la sobreexpresión de LIF2 y LHP1, dos genes expresados en tejidos vasculares y meristemáticos y relacionados con los procesos de floración, homeostasis del desarrollo floral y determinación del crecimiento del gineceo, las cuales regulan mediante mecanismos epigenéticos que involucran a los genes Polycomb Repressive Complexes (PRC) (Latrasse *et al.* 2011).

### ***Agamous like 30***

El transcritos correspondiente a Agamous like 30 (AGL30, AT2G03060.2), ver Figura 11C también mostró una sobreexpresión en el estadio E6 de *L. mutabilis* (logFC=5.8). Este gen codifica una proteína de la familia de reguladores transcripcionales MIKC (caja MADS, dominio de unión a queratina, y dominio C terminal). AGL30 es expresado en granos de polen, formando heterodímeros con otros miembros de la familia MICK (Liu *et al.* 2013). Estos genes son expresados en las etapas avanzadas de la maduración del

polen, en la que cumplen un rol esencial en la regulación transcripcional durante el desarrollo tardío (Verelst *et al.* 2007). En general, las proteínas *AGAMOUS/AG* actúan en la determinación del meristemo floral, así como en el desarrollo de los órganos reproductivos en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Su *et al.* 2018). En *Kerria japonica*, estos genes están involucrados en la formación de doble flor (Ma *et al.* 2018). En *Cymbidium sinense*, este gen ha sido involucrado con cambios florales relacionados con la aparición de variedades domesticadas (Su *et al.* 2018). Además, Verelst *et al.* 2007 reportó que AGL30 es capaz de interactuar con AGL65, AGL66, AGL104 para unirse a los motivos MEF2, permitiendo la germinación del polen. En tal sentido, la sobreexpresión de este gen en tarwi (Figura 8C) podría estar involucrada en la diferenciación, desarrollo y madurez de los estambres.

Por otro lado, la base de datos String reporta que AGL30 es capaz de interactuar con la proteína AT4G32820 (Pan *et al.* 2005), que está implicada en el desarrollo de peciolos y determinante de los patrones de ramificación. Según Duc *et al.* (2015), se demostró que este gen es capaz de alterar la arquitectura de la inflorescencia en mutantes de *Arabidopsis*, lo cual resaltaría su importancia en el desarrollo de la inflorescencia en tarwi.

### **Citoesqueleto**

La reorganización del citoesqueleto es uno de los procesos más importantes que acompañan al desarrollo floral. En particular, la actina está relacionada con la inducción floral (Kost y Chua 2002). Entre los procesos modulados, se encuentra la regulación y modulación del crecimiento del tubo polínico (Drøbak *et al.* 2004). La actina también está involucrada en los procesos de señalización presentes en el desarrollo floral al proveer un componente celular involucrado en el mantenimiento de la forma y estructura. Además, el citoesqueleto también puede actuar como un transductor de información de señal (Drøbak *et al.* 2004). De hecho, el citoesqueleto también funciona como una diana dinámica durante los eventos de señalización celular. Esta función es realizada en proteínas como Rho-GTPases presentes en los tubos polínicos, los eventos de autoincompatibilidad vegetal, la disrupción de la polimerización de los filamentos de actina por el Ca como segundo mensajero, y las respuestas gravitrópicas, contacto y respuesta a la gravedad (Drøbak *et al.* 2004).

Entre los genes asociados a citoesqueleto, se encuentra la familia de factores de transcripción *GATA type zinc finger transcription factor family protein*. Esta familia comprende factores de transcripción presentes en hongos, metazoos y plantas, que son capaces de reconocer la secuencia consenso WGATAR (Reyes *et al.* 2004). Esta proteína cumple un rol esencial en la regulación del desarrollo floral por fotoperíodo al interactuar con el regulador *CONSTANS (CO)* (Hayama and Coupland 2003). Además, los factores de transcripción GATA son capaces de regular el meristemo apical y el desarrollo floral en *Arabidopsis* (Zhao *et al.* 2004). En la Figura 11D-F, se observa que en el estadio E6 de *L. mutabilis*, los tres transcritos anotados como *GATA type zinc finger transcription factor family protein* estuvieron sobreexpresados (AT2G39900.1 con LogFC=8.7; AT3G61230.1 con LogFC=8.0; y AT3G61230.1 con LogFC=6.1). Este incremento puede indicar la respuesta de diversos elementos del citoesqueleto durante el desarrollo floral en tarwi. Además, podría indicar su importancia en procesos de señalización y respuesta a estímulos ambientales. De hecho, en arroz, la aplicación de estrés por salinidad, sequía y aplicación de ABA, ha demostrado los roles inherentes de GATA en la señalización por estrés abiótico (Gupta *et al.* 2017).

### **Otros genes diferencialmente expresados**

El transcritos anotado como AT1G13440.1 (Figura 11), estuvo sobreexpresado en el estadio E6 de *L. mutabilis* (LogFC=6.3). Este gen corresponde a *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2*, una enzima parte de la vía glucolítica. Esta enzima es una enzima reguladora de la glucólisis, y cataliza la conversión de gliceraldehído 3 fosfato a glicerol 3 fosfato (Holtgreffe *et al.* 2008), lo cual constituye un paso esencial para el mantenimiento de los niveles celulares de ATP y el metabolismo de carbohidratos (Guo *et al.* 2012). Este transcritos expresado en el citosol, núcleo, plastidios, y membrana plasmática, también tiene la capacidad de unirse al ADN *in vitro* (Guo *et al.* 2012; Holtgreffe *et al.* 2008). Este gen ha sido caracterizado dada su importancia en la producción de energía, regulación transcripcional, reparación de ADN, cascadas de transducción de señal y apoptosis (Hara *et al.* 2005; Kim and Dang 2005; Hara and Snyder 2006; Lee *et al.* 2009), expresándose en tejido vascular foliar joven, semillas, células vegetales en cultivo de tejidos, tejido vascular foliar, raíz y cotiledones (Aryal *et al.* 2017).

El estudio realizado por Muñoz-Bertomeu *et al.* (2010) demostró que la isoforma de esta enzima presente en los plastidios es necesaria para el desarrollo del polen en *Arabidopsis*, de manera que su ausencia conlleva a androesterilidad. Esto corrobora la importancia de la glucólisis en los plastidios en el metabolismo vegetal, especialmente en el desarrollo del polen (Muñoz-Bertomeu *et al.* 2010), por lo tanto, su sobreexpresión en el estadio E6 en *L. mutabilis* podría indicar la presencia de desarrollo de polen en los verticilos florales. Además, esta enzima parece estar implicada en los procesos de autofagia relacionados con la liberación del Citocromo C en respuesta a la activación de caspasas (Colell *et al.* 2007).

La proteína GA3PDH también ha sido involucrada en la respuesta a estrés en la señalización de especies reactivas de oxígeno (EROs) en *A. thaliana*, lo cual constituye una conexión directa entre la señalización lipídica, el metabolismo energético y el control del crecimiento en la respuesta vegetal a EROs y estrés hídrico (Guo *et al.* 2012). Tras evaluar los perfiles de expresión de AT1G13440 en diferentes órganos de *A. thaliana*, se encontró menor expresión en flores en comparación con la cantidad encontrada en hojas, raíces y tallos (Muñoz-Bertomeu *et al.* 2010), lo cual discrepa con los resultados encontrados en los brotes florales de *L. mutabilis* en el presente estudio. Sin embargo, su importancia no debe ser soslayada dado el hecho de que la limitación del metabolismo de carbohidratos, incluyendo la desregulación de GA3PDH en *A. thaliana* inhibe el desarrollo floral (Lauxmann *et al.* 2016). Por otra parte, en *Triticum aestivum*, la proteína GA3PDH se sobreexpresa en raíz, hojas y flores, manteniendo una expresión basal en otros tejidos. (Zeng *et al.* 2016). Tal es así, que AT1G13440 ha sido utilizado como un gen de referencia en estudios sobre expresión de diferentes genes en *A. thaliana* (Shkryl *et al.* 2021), lo cual resalta su importancia en la mantención del metabolismo basal en condiciones normales y de estrés.

En la Figura 11, el transcrito anotado como AT5G40770.1 estuvo altamente sobreexpresado (LogFC=11.9) en el estadio E6 de *L. mutabilis*. Este transcrito corresponde a *prohibitin 3* (PHB3), una proteína relacionada con la interacción hormonal. De hecho, la expresión de su ortólogo en *Medicago sativa* está relacionada con la modulación de la respuesta a etileno (Lorenzo *et al.* 2019). La pérdida de funcionalidad de este gen se relaciona con sensibilidad incrementada a etileno y exageración de la

respuesta a etileno en plántulas etioladas de *A. thaliana* (Matthew *et al.* 2007). En esta misma especie, PHB3 está relacionada con la división celular, estando sobreexpresada en líneas transgénicas para BnGRF2 (*Brassica napus growth-regulating factor 2-like gene*) (Liu *et al.* 2012). Esto podría indicar que PHB3 se encuentre involucrada con los procesos de respuesta a etileno y sobrerregulación de los genes de control de la división celular necesarios para el desarrollo de la inflorescencia en *L. mutabilis*.

El gen PHB3 ha sido estudiado por Wang *et al.* (2010), quienes encontraron que los mutantes de este gen son deficientes en la acumulación de óxido nítrico (NO) inducida por ácido abscísico, el cierre de estomas y la formación de raíces laterales inducida por auxinas. La señalización por NO ha sido relacionada con el proceso de floración, a través del gen CUE1 (encodes a chloroplast phosphoenolpyruvate/phosphate translocator), cuya pérdida de función ocasiona una mayor acumulación de NO, lo que conllevó a una floración tardía en *A. thaliana* (He *et al.* 2004).

Por otro lado, PHB3 es un homólogo de una prohibitina de levadura esencial para la supervivencia celular y asociada con la proteólisis por las proteasas Clp a nivel mitocondrial (Steglich *et al.* 1999). Esta proteína interactúa con un factor de transcripción AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15) que tiene importancia en el proceso de floración y se acumula a nivel del embrión en *A. thaliana* (Hill 2007). De hecho, las proteínas relacionadas *prohibitin-1* y *prohibitin-2* están involucradas en el desarrollo floral en *Petunia* (Chen *et al.* 2005). Las prohibitinas, además, están relacionadas con el mantenimiento de las flores, de manera que la depleción de prohibitinas PHB1 a nivel mitocondrial en *Petunia* ha sido relacionada con senescencia temprana de flores (Artal-Sanz y Tavernarakis 2009). De hecho, el silenciamiento de PHB1 y PHB2 ocasionó inhibición severa del crecimiento, amarillamiento de hojas, y necrosis, dado que las plantas fueron más susceptibles a diversos agentes de estrés oxidativo (Ahn *et al.* 2006).

Según Wang *et al.* (2010) y Yamada *et al.* (2020), PHB3 puede estar involucrado con el desarrollo y diferenciación de la raíz, dado que este gen es capaz de coordinar la división celular y la diferenciación en el meristemo radicular apical a través de la señalización dependiente de EROs. Además, este gen está relacionado con la señalización de brasinólidos, que controla la señalización de EROs que regula el mantenimiento de células madre en raíces (Lee *et al.* 2019). Este gen parece ser un regulador transcripcional

y de la expresión génica al interactuar con las proteínas At1g03860, At2g20530 y At4g28510 formando un complejo oligomérico de proteínas prohibitinas chaperoninas (Heazlewood *et al.* 2003).

En el estadio E6 de tarwi, el gen anotado como AT5G07990.1 fue sobreexpresado (Log FC=7.7) (Figura 11). Este gen corresponde a *Cytochrome P450 superfamily protein* (CYP75B1). Una proteína correspondiente a los grupos de Flavonoides e Interacción con hormonas como auxinas (Bowerman *et al.* 2012). Este transcripto codifica la enzima *flavonoid 3'-hydroxylase*, una enzima perteneciente a la ruta de los fenilpropanoides que produce la síntesis de miles de compuestos, incluyendo flavonoides, como los flavonoles, antocianidinas y taninos (Schoenbohm *et al.* 2000). Los transcriptos de esta enzima se acumulan en mayor medida en a nivel de tallo y flores en *Vitis vinifera*, y han sido relacionados con la producción de antocianinas en esta especie (Jeong *et al.* 2006). En *Camellia sinensis*, se ha demostrado que esta enzima es responsable de la acumulación de catequinas, especialmente a nivel de brotes, incrementando la cantidad de estos compuestos en las corolas de plantas transgénicas de tabaco (Wang *et al.* 2014). De hecho, en *Ginkgo biloba*, un homólogo de esta enzima ha sido responsable del incremento de la producción de epicatequina y galocatequina, habiéndose encontrado aumentada a nivel foliar en plantas de *Populus* con expresión heteróloga (Wu *et al.* 2020). Dado que la expresión de este gen está relacionada con la presencia de verticilios florales, como la corola, su sobreexpresión en el estadio E6 en *Lupinus mutabilis* podría indicar la aparición y el desarrollo de pétalos a nivel de las flores individuales (Wang *et al.* 2014). De hecho, se ha demostrado que en un estudio de expresión heteróloga en *Petunia hybrida*, la acumulación de antocianinas que proporcionan el color morado a los pétalos, está relacionada con la enzima *flavonoid 3'-hydroxylase* (Mori *et al.* 2004). Al tener coloración violácea, las flores de *L. mutabilis* podrían tener presencia de estos pigmentos, lo cual explicaría la sobreexpresión de esta enzima en el estadio E6 de *L. mutabilis*. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la expresión de las hidroxilasas de flavonoides es tejido-específica y depende del grado de desarrollo de la planta, tal como lo demuestra Vikhorev *et al.* (2019) en diversas líneas de *Hordeum vulgare*. Por lo cual es necesario realizar estudios que permitan confirmar la presencia de estos pigmentos a nivel de la corola en *L. mutabilis*.

Los genes de la familia CYP450 han sido investigados ampliamente en muchas plantas. Estas enzimas catalizan reacciones biosintéticas y fitoquímicas que producen metabolitos como fenoles, glucosinolate, fitohormonas, compuestos de señalización, terpenoides y flavonoides, además de ser responsables por la regulación de la homeostasis del metabolismo vegetal secundario y la comunicación cruzada entre moléculas señal (Ahmad *et al.* 2019). Además, en *A. thaliana*, existe un solo gen para la enzima *flavonoid 3'-hydroxylase*. Este gen está relacionado con CYP701A (At5g25900). El cual codifica una enzima involucrada con la síntesis de giberelinas, hormonas relacionadas con el desarrollo floral de las plantas (Yonekura-Sakakibara *et al.* 2019). Su importancia parece ser muy alta dado que variantes como CYP78A9 está involucrada en el desarrollo reproductivo en *A. thaliana*, controlando el desarrollo del polen, del integumento de los óvulos, fenómenos de androesterilidad, y maduración del fruto (Sotelo-Silveira *et al.* 2013).

En la Figura 11, el transcripto *CLP protease regulatory subunit CLPX1, mitochondrial isoform XI [Lupinus angustifolius]* es una proteasa sobreexpresada (LogFC=8.1) en el estadio E6 de *L. mutabilis*. Esta proteína tiene especificidad dependiente de ATP, además, dirige la proteasa a los sustratos específicos (Adam *et al.* 2001). El sistema de proteasas CLP (*caseinolytic protease*), constituye el sistema de proteasas solubles más abundante y complejo en los plastidos, consistiendo de 15 miembros codificados por genes nucleares y un miembro codificado por gen de plastidos en *Arabidopsis* (Olinares *et al.* 2011).

El sistema Clp cumple un rol esencial en el desarrollo del cloroplasto de *Arabidopsis* nivel del embrión, así como en hojas (Olinares *et al.* 2011). Los miembros de la familia Clp están localizados en el estroma con asociación a las membranas del cloroplasto, en particular las chaperonas ClpC que interactúan con el complejo de traslocación de proteínas de la cubierta interna (Adam *et al.* 2006). Estas proteasas están involucradas en un número de procesos celulares como la degradación de proteínas mal plegadas, regulación de proteínas de vida corta, y remoción constitutiva de proteínas disfuncionales. Las proteasas Clp también están implicadas en el control del crecimiento celular, teniendo como diana a las proteínas de unión al ADN de células (Ekici *et al.* 3003). La maquinaria Clp tiene dos componentes oligoméricos: 1) un núcleo de proteasas tetradecamérico con forma de barril con los sitios catalíticos secuestrados dentro del complejo; y 2) chaperonas dependientes de ATP hexaméricos similar a anillos. Las chaperonas reconocen sustratos

específicos con o sin la ayuda de adaptadores, desdoblan estos sustratos y los traslocan en el núcleo proteolítico para degradación. De esta manera, cumple un rol esencial en la proteostasis de organelos eucariotas (Striebel *et al.* 2009).

En particular, ClpX corresponde a una chaperona dirigida por ATP. Esta chaperona participa activamente en la proteólisis controlada, reconociendo a los sustratos proteicos grandes y translocándolos en un estado desplegado en la cámara proteolítica ClpP (Andersson *et al.* 2009). Las proteínas ClpX han evolucionado notoriamente en plantas, presentando dos parálogos exclusivos de plantas superiores (Peltier *et al.* 2004). Dado que este gen está relacionado al crecimiento celular, su sobreexpresión podría estar relacionada con los procesos de diferenciación que se dan en el desarrollo floral, así como un mecanismo de protección para disminuir las proteínas mal plegadas.

El transcripto AT3G21700.3 mostró sobreexpresión (FC=5.5) en los estadios E6 de *L. mutabilis* (Figura 11). Este gen corresponde a una proteína Ras-related small GTP-binding family protein relacionado con la transducción de señal. Las proteínas GTPasas pequeñas tienen masas de 21 a 30 kD, son proteínas monoméricas de unión a nucleótidos de guanina relacionados a la subunidad alfa de las proteínas G heterodiméricas (Yang 2002). Según Bedhomme *et al.* (2009), este gen también se expresa durante el desarrollo del polen y en el ápice del tubo polínico. Dada la sobreexpresión de este gen (Figura 11), el transcripto AT3G21700.3 estaría asociado a la presencia de polen en las flores basales de la inflorescencia, como se pudo describir para la Figura 8.

En la Figura 11, se puede observar que el transcripto AT3G49430.2 (SR34a) estuvo subexpresado (LogFC=-5.5) en el estadio E6 de desarrollo de la inflorescencia de *L. mutabilis*. Este transcripto corresponde a la proteína SER/ARG-rich protein 34A (SR34a), proteína con un peso de 34KDa, con participación en el splicing de ARN (Dagher and Fu 2001). Esta proteína está involucrada en el esplicing alternativo mediado por fitocromo, en respuesta a la luz (Shikata *et al.* 2014).

Estos factores de esplicing ricos en Ser-Arg son fosforilados por proteínas quinasas de SR, modulando la ubicación subcelular, ensamblaje del espliceosoma y el esplicing de ARNm (Mathew *et al.* 2008). Durante la floración, la isoforma 4 de SR34a es más abundante en polen según Palusa *et al.* (2007). Además, Xu *et al.* (2018), propone que

SR34a es afectado por Lc-miR172a-3p, al estar involucrado en la señalización de auxina y el desarrollo de frutos (Xu *et al.* 2018).

SR34a es uno de los siete productos generados por el preARNm de SR34. La expresión de estas variantes génicas es regulada de una manera tejido, órgano y temperatura-específica, constituyendo un mecanismo no autorregulatorio usado para controlar la longitud de la proteína a nivel transcripcional, presente tanto en vegetales, como en animales (Anireddy 2004; Nakagawa *et al.* 2005).

La sobreexpresión de SR34 es reducida por la sobreexpresión de otras proteínas como SR30, afectando el sitio y patrón de esplicing, lo cual afecta la morfología y el desarrollo de plantas transgénicas (Lopato *et al.* 1999). Los dominios RS presentes en las proteínas SR actúan como un dominio de interacción proteína-proteína, lo cual influencia la localización de las proteínas SR y su interacción con otros factores de esplicing que involucran proteínas SR (Isshiki *et al.* 2006). Al estar involucrados en el esplicing alternativo, la expresión de SR34 es afectada por la luz y el esplicing alternativo de genes reguladores de esplicing (Cheng *et al.* 2018). También se ha demostrado que SR34 interactúa con PK12, una proteína de respuesta a etileno (Savaldi *et al.* 2000).

Por otro lado, el estrés por calor durante la floración tiene un efecto perjudicial sobre el rendimiento de semillas, principalmente debido a una reducción del número de semillas. La alteración del tiempo de floración es un mecanismo evolutivo adoptado por las plantas para evitar este problema (Kazan and Lyons 2016). Por otro lado, se ha demostrado el rol crucial de las proteínas DNAJ en el crecimiento, desarrollo, regulación hormonal y aclimatación a estrés abiótico (Bekh-Ochir *et al.* 2013; Boonsirichai *et al.* 2003; Christensen *et al.* 2002; Harrison *et al.* 2008; Park *et al.* 2011; Park *et al.* 2014). Teniendo en cuenta que la inflorescencia no estuvo sometida a factores de estrés, es natural que el transcripto AT1G76700.1 que corresponde a HSP DNAJ heat shock N-terminal domain containing protein mostró downregulación (LogFC=-8.3) en el estadio E6 de *L. mutabilis*.

Las proteínas DNAJ son cochaperonas que actúan junto a HSP70 para controlar la homeostasis de proteínas (Pulido and Leister 2018). En *A. thaliana*, las proteínas DNAJ han sido descritas con funciones ejemplares como la regulación de la bomba de protones ATPasa de la membrana plasmática, y la integración de señales de floración al interactuar

con SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) regulando la expresión de genes de regulación de rutas de floración integrales FLOWERING LOCUS T (FT) and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1) (Shen *et al.* 2011). Shen *et al.* (2011) encontraron que la pérdida de función de las proteínas con dominio J retarda significativamente el crecimiento al atenuar la capacidad de unión de SVP a las secuencias regulatorias SOC1 y FT, lo que sugiere que estas proteínas perciben las señales de floración de diferentes vías metabólicas y promueven la floración a través de un antagonismo directo con la actividad SVP en la represión de la transcripción de SOC1 y FT durante la transición floral.

## V. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones que se realizó el presente trabajo de investigación se puede concluir lo siguiente:
- La accesión de alto potencial que presentó los parámetros de selección más favorables fue la accesión 11: precocidad con menos de 95 días a la floración, peso de 100 semillas y mejor porcentaje de sobrevivencia a estrés hídrico con 50 %, tamaño de semillas, contenido de proteínas y un adecuado nivel de microelementos (Zn, Mn, Fe).
- La caracterización morfológica de las yemas florales de la accesión 11 mostró que hay diferencias entre estadios E2, E4 y E6; en base a la altura, diámetro y peso. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los estadios E2 y E4 respecto a la altura y diámetro. Los estadios E4 y E6 se utilizaron para el análisis de RNA-seq.
- El secuenciamiento de ARN total mediante RNA-seq de Illumina demostraron 2340 genes diferencialmente expresados (1443 genes sobreexpresados y 897 genes subexpresados). Con respecto a Proceso Biológico (584 genes sobreexpresados y 84 genes subexpresados), Componentes Celulares (782 genes sobreexpresados y 228 genes subexpresados) y Función Molecular (877 genes sobreexpresados y 156 genes subexpresados).
- Las rutas metabólicas para el desarrollo de la inflorescencia fueron: Biosíntesis de metabolitos secundarios, Biosíntesis de fenilpropanoides, Interconversiones de Pentosa y glucuronato, Metabolismo de aminoazúcares y azúcares de nucleótidos, Metabolismo de almidón y sacarosa, Biosíntesis de flavonoides, Biosíntesis de cera, suberina y cutina, Biosíntesis de gingerol, estilbenoide y diarilheptanoide.
- Los genes mas importantes diferencialmente expresados el desarrollo de la inflorescencia en tarwi fueron *factor de transcripción IIIA*, *diana de monópteros*

6, *AGAMOUS-LIKE30*, proteína de la familia de dedos de zinc tipo GATA  
*Glyma.05G205800*, proteína de la familia de dedos de zinc tipo GATA  
*Glyma.07G073600*, proteína de la familia de dedos de zinc tipo GATA,  
*Glyma.18G230400*, proteína de la familia de unión pequeña a GTP relacionada  
con Ras, proteína 34A rica en SER / ARG, proteína de la superfamilia del  
citocromo P450, prohibitina 3, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa C2,  
proteína que contiene dominio de choque térmico DNAJ N-terminal e isoforma  
mitocondrial XI de la subunidad reguladora de proteasa CLP CLPX1.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar el secuenciamiento genómico de otros estadios fenológicos durante la floración en *Lupinus mutabilis* permitirá determinar los genes involucrados en el llenado de granos, tolerancia a estreses bióticos y abióticos que afectan el crecimiento y desarrollo de las inflorescencias, así como, generar estrategias de mejoramiento biotecnológicas que permitan evaluar y aplicar la acción de estos genes.
- Es muy importante el estudio y análisis posterior a profundidad de toda la data generada en esta tesis, que permita seleccionar genes que puedan ser utilizados en programas futuros de mejoramiento genético de *Lupinus mutabilis*.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam Z., Rudella A., Van Wijk K. 2006. Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 234-240.
- Adam Z., Adamska I., Nakabayashi K., Ostersetzer O., Haussuhl K., Manuell A., Zheng B., Vallon O., Rodermel S.R., Shinozaki K., Clarke A.K. 2001. Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. 2001. *Plant Physiol.* 125:1912-1918.
- Ahmad N., Jianyu L., Xu T., Noman M., Jameel A., Na Y., Yuanyuan D., Nan W., Xiaowei L., Fawei W., Xiuming L., Haiyan L. 2019. Overexpression of a Novel Cytochrome P450 Promotes Flavonoid Biosynthesis and Osmotic Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Genes (Basel)* 10(10):756.
- Ahn C.S., Lee J.H., Reum A., Kim W.T., Pai H.S. 2006. Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants. *Plant J.* 2006 May;46(4):658-67.
- Amasino R. M. 1996. Control of flowering time in plants. *Current opinion in genetics & development*, 6(4), 480–487.
- Amasino, R.M. 2005. Vernalization and flowering time. *Current opinion in biotechnology* 16: 154-158.
- Amasino, R.M. 2010. Control of flowering time in plants. *Current opinion in Genetic and Development*. 6:480-487.
- Andersson F., Tryggvesson A., Sharon M., Witt S., Mogk A., Adrian K. 2004. Protein synthesis, post-translational modification, and degradation. *284(20):* 13519-13532.
- Andres F., Coupland G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13: 627–639.
- Anireddy S. 2004. Plant serine/arginine-rich proteins and their role in pre-mRNA splicing. *TRENDS in Plant Science* 9(11): 0–547.
- Artal-Sanz M., Tavernarakis N. 2009. Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab.* 20(8):394-401.

- Aryal U., McBride Z., Chen D., Xie J., Szymanski D. 2017. Analysis of protein complexes in *Arabidopsis* leaves using size exclusion chromatography and label-free protein correlation profiling. *J Proteomics*. Aug 23; 166:8-18.
- Ausin, I., Alonso-Blanco, C., & Martínez-Zapater, J. 2005. Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology*, 49(5/6), 689.
- Barrera, E. 2015. Evaluación del frijol lupinus (*Lupinus mutabilis*) como abono verde para la producción agroecológica en el municipio de Subachoque en Cundinamarca. Corporación universitaria minuto de Dios Facultad de ingeniería. Bogotá.
- Bedhomme M., Mathieu C., Pulido A., Henry Y., Bergounioux C. 2009. *Arabidopsis* monomeric G-proteins, markers of early and late events in cell differentiation. *The International Journal of Developmental Biology* 53(1): 177-185.
- Bekh-Ochir D., Shimada S., Yamagami A., Kanda S., Ogawa K., Nakazawa M., Matsui M., Sakuta M., Osada H., Asami T. 2013. A novel mitochondrial DnaJ/Hsp40 family protein BIL2 promotes plant growth and resistance against environmental stress in brassinosteroid signaling. *Planta*, 237: 1509–1525.
- Benedikt K., Nam-Hai C. 2002. The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference. *Cell*. 108: 9–12,
- Berbel T. 2005. Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo floral de guisante (*Pisum sativum* L.) en sistemas heterólogos. Universitat de Valencia. Tesis.
- Behailu B. 2008. The control of *Arabidopsis thaliana* flowering time by the Calcium. *Plant Physiology*, 139(1), 174–185.
- Bioversity International. 2010. Geographical distribution of the Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet).
- Birhanu B. 2008. The Control of *Arabidopsis thaliana* Flowering Time by the Calcium Binding Protein-22/Calmodulin-like 10 Gene. Ben-Gurion University of the Negev. Tesis.
- Blázquez M., Koornneef M., Putterill J. 2001. Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO reports*. 21, 1078-1082.

- Blázquez, M. A., & Weigel, D. 2000. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*, 404(6780), 889–892.
- Boonsirichai K., Sedbrook J., Chen R., Gilroy S., Masson P. 2003. Altered response to gravity is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell*. 15, 2612–2625.
- Bowerman P., Ramirez M., Moore M., Helm R., Winkel B. 2012. Analysis of T-DNA alleles of flavonoid biosynthesis genes in *Arabidopsis* ecotype Columbia. *BMC RESEARCH NOTES* 5(1): 485.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Camarena F., Huaranga A., Jiménez J., Mostacero E. 2012. Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Primera Edición. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina-Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). 222 pp.
- Carmel-Goren L., Liu Y., Lifschitz E., Zamir D. 2003. The SELF-PRUNING gene family in tomato. *Plant Mol Biol* 52: 1215–1222.
- Carroll A., Heazlewood J., Ito J., Millar H. 2007. Towards understanding translational control: Systematic analysis of the *Arabidopsis* cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its protein complement and their post-translational modification. 18<sup>th</sup> International Conference on *Arabidopsis* research.
- Castañeda M. 1988. Estudio comparativo de 10 variedades de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) conducidos en dos ambientes de la sierra, norte y centro del Perú. Tesis Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.
- Castañeda B., Manrique R., Gamarra F., Muñoz A., Ramos F., Lizaraso F. 2008. Probiótico elaborado en base a las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho or tarwi) seeds. *Acta Médica Peruana* 25: 210-215.
- Chang I., Szick-Miranda K., Pan S., Bailey-Serres J. 2005. Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes. *Plant Physiology*. 137(3): 848.
- Chen J., Jiang C., Reid M. 2005. Silencing a prohibitin alters plant development and senescence. *Plant J*. 44(1):16-24.

- Cheng Y., Tu S. 2018. Alternative Splicing and Cross-Talk with Light Signaling. *Plant Cell Physiol.* 2018 Jun 1;59(6):1104-1110. doi: 10.1093/pcp/pcy089. Erratum in: *Plant Cell Physiol.* 59(8):1695.
- Christensen C., Gorsich S., Brown R., Jones L., Brown J., Shaw J., Drews G. 2002. Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14, 2215–2232.
- Chirinos-Arias, M. C., Jiménez, J. E., & Vilca-Machaca, L. S. (2015). Analysis of Genetic Variability among thirty accessions of Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) using ISSR molecular markers. *Scientia Agropecuaria*, 17–30.
- Clements J., Prilyuk L., Quealy J., Francis G. 2008. Interspecific crossing among the new world lupin species for *L. mutabilis* crop improvement. IN Proceedings of the 12th International Lupin Conference, Lupins for Health and Wealth. Fremantle, Western Australia. (Eds J.A. Palta and J.D. Berger).
- Colell A., Ricci J., Tait S., Milasta S., Maurer U., Bouchier-Hayes L., Fitzgerald P., Guio-Carrion A., Waterhouse N., Li C. 2007. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129: 983–997.
- Costa-Silva J., Domingues D., Lopes F. 2017. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE* 12(12): e0190152.
- Curtis D., Tanner J., Luzzi B., Hume D. 2000. Agronomic and phenological differences of soybean isolines differing in maturity and growth habit. *Crop Sci* 40: 1624–1629.
- Dagher S., Fu X. 2001. Evidence for a role of Sky1p-mediated phosphorylation in 3' splice site recognition involving both Prp8 and Prp17/Slu4. *RNA* 7: 1284–1297.
- Denay, G., Chahtane, H., Tichtinsky, G., & Parcy, F. 2016. A flower is born: an update on *Arabidopsis* floral meristem formation. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 15–22.
- Drøbak B., Franklin-Tong V., Staiger C. 2004. The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytologist* 163: 13–30.
- Drummond C., Eastwood R., Miotto S., Hughes C. 2012. Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): testing for key innovation with incomplete taxon sampling. *Systematic Biology* 61: 443–460.

- Duc C., Benoit M., Le Goff S., Simon L., Poulet A., Cotterell S., Tatout C., Probst A. 2015. The histone chaperone complex HIR maintains nucleosome occupancy and counterbalances impaired histone deposition in CAF-1 complex mutants. *Plant J.* 81(5): 707-22.
- Ekici O., Paetzel M., Dalbey R. 2008. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci.* 17, 2023-37.
- Eastwood, R.J. & Hughes, C.E. 2008. Origins of domestication of *Lupinus mutabilis* in the Andes. Pp.373-379, in: Palta, J.A. & Burger, J.B. (Eds.) *Lupins for Health & Wealth*, Proceedings 12<sup>th</sup> International Lupin Conference, Fremantle, Australia, International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Fernández-Nohales, P., Doménech, M. J., Hanzawa, Y., Bradley, D., & Madueño, F. 2016. Separate elements of the TERMINAL FLOWER 1 cis-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity. *Development*, 143(18), 3315–3327.
- Filichkin S., Priest H., Givan S., Shen R., Bryant D., Fox S., Wong W., Mockler T. 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 20(1): 45-58.
- Franklin, K. A., Larner, V. S., & Whitelam, G. C. 2005. The signal transducing photoreceptors of plants. *The International journal of developmental biology*, 49(5-6), 653–664.
- Gardiner J., Sherr I., Scarpella E. 2010. Expression of DOF genes identifies early stages of vascular development in *Arabidopsis* leaves. *Int. J. Dev. Biol.* 54:1389-1396.
- Gontan C., Achame E., Demmers J., Barakat T., Rentmeester E., van IJcken W., Grootegoed J., Gribnau J. 2012. *Nature*. 485(7398): 386-90.
- Gottesman S., Clark W., de Crecy-Lagard V., Maurizi M. 1993. ClpX, an Alternative Subunit for the ATP-dependent Clp Protease of *Escherichia coli* sequence and in vivo activities. *The Journal of Biological Chemistry* 268(30): 2261-2626.
- Griffiths S., Dunford R., Coupland G., Laurie D. 2003. The evolution of CONSTANS-like gene families in barley, rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 1–13.

- Guo L., Devaiah S., Narasimhan R., Pan X., Zhang Y., Zhang W., Wang X. 2012. Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase Ddelta to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress. *Plant Cell* 24: 2200-2212.
- Gupta P., Nutan K., Singla-Pareek S., Pareek A. 2017. Abiotic Stresses Cause Differential Regulation of Alternative Splice Forms of GATA Transcription Factor in Rice. *Front Plant Sci.* 13(8): 1944.
- Hackbarth J. 1936. Versuche über photoperiodismus III. *Zücher* 8: 81-92.
- Hara M., Agrawal N., Kim S., Cascio M., Fujimuro M., Ozeki Y., Takahashi M., Cheah J., Tankou S., Hester L. 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* 7: 665–674.
- Hara M., Snyder S. 2006. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cell Mol Neurobiol* 26: 527–538.
- Harrison B., Masson P. 2008. ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J.* 53: 380–392.
- Hayama R., Coupland G. 2003. Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol.* 6(1):13-9.
- Hayama R., Yokoi S., Tamaki S., Yano M., Shimamoto K. 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422: 719–722.
- He Y., Tang R., Hao Y. 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305: 1968–1971.
- Heazlewood J., Howell K., Millar A. 2003. Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim Biophys Acta* 1604(3):159-69.
- Hecht V., Foucher F., Ferrandiz C., Macknight R., Navarro C., Morin J. 2005. Conservation of *Arabidopsis* Flowering Genes in Model Legumes. *Plant Physiology* 2005(137): 1420–1434.
- Heim M., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P. 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution* 20(5): 735.

- Hidalgo Rodríguez, JEM. 2021. Transcriptoma de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) sometido a estrés hídrico. Tesis para optar el Grado de Maestro Magister Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas. Universidad Nacional Agraria la Molina
- Hill K. 2007. Identification and characterization of proteins that interact with agamous-like 15 (AGAMOUS-like 15 (AGL15), a MADS-domain transcription factor that preferentially accumulates in the plant embryo. University of Kentucky Doctoral Dissertations. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the College of Agriculture at the University of Kentucky.
- Holtgreffe S., Gohlke J., Starmann J., Druce S., Klocke S., Altmann B., Wojtera J., Lindermayr C., Scheibe R. 2008. Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol. Plantarum* 133:211-228.
- Huyghe C. 1998. Genetics and genetic modifications of plant architecture in grain legumes: a review. *Agronomie* 18: 383–411.
- Hyung-Sae K., Jin S., Abbasi N., Bressan R., Dae-Jin Y., Sang-Dong Y., Suk-Yun K., Sang-Bong C. 2010. The DOF transcription factor Dof5.1 influences leaf axial patterning by promoting *Revoluta* transcription in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 64(3): 524-535.
- INIAP. 1997. Zonificación potencial del cultivo de chocho. Proyecto P-BID-206. Programa Nacional de Leguminosas, INIAP. Fundacyt. Quito. 30 pp.
- Irish, V. F. 2010. The flowering of *Arabidopsis* flower development. *The Plant Journal*, 61(6), 1014–1028.
- Isshiki M., Tsumoto A., Shimamoto K. 2006. The serine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *The Plant cell*, 18(1): 146–158.
- Iwamoto M., Higo K., Takano M. 2009. Circadian clock- and phytochrome-regulated Dof-like gene, *Rdd1*, is associated with grain size in rice. *Plant Cell Environ.* 32(5):592-603.
- Jack T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16(Suppl): S1–S17.

- Jacobsen S., Mujica A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés. 2006: 458-482.
- Jeong S., Goto-Yamamoto N., Hashizume K., Esakaa M. 2006. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). Plant Science 170(1): 61-69.
- Junovich, Analia. 2003. El cultivo del chocho según el Tercer Censo Nacional Agropecuario Proyecto SICA. Quito: Proyecto SICA-Banco Mundial.
- Kazan K., Lyons R. 2016. The link between flowering time and stress tolerance, Journal of Experimental Botany 67(1): 47–60.
- Kim J., Dang C. 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. Trends Biochem Sci 30: 142–150.
- Komeda Y. 2004. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. Annu Rev Plant Biol 55: 521-535.
- Konishi M., Yanagisawa S. 2007. Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*, Plant Physiol. Biochem. 45: 623–629.
- Krizek B., Fletcher J. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. Nat. Rev. Genet. 6: 688–698.
- Latchman D. 2008. CHAPTER 4 - Families of DNA binding transcription factors. in Eukaryotic Transcription Factors (5<sup>th</sup> edition). 96-160 pp.
- Latrasse D., Germann S., Houba-Hérin N., Dubois E., Bui-Prodhomme D., Hourcade D., Juul-Jensen T., Le Roux C., Majira A., Simoncello N., Granier F., Taconnat L., Renou J., Gaudin V. 2011. Control of flowering and cell fate by LIF2, an RNA binding partner of the polycomb complex component LHP1. PLoS One. 6(1): e16592.
- Lauxmann M., Annunziata M., Brunoud G., Wahl V., Koczut A., Burgos A., Olas J., Maximova E., Abel C., Schlereth A., Soja A., Bläsing O., Lunn J., Vernoux T., Stitt M. 2016. Reproductive failure in *Arabidopsisthaliana* under transient carbohydrate limitation: flowers and very young siliques are jettisoned and the meristem is maintained to allow successful resumption of reproductive growth. Plant Cell Environ. 39(4):745-67.

- Le Hir R., Castelain M., Chakraborti D., Moritz T., Dinant S., Bellini C. 2017. AtbHLH68 transcription factor contributes to the regulation of ABA homeostasis and drought stress tolerance in *Arabidopsisthaliana*. *Physiol Plant*. 160(3):312-327
- Lee M., Ha S., Kim J., Koh A., Lee C., Kim J., Jeon H., Kim D., Suh P., Ryu S. 2009. Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol Cell Biol* 29: 3991–4001
- Lee Y. 2019. Redox Control on Stem Cell Fate and Maintenance in the Root. *J. Plant Biol*. 62: 320–328.
- Lezama B.P. 2010. Las Especies de *Lupinus L.* (Fabaceae) y de sus simbioses en el distrito djue Corongo-Ancash. Tesis de para optar el grado de Doctor. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos
- Liu Y., Cui S, Wu F., Yan S., Lin X., Du X., Chong K., Schilling S., Theißen G., Meng Z. 2013. Functional conservation of MIKC\*-Type MADS box genes in *Arabidopsis* and rice pollen maturation. *Plant Cell*. 25(4):1288-303.
- Liu J., Hua W., Yang H., Zhan G., Li R., Deng L., Wang X., Liu G. Wang H. 2012. The BnGRF2 gene (GRF2-like gene from *Brassica napus*) enhances seed oil production through regulating cell number and plant photosynthesis. *Journal of experimental botany* 63(10): 3727–3740.
- Lohmann J., Weigel D. 2002. Building beauty: the genetic control of floral patterning. *Dev. Cell* 2: 135–142.
- Lopato S., Kalyna M., Dorner S., Kobayashi R., Krainer A., Barta A. 1999. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsisthaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev*. 13: 987–1001.
- Lorenzo C., Alonso I., Sanchez M., Antonietti M., Garcia P., Hernando C., Dezar C., Vazquez M., Casal J., Yanovsky M., Cerdán P. 2019. Shade delays flowering in *Medicago sativa*. *Plant J*. 99(1): 7-22.
- Luhua S., Hegie A., Suzuki N., Shulaev E., Luo X., Cenariu D., Ma V., Kao S., Lim J. 2013. Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiol Plant*. 148(3):322-33.
- Ma J., Shen X., Liu Z., Zhang D., Liu W., Liang H., Wang Y., He Z., Chen F. 2018. Isolation and Characterization of AGAMOUS-Like Genes associated with

- double-flower morphogenesis in *Kerria japonica* (Rosaceae). *Frontiers in plant science* 9: 959.
- Major D., Johnson D., Tanner J., Anderson L. 1975. Effects of daylength and temperature on soybean development. *Crop Science* 15:174-185.
  - Marschner M. 2007. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. Academic Press, London, UK.
  - Martínez-García J., Coupland G., Dean C., Koornneef M. 2002. The transition to flowering in *Arabidopsis*. En: “*Arabidopsis*”. Eds. E.M. Meyerowitz, C. R. Somerville. Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, NY. 403-433.
  - Mathew R., Hartmuth K., Möhlmann S., Urlaub H., Ficner R., Lührmann R. 2008. Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(2008): 435-443.
  - Mathieu O., Yukawa Y., Prieto J., Vaillant I., Sugiura M., Tourmente S. 2003. Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research* 31(9): 2424–2433.
  - Matthew J., Paul B. 2007. Mutational loss of the prohibitin AtPHB3 results in an extreme constitutive ethylene response phenotype coupled with partial loss of ethylene-inducible gene expression in *Arabidopsis* seedlings, *Journal of Experimental Botany* 58(8): 2237–2248.
  - Michaels S., Amasino R. 2000. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant, Cell and Environment* 23: 1145-1153.
  - Mir Moreno, R. 2013. Caracterización molecular y funcional del gen PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1 (PCC1) en *Arabidopsis thaliana* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
  - Moghaddas S., Hamzeh-Mivehroud M., Silva A., Walshe J., Mohammadi S., Rahbar-Shahrouziasl M., Abbasi M., Jamshidi O., Low J., Dastmalchi S., Mackay J. 2018. Expression, purification and DNA-binding properties of zinc finger domains of DOF proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Bioimpacts* 8(3):167-176.
  - Mori S., Kobayashi H., Hoshi Y., Kondo M., Nakano M. 2004. Heterologous expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida*. *Plant Cell Rep.* 22(6): 415-21.

- Mouradov A., Glassick T., Hamdorf B., Murphy L., Fowler B., Marla S., Teasdale R. 2002. NEEDLY, a *Pinus radiata* ortholog of FLORICAULA/LEAFY genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 6537-6542.
- Movafeghi, A., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S., & Dadpour, M. R. 2010. Ontogenetic Variation of Total Phenolics and Antioxidant Activity in Roots, Leaves and Flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). *BioImpacts* : BI, 2(2), 105–109.
- Mujica A. 1990. Investigación y producción del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el Perú. INIAA-PICA, Puno, Perú. 49 pp.
- Mujica A. 1994. Neglected Crops of Incas. Bermejo, H. & León, J. (ed.). *Plant Production and Protection*. FAO, Roma, Italia. 26: 131-148.
- Muñoz-Bertomeu J., Cascales-Miñana B., Irlles-Segura A., Mateu I., Nunes-Nesi A., Fernie A., Segura J., Ros R. 2010. The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 152(4):1830-41.
- Nagalakshmi U., Waern K., Snyder M. 2010. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. *Current Protocols in Molecular Biology* 81(1): 1-13.
- Nakagawa O., Arnold M., Nakagawa M. 2005. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes Dev*. 19 (2005): 2066-2077.
- Noguero M., Atif R., Ochatt S., Thompson R. 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Sci*. 209:32-45.
- Noguero M., Atif R., Ochatt S., Thompson R. 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science* 209(1): 32–45.
- Olinares P., Kim J., van Wijk K. 2011. The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochim Biophys Acta*. 1807(8): 999-1011.

- Ortega-David, E., A. Rodríguez, A. David y A. Zamora-Burano. 2010. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica* 59: 111-118.
- Oumer A., Petros, Y., Tesfaye, K., Teshome, A., & Bekele, E. 2015. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of Ethiopian white lupine (*Lupinus albus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 14(18), 1552–1563.
- Palacios A., Salazar D., Espinoza L. Arzate A. 2004. Obtencion a partir de alcohol a partir de la malta de *Lupinus mutabilis*. Informe fPARRinal de la Universidad del Centro del Perú.
- Pan, F., Means, A. R., & Liu, J. O. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates nuclear export of Cabin1 during T-cell activation. *The EMBO Journal*, 24(12), 2104–2113. doi:10.1038/sj.emboj.7600685
- Park H., Lee S., Seok H., Kim S., Sung Z., Moon Y. 2011. EMF1 Interacts with EIP1, EIP6 or EIP9 Involved in the Regulation of Flowering Time in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 52: 1376–1388.
- Park M., Kim S. 2014. The *Arabidopsis*J Protein AtJ1 is Essential for Seedling Growth, Flowering Time Control and ABA Response. *Plant Cell Physiol.* 55: 2152–2163.
- Pasha A., Subramaniam S., Cleary A., Chen X., Berardini T., Farmer A., Town C., Provart N. 2020. Araport Lives: An Updated Framework for Arabidopsis Bioinformatics. *Plant Cell.* 32(9):2683-2686.
- Parra-González, L. B., Aravena-Abarzúa, G. A., Navarro-Navarro, C. S., Udall, J., Maughan, J., Peterson, L. M., ... Maureira-Butler, I. J. 2012. Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies. *BMC Genomics*, 13(1), 425.
- Peltier, J.-B., Ripoll, D. R., Friso, G., Rudella, A., Cai, Y., Ytterberg, J., ... van Wijk, K. J. 2004. Clp Protease Complexes from Photosynthetic and Non-photosynthetic Plastids and Mitochondria of Plants, Their Predicted Three-dimensional Structures, and Functional Implications. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4768–4781.
- Petterson D., Sipsas S., Mackintosh J. 1997. *The Chemical Composition and Nutritive Value of Australian Grain Legumes (2nd Ed.)*. Grains Research and Development Corporation, Canberra, Australia.

- Prenner, G. 2013. Flowers of the early-branching papilionoid legume *Petaladenium urceoliferum* display unique morphological and ontogenetic features. *American Journal of Botany*, 102(11), 1780–1793.
- Proaño, A. 2011. Regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo de *lupinus mutabilis* (chocho andino) in vitro. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias, ESPE-IASA I. Sede El Prado.
- Pulido P., Leister D. 2018. Novel DNAJ-related proteins in *Arabidopsisthaliana*. *New Phytol.* 217(2):480-490.
- Kim, J. H., Kim, B., Cai, L., Choi, H. J., Ohgi, K. A., Tran, C., Chen, C., Chung, C. H., Huber, O., Rose, D. W., Sawyers, C. L., Rosenfeld, M. G., & Baek, S. H. 2005. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature*, 434(7035), 921–926.
- Rahman M., Gladstones J. 1974. Effects of temperature and photoperiod on flowering and yield components of lupin genotypes in the field. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 14: 205-213.
- Reyes J., Muro-Pastor M., Florencio F. 2004. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology* 134(4): 1718–1732.
- Riechmann J., Ratcliffe O. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol.* 3(5):423-34.
- Rieu I., Ruiz-Rivero O., Fernandez-Garcia N., Griffiths J., Powers S. J., Gong F., Linhartova T., Eriksson S., Nilsson O., Thomas S., Phillips A. Hedden P. 2008. The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *Plant Journal* 53: 488-504.
- Ripoll D., Friso G., Rudella A., Cai Y., Ytterberg J., Giacomelli L., Pillardy J. van Wijk K. 2004. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 4768-4781
- Rolland T., Taşan M., Charlotiaux B., Pevzner S., Zhong Q., Sahni. 2014. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell.* 159(5): 1212-1226.
- Ruiz, M. A., & Sotelo, A. 2001. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican wild lupins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5336–5339.

- Sanchez, L., & Vicente-Carbajosa, J. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC research notes*, 1, 93. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-93>
- Satijn D., Hamer K., den Blaauwen J., Otte A. *Mol Cell Biol.* 21(4):1360-9 2001.
- Savaldi-Goldstein S., Sessa G., Fluhr R. 2000. The ethylene-inducible PK12 kinase mediates the phosphorylation of SR splicing factors. *Plant J.* 21(1):91-6.
- Samach, A., & Coupland, G. 2000. Time measurement and the control of flowering in plants. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(1), 38–47.
- Schmid M., Davison T., Henz S., Pape U., Demar M., Vingron M., Scholkopf B., Weigel D., Lohmann J. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *NATURE GENETICS* 37(5): 501.
- Schoenbohm C., Martens S., Eder C., Forkmann G., Weisshaar B. 2000. Identification of the *Arabidopsisthaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biol Chem.* 2000 381(8): 749-53.
- Schweighofer A., Hirt H., Meskiene I. 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science.* 9(5):236.
- Shen L., Kang Y., Liu L., Yu H. 2011. The J-domain protein J3 mediates the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 499–514.
- Sheldon, C. C., Hills, M. J., Lister, C., Dean, C., Dennis, E. S., and Peacock, W. J. 2008. Resetting of FLOWERING LOCUS C expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2214–2219. doi: 10.1073/pnas.0711453105
- Shikata H., Hanada K., Ushijima T. 2014. Phytochrome controls alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences Dec 2014*, 111 (52): 18781-18786.
- Shkryl Y., Yugay Y., Avramenko T., Grigorochuk V., Gorpenchenko T., Grischenko O., Bulgakov V. 2021. CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of HOS1 Reveals Its Role in the Regulation of Secondary Metabolism in *Arabidopsisthaliana*. *Plants (Basel)* 10(1):104.

- Sotelo-Silveira M., Cucinotta M., Chauvin A., Chávez Montes R., Colombo L., Marsch-Martínez N., de Folter S. 2013. Cytochrome P450 CYP78A9 is involved in *Arabidopsis* reproductive development. *Plant Physiol.* 162(2):779-99.
- Steglich G, Neupert W, Langer T. 1999. Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, 19. pp. 3435-3442
- Striebel, F., Kress, W., & Weber-Ban, E. 2009. Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Current opinion in structural biology*, 19(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.02.006>
- Su, Y., Liu, J., Liang, W., Dou, Y., Fu, R., Li, W., Feng, C., Gao, C., Zhang, D., Kang, Z., & Li, H. 2019. Wheat AGAMOUS LIKE 6 transcription factors function in stamen development by regulating the expression of Ta APETALA3. *Development* (Cambridge, England), 146(20), dev177527. <https://doi.org/10.1242/dev.177527>
- Su, S., Shao, X., Zhu, C., Xu, J., Tang, Y., Luo, D., & Huang, X. 2018. An AGAMOUS-like factor is associated with the origin of two domesticated varieties in *Cymbidium sinense* (Orchidaceae). *Horticulture Research*, 5(1). doi:10.1038/s41438-018-0052-z
- Suarez-Lopez P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F. and Coupland G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116-1120.
- Taiz, L; Zeiger, E. 2006. *Plant physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, MA.
- Tan, F.C., & Swain, S. M. 2006. Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 8–17.
- Tapia, M.E. 2000. El medio, los cultivos y los sistemas agrícolas en los Andes del Sur del Perú. IICA-CIID. Lima. 79 pp.
- Tapia M.E. 2015. El proceso agroindustrial del tarwi. En: II Conferencia internacional del Lupino, Torremolinos, España.
- Tofiño, AR; Romero, HM; Ceballos, H. 2010. Rol de la modificación de la cromatina en el tiempo de floración. *TRENDS Plant Sci.* 10(1):30-35.

- Tucker, SC. 1987. Floral initiation and development in legumes. In *Advances in Legume Systematics Part 3*. (Stirton, C.H., ed), pp. 183–239. Kew, UK: Royal Botanic Gardens.
- Tucker, SC. 2003. Floral development in legumes. *Plant Physiol.* 131, 911–926.
- Vandenbussche, M; Zethof, J; Souer, E; Koes, R; Tornielli, GB; Pezzotti, M; Ferrario, S; Angenent, GC; Gerats, T. 2003. Toward the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require SEPALLATA-like MADS box genes in petunia. *Plant Cell* 15: 2680–2693.
- Turnbull, C. 2011. Long-distance regulation of flowering time. *Journal of Experimental Botany*, 62(13), 4399–4413.
- Verelst W, Saedler H, Münster T. 2007. MIKC\* MADS-protein complexes bind motifs enriched in the proximal region of late pollen-specific *Arabidopsis* promoters. *Plant Physiol.* Jan;143(1):447-60.
- Vikhorev, A. V., Strygina, K. V., & Khlestkina, E. K. 2019. Duplicated flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes in barley genome. *PeerJ*, 7, e6266.
- Vimont, N., Fouché, M., Campoy, J. A., Tong, M., Arkoun, M., Yvin, J. C., Wigge, P. A., Dirlwanger, E., Cortijo, S., & Wenden, B. 2019. From bud formation to flowering: transcriptomic state defines the cherry developmental phases of sweet cherry bud dormancy. *BMC genomics*, 20(1), 974.
- Vimont, N., Fouché, M., Campoy, J. A., Tong, M., Arkoun, M., Yvin, J. C., Wigge, P. A., Dirlwanger, E., Cortijo, S., & Wenden, B. 2019. From bud formation to flowering: transcriptomic state defines the cherry developmental phases of sweet cherry bud dormancy. *BMC genomics*, 20(1), 974.
- Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J. A., & Jones, R. S. 2004. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Molecular cell*, 14(5), 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.009>
- Wang Y, Ries A, Wu K, Yang A, Crawford N. 2010. The *Arabidopsis* Prohibitin Gene PHB3 Functions in Nitric Oxide–Mediated Responses and in Hydrogen Peroxide–Induced Nitric Oxide Accumulation. *The Plant Cell* Jan 2010, 22 (1) 249-259.

- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH. 2008. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2008 Nov;148(3):1201-11. doi: 10.1104/pp.108.126375.
- Wang, YS., Xu, YJ., Gao, LP. Yu, O., Wang, XZ., He, XJ. 2014. Functional analysis of Flavonoid 3',5'-hydroxylase from Tea plant (*Camellia sinensis*): critical role in the accumulation of catechins. *BMC Plant Biol* 14, 347. doi:10.1186/s12870-014-0347-7
- Ward JM, Cufr CA, Denzel MA, Neff MM. 2005. The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Feb;17(2):475-85.
- Weller, J. L., & Ortega, R. 2015. Genetic control of flowering time in legumes. *Frontiers in plant science*, 6, 207.
- Weller, J. L., Hecht, V., Liew, L. C., Sussmilch, F. C., Wenden, B., Knowles, C. L., & Vander Schoor, J. K. 2009. Update on the genetic control of flowering in garden pea. *Journal of Experimental Botany*, 60(9), 2493–2499.
- Windauer, L. B. 2013. The growth rate modulates time to first bud appearance in *Physaria mendocina*. *Industrial Crops and Products*, 49, 188–195.
- William, M. D. 2004. Evolutionary Transitions in Floral Color. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1), 7–21.
- Wu Y, Wang T, Xin Y, Wang G, Xu L. 2020. Overexpression of GbF3'5'H1 Provides a Potential to Improve the Content of Epicatechin and Gallocatechin. *Molecules*, 25, 4836.
- Xu, Y., Liu, Z., Lou, L., & Su, X. 2018. Identification of browning-related microRNAs and their targets reveals complex miRNA-mediated browning regulatory networks in *Luffa cylindrica*. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-33896-9
- Xue, Tongtong, Wang, Dong, Zhang, Shizhong, Ehlting, Juergen, Ni, Fei, Jacob, Stephan, Zheng, Chengchao, Zhong, Yuan. 2008. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC GENOMICS*. 9(1): 550.

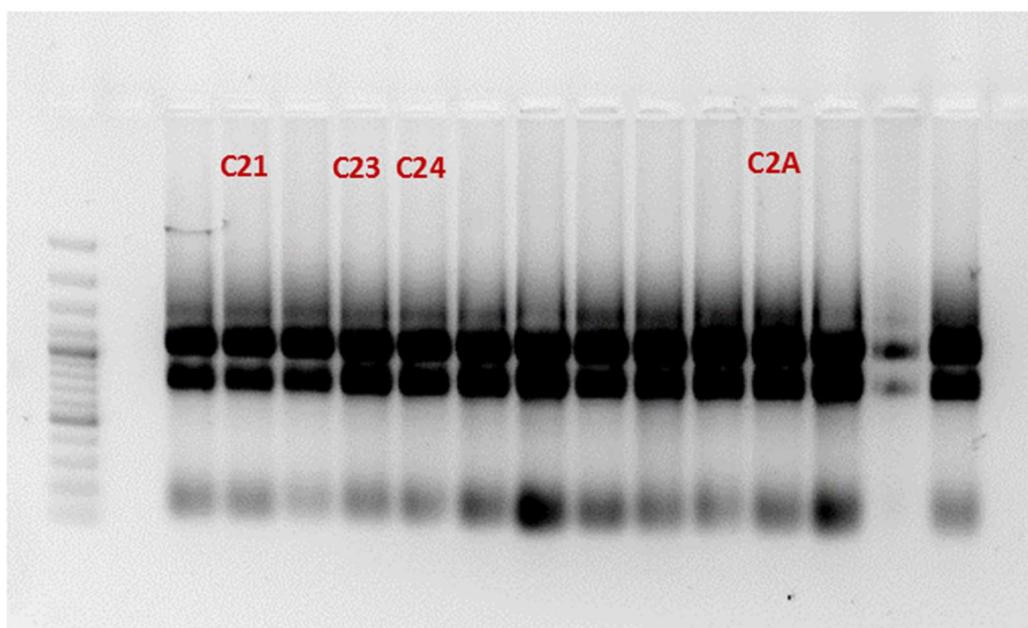
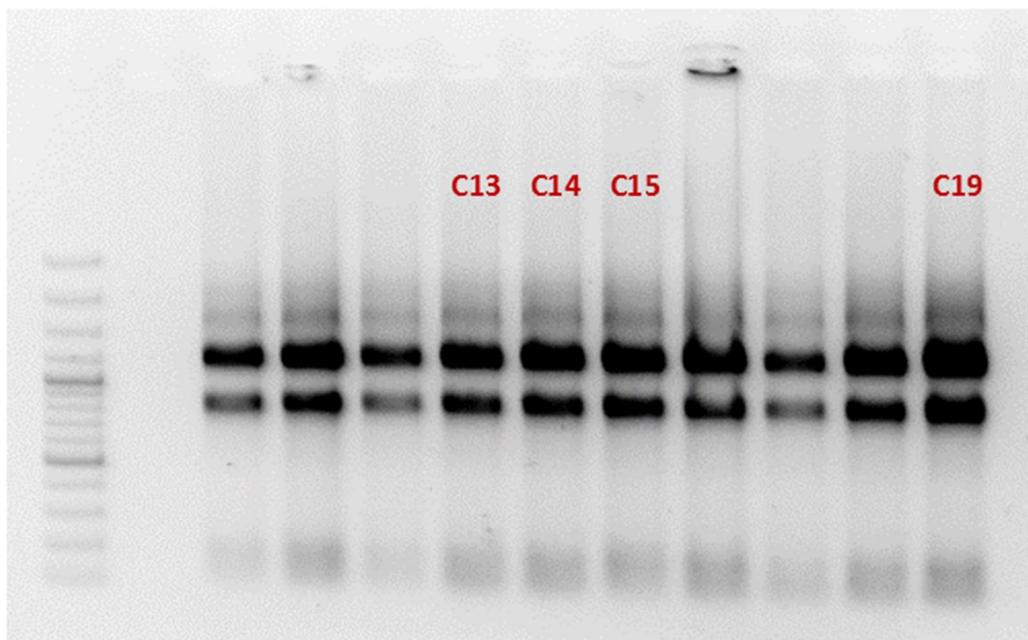
- Yamada, M., Han, X., & Benfey, P. N. 2020. RGF1 controls root meristem size through ROS signalling. *Nature*, 577(7788), 85–88. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1819-6>
- Yang Z. 2002. Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *The Plant cell*, 14 Suppl(Suppl), S375–S388. <https://doi.org/10.1105/tpc.001065>.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., & Schmid, M. 2010. Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *The Plant cell*, 22(7), 2156–2170.
- Yonekura-Sakakibara, K., Higashi, Y., & Nakabayashi, R. 2019. The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. *Frontiers in plant science*, 10, 943.
- Zeng, L., Deng, R., Guo, Z., Yang, S., & Deng, X. 2016. Genome-wide identification and characterization of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*). *BMC Genomics*, 17(1). doi:10.1186/s12864-016-2527-3
- Zhang, Peng; DENG, Heng; XIAO, Fang-ming; LIU, Yong-sheng. 2013. Alterations of Alternative Splicing Patterns of Ser/Arg-Rich (SR) Genes in Response to Hormones and Stresses Treatments in Different Ecotypes of Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Agriculture*, 12(5), 737–748.
- Zhao, Y., Medrano, L., Ohashi, K., Fletcher, J. C., Yu, H., Sakai, H., & Meyerowitz, E. M. 2004. HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 16(10), 2586–2600. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024869>

## VIII. ANEXOS

Anexo 1. Datos de Pasaporte de las accesiones de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) del Banco de Germoplasma del INIA-Santa Ana.

Accesión	X S	Abreviatura	COD. ACCESIÓN	COLECCI	PAÍS	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	ECOTIPO	Días de floración
P01	PER006145	08-1580	03-08-01580	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	119
P02	PER005098	06-2046	6165	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CELENDIN	X PRECOZ	113
P03	PER006032	08-1467	03-08-01467	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	106
P04	PER006121	08-1556	03-08-01556	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	116
P05	PER006026	08-1461	03-08-01461	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	120
P06	PER004918	02-1786	3279	TARWI	PERÚ	ANCASH	HUARI	X PRECOZ	112
P07	PER006389	12-0108	03-12-00108	TARWI	PERÚ	JUNIN	CONCEPCION	X PRECOZ	107
P08	PER005983	08-1418	03-08-01418	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	86
P09	PER004935	08-2077	3298	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	112
P10	PER006068	08-1503	03-08-01503	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	120
P11	PER005942	08-1377	03-08-01377	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	95
P12	PER005430	02-1732	03-02-01732	TARWI	PERÚ	ANCASH	MARISCAL LUZURIAGA	X PRECOZ	107
P13	PER005432	02-1767	03-02-01767	TARWI	PERÚ	ANCASH	CORONGO	X PRECOZ	112
P14	PER006007	08-1442	03-08-01442	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	120
P15	PER006400	12-0120	03-12-00120	TARWI	PERÚ	JUNIN	HUANCAYO	X PRECOZ	107
P16	PER005969	08-1404	03-08-01404	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	86
P17	PER005726	08-0563	03-08-00563	TARWI	PERÚ	CUSCO	PAUCARTAMBO	X PRECOZ	86
P18	PER005994	08-1429	03-08-01429	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	120
P19	PER006346	12-0066	03-12-00063	TARWI	PERÚ	JUNIN	-	X PRECOZ	112
P20	PER005515	06-0451	03-06-00451	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CAJABAMBA	X PRECOZ	112
P21	PER006302	12-0015	03-12-00015	TARWI	PERÚ	JUNIN	HUANCAYO	X PRECOZ	93
P22	PER006167	08-1602	03-08-01602	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	122
P23	PER006243	08-1678	03-08-01678	TARWI	PERÚ	CUSCO	CUSCO	X PRECOZ	112
P24	PER005433	02-1768	03-02-01768	TARWI	PERÚ	ANCASH	PALLASCA	X PRECOZ	93
P25	PER005623	08-0460	03-08-00460	TARWI	PERÚ	CUSCO	PARURO	X PRECOZ	86

Anexo 2. Evaluación de la integridad del ARN extraído en gel de agarosa.



\*Las muestras etiquetadas fueron enviadas a secuenciación.

Anexo 3. Resultados de Control de Calidad del ARN por Macrogen.

MACQCREPORT\_V1\_121106



# Original Sample QC

## General Information

Order Number	1705KHP-0001	Name of Customer	Gaston Zolla	Date of Order	2017-05-02
--------------	--------------	------------------	--------------	---------------	------------

Final QC Result of DNA sample(s)				
Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Final QC Result of RNA sample(s)				
Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
2017-05-17	12	12	0	0

The QC criteria refer to the specification requirements of a single run. In any cases, we may encounter the shortage of sample volume or amount due to various reasons such as a library construction failure. In these cases a request of an additional sample will be inevitable.

Therefore, we recommend double the amount to be supplied at first place to minimize any delay of the whole procedure.

\* **Pass** : Proceed with the library construction.

\* **Fail** : Further processes are on hold until the replacement samples received.

We do not recommend in proceeding further steps until a specific instruction was given from the client.

\* **Hold** : A specific instruction should be given by the client for further processing as the QC pattern may be triggered by the sample nature.

Macrogen does not proceed the next step until we have received your permission.

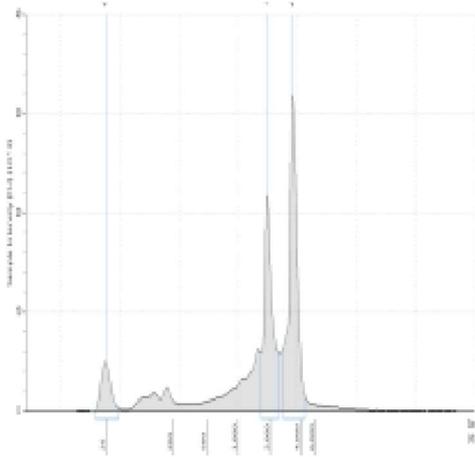
As 3 ul was taken from the sample for sample (library) QC purposes, the indicated volume represents 3ul less than the total volume received.

## QC Result of RNA

Experiment Date	2017-05-17	Tested by	LWC	Comment	
-----------------	------------	-----------	-----	---------	--

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	Result*
1	C14	220.344	50	11.017	8.1	Pass
2	C15	113.495	50	5.675	8.7	Pass
3	C19	215.875	50	10.794	8.5	Pass
4	C21	93.459	50	4.673	8.8	Pass
5	C23	267.543	50	13.377	8.7	Pass
6	C24	220.236	50	11.012	8.7	Pass

Click to Enlarge =>1:C14



Anexo 4. Estadísticas de los datos en crudo por Macrogen.

<b>ID MUESTRA</b>	<b>Bases totales read (bp)</b>	<b>Reads totales</b>	<b>GC(%)</b>	<b>AT(%)</b>	<b>Q20(%)</b>	<b>Q30(%)</b>
<b>C14</b>	5594097908.00	55387108.00	43.46	56.54	96.81	94.84
<b>C15</b>	5128560628.00	50777828.00	43.52	56.48	96.85	94.92
<b>C19</b>	4843016458.00	47950658.00	43.44	56.56	96.93	95.02
<b>C21</b>	5135089470.00	50842470.00	43.46	56.54	96.75	94.75
<b>C23</b>	5196980250.00	51455250.00	43.38	56.63	96.83	94.89
<b>C24</b>	5211518796.00	51599196.00	43.30	56.70	96.81	94.91
<b>M11</b>	5799010546.00	57415946.00	43.82	56.18	96.84	94.89
<b>M17</b>	5162300082.00	51111882.00	43.86	56.14	96.98	95.08
<b>M1A</b>	4924410944.00	48756544.00	44.03	55.97	96.77	94.78
<b>M23</b>	4450645396.00	44065796.00	43.20	56.80	96.70	94.68
<b>M24</b>	4397283864.00	43537464.00	43.11	56.90	96.86	94.90
<b>M29</b>	4603500008.00	45579208.00	43.27	56.73	97.52	95.79
<b>PROMEDIO</b>	<b>5037201195.83</b>	<b>49873279.17</b>	<b>43.49</b>	<b>56.51</b>	<b>96.89</b>	<b>94.95</b>