

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE  
PLANTAS**



**“TRANSCRIPTOMA DE TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet)  
SOMETIDO A ESTRÉS HÍDRICO”**

**Presentada por:**

**JOSÉ ERNESTO MANUEL HIDALGO RODRÍGUEZ**

**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**

**“TRANSCRIPTOMA DE TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet)  
SOMETIDO A ESTRÉS HÍDRICO”**

**Presentada por:**

**JOSÉ ERNESTO MANUEL HIDALGO RODRÍGUEZ**

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

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

---

Dr. Félix Camarena Mayta

**PRESIDENTE**

---

Dr. Jorge Jiménez Dávalos

**ASESOR .**

---

Dr. Gaston Zolla Benites

**CO-ASESOR**

---

Mg. Sc. Elizabeth Heros Aguilar

**MIEMBRO**

---

Mg. Sc. Julián Chura Chuquiya

**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

A Sofia Cristal. Su aliento de vida me contagi6 y me ayud6 a descubrir que de las situaciones m6s difciles nacen las cosas m6s hermosas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres por haberme impulsado en el camino de superación personal.

A Cynthia por haberme su apoyo continuo e y en todas las circunstancias. Este trabajo también es suyo.

A los doctores Jorge Jiménez y Gastón Zolla por su asesoría, consejos y haber brindado el ambiente necesario para realizar este trabajo.

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

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

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

A Pierina Velásquez y Cinthia Mendoza, por su apoyo invaluable en la parte experimental.

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Estrés hídrico.....	4
2.2. Estrategias de Resistencia a Estrés Hídrico.....	8
2.3. Mecanismos de Resistencia a Sequía.....	12
2.4. Vías de señalización de estrés hídrico.....	22
2.5. Estrés hídrico en leguminosas.....	28
2.6. Estrés hídrico en el género <i>Lupinus spp.</i> .....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. Material vegetal.....	33
3.2. Selección de accesiones de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (tarwi) del Banco de Germoplasma del INIA-Huancayo .....	33
3.3. Caracterización de la accesión P03 de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet en condiciones normales y de sequía .....	34
3.4. Análisis de datos .....	35
3.5. ARN-seq de novo de los brotes vegetativos.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1. Selección del material vegetal.....	39
4.2. Sequía en etapa vegetativa.....	44
4.3. Sequía en etapa reproductiva.....	55
4.4. Análisis transcriptómico ARN-seq de novo de los brotes vegetativos.....	59
V. CONCLUSIONES.....	136
VI. RECOMENDACIONES.....	138
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
VIII. ANEXOS.....	172

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Efectos del estrés hídrico a nivel morfológico, fisiológico y molecular .....	4
Cuadro 2: Estadísticas de Ensamblaje y Filtrado del transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	60
Cuadro 3: Genes diferencialmente expresados en plantas sometidas a sequía ...	61
Cuadro 4: Detalle de los transcritos clasificados según su expresión y ontología génica .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrategias de resistencia a sequía y algunas características asociadas .....	9
Figura 2: Adaptación a sequía a nivel fisiológico, bioquímico y molecular.....	12
Figura 3: Proteínas inducidas por estrés por sequía en la respuesta y tolerancia a estrés por sequía .....	16
Figura 4: Ruta general para la transducción de señales de estrés hídrico en plantas .....	22
Figura 5: Factores de transcripción y elementos CIS involucrados en la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico .....	24
Figura 6: Ruta de la biosíntesis del ABA en plantas.....	25
Figura 7: Flujograma del análisis de ARN de novo.....	38
Figura 8. Selección de accesiones de <i>L. mutabilis</i> Sweet (tarwi) del Banco de Germoplasma del INIA-Huancayo .....	43
Figura 9. Evaluación de la accesión P03 de <i>L. mutabilis</i> Sweet en condiciones normales y de sequía durante el periodo de crecimiento vegetativo .....	55
Figura 10. Evaluación de la accesión P03 de <i>L. mutabilis</i> Sweet en condiciones normales y de sequía durante el periodo reproductivo .....	58
Figura 11: Datos del enriquecimiento de ontología génica de los genes diferencialmente expresados según su ontología génica .....	63
Figura 12. Genes funcionales asociadas a canales y transportadores en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	66
Figura 13. Genes funcionales asociados al metabolismo de fosfolípidos en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	69
Figura 14. Genes funcionales asociados a fotosíntesis en el transcriptoma de <i>L.</i> <i>mutabilis</i> .....	71

Figura 15. Genes funcionales asociados a las vías de detoxificación en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	74
Figura 16. Genes funcionales asociados a osmolitos en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	79
Figura 17. Genes funcionales asociadas a factores de protección en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	80
Figura 18. Genes funcionales asociados a proteasas en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	81
Figura 19. Genes regulatorios asociados a Complejos Ligasa de Ubiquitina en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	83
Figura 20. Genes regulatorios asociados a Hidrolasas Ácido Anhidrido en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	85
Figura 21. Genes regulatorios asociados a Transducción de Señal en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	97
Figura 22. Genes regulatorios asociados a Factores de Transcripción en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	106
Figura 23. Genes regulatorios asociados a Hormonas en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	125
Figura 24. Genes regulatorios asociados a Complejos Histonas en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	129
Figura 25. Genes regulatorios asociados a Cromatina en el transcriptoma de <i>L. mutabilis</i> .....	135

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos de Pasaporte de las accesiones de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (tarwi) del Banco de Germoplasma del INIA-Huancayo.....	172
Anexo 2. Evaluación de la integridad del ARN extraído en gel de agarosa.....	173
Anexo 3. Resultados de Control de Calidad del ARN por Macrogen.....	174
Anexo 4. Estadísticas de los datos en crudo por Macrogen.....	176
Anexo 5: Datos de reads iniciales y reads de alta calidad por muestra.....	177
Anexo 6: Datos suplementarios de canales y transportadores.....	178
Anexo 7: Metabolismo de fosfolípidos.....	181
Anexo 8: Fotosíntesis.....	184
Anexo 9: Genes de detoxificación.....	187
Anexo 10: Osmolitos.....	190
Anexo 11: Factores de protección.....	192
Anexo 12: Proteasas.....	193
Anexo 13: Complejos ligasa de ubiquitina.....	195
Anexo 14: Hidrolasas ácido-anhidrido.....	196
Anexo 15: Transducción de señal.....	197
Anexo 16: Factores de transcripción.....	203
Anexo 17: Hormonas.....	206
Anexo 18: Complejos histonas.....	210
Anexo 19: Cromatina.....	212

## RESUMEN

Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una especie con alto potencial agronómico pero subutilizada por diversas razones. El objetivo de esta investigación es analizar los cambios en la expresión génica de tarwi en condiciones de estrés hídrico con el fin de conocer los mecanismos genéticos de respuesta a sequía que operan en esta especie. Tras una selección por precocidad, mayor peso de semilla, mayor sobrevivencia a sequía, mayor peso seco de la parte aérea tras sequía y menor contenido de alcaloides, se determinó que la accesión P03 es promisoriosa para el mejoramiento de tarwi. Esta accesión responde a sequía modificando su contenido de elementos en la parte aérea, e incrementando sus niveles de prolina. El secuenciamiento de ARN total mediante ARN-seq de Illumina demostró cambios en la expresión génica de tarwi. Se encontraron 7813 genes diferencialmente expresados (DEGs). De estos, 4 588 genes estuvieron upregulados, en tanto que 3225 genes fueron downregulados. Con respecto a proceso biológico, 4747 genes upregulados, en tanto que solamente 2 459 genes estuvieron downregulados. Los datos de Componente Celular revelan 130 genes upregulados y 329 genes downregulados. Los genes relacionados con Función Molecular, muestran 1888 genes upregulados y 562 genes downregulados. Según la clasificación de acuerdo a la base de datos de sequía. Se encontraron 1796 DEGs asociados a proteínas funcionales, los que fueron clasificados en canales y transportadores (452), detoxificación (431), fosfolípidos (317), proteasas (200), fotosíntesis (189), osmolitos (178) y factores de protección (29). Los 1944 DEGs con función regulatoria fueron clasificados en transducción de señal (939), hormonas (363), factores de transcripción (330), cromatina (154), histonas (113), complejos ligasa de ubiquitina (31), hidrolasas ácido anhidro (14). Este trabajo proporciona las bases para comprender los mecanismos genéticos que regulan la tolerancia a sequía en tarwi.

**Palabras clave:** sequía, tarwi, *Lupinus mutabilis*, ARN-seq, transcriptoma.

## ABSTRACT

Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) is one of the crops with the most agronomic potential to contribute to agricultural development. However, it is not properly leveraged due to a variety of factors, amongst which there is water stress. The objective of this research is to analyze the changes in tarwi (*L. mutabilis* Sweet) gene expression grown under water stress, to understand the genetic mechanisms of drought response. After selecting plants according to early flowering, greater seed weight, higher drought survival rate, greater shoot biomass after drought and lower alkaloid content, accession P03 was determined to be a candidate for tarwi improvement. When grown under water stress, this accession is capable of modifying its element content in shoots and increasing its proline levels, which is a manifestation of transcriptomic changes in response to water stress. Illumina RNA sequencing, demonstrated the presence of 7813 differentially expressed genes. 4588 genes were upregulated, while 3225 genes were downregulated. With regards to Biological Process, 4747 genes were upregulated and 2459 were downregulated. Cellular Component data reveal 130 upregulated genes and 329 downregulated genes. Data related to Molecular Function show 1888 upregulated genes and 562 downregulated genes. According to the Drought Stress Database, 1796 differentially expressed genes were associated to functional proteins. They were classified in channels and transporters (452), detoxification (431), phospholipids (317), proteases (200), photosynthesis (189), osmolytes (178) and protection factors (29). 1944 genes with regulatory function were differentially expressed and classified in signal transduction (939), hormones (363), transcription factors (330), chromatin (154), histones (113), ubiquitin-ligase complexes (31), acid anhydride hydrolases (14). This study provides the background to understand the genetic mechanisms that regulate tolerance to water stress in tarwi.

**Keywords:** drought, tarwi, *Lupinus mutabilis*, RNA-seq, transcriptome.

## I. INTRODUCCIÓN

Según las estimaciones de la FAO (2009), la población mundial podría alcanzar los 9 100 millones de personas el año 2050, por lo cual se deberá incrementar la producción agrícola de alimentos en al menos setenta por ciento para mantener la seguridad alimentaria. Sin embargo, la productividad se ve amenazada por la disminución de tierras agrícolas, la reducción del recurso hídrico y presencia de factores de estrés biótico y principalmente abiótico (Ashraf *et al.* 2009). Uno de los factores de estrés abiótico más críticos, que afecta la salud y la productividad agrícola en más de un tercio de la población mundial, son las sequías (FAO 2003).

Las sequías son consideradas como los fenómenos con mayor impacto negativo sobre las plantas (Zhu 2002), generando efectos adversos sobre su desarrollo, evitando que alcancen su potencial genético y desestabilizando su productividad (Amudha y Balasubramani 2011). Se estima que este fenómeno causa el 17% de las pérdidas del rendimiento potencial de los cultivos a nivel mundial (Ashraf *et al.* 2009). El panorama es más serio si se tiene en cuenta que debido al cambio climático, la incidencia de sequías ha tenido un incremento significativo a nivel global en el último siglo, afectando gravemente la agricultura de países como Kenia, Australia, Rusia, China, Estados Unidos de Norte América y diversos países de América Latina entre los que se encuentra el Perú (CEPAL *et al.* 2013).

El Perú es uno de los países más susceptibles a la ocurrencia de sequías (MINAM 2016), habiéndose registrado 163 eventos de sequía en todas las cuencas hidrográficas entre los años 2000 y 2010. Tan solo en la Costa ocurrieron 126 sequías que afectaron más de 290 mil hectáreas. En la Sierra, en tanto, se han reportado 25 eventos de sequía, que afectaron a 66,724 familias en un total de 33,2087 hectáreas. Cabe destacar que la Sierra es más vulnerable por presentar una agricultura de secano con fluctuación elevada de las precipitaciones, por lo que las sequías son particularmente muy severas en esta región (ANA 2010). Además, según las proyecciones del MINAM (2016) se espera un incremento de la temperatura en 2° C, lo cual aumentará la frecuencia de sequías.

El aumento en la frecuencia de sequías determina que una de las prioridades de la agricultura actual sea la búsqueda y mejoramiento genético de cultivos con resistencia a

estrés hídrico. Para ello, es necesario conocer los mecanismos de respuesta a nivel morfológico, fisiológico y genético, que permitan a las plantas evitar o sobrevivir a la escasez de agua (Harb *et al.* 2010). Entre las estrategias usadas en el mejoramiento de plantas por resistencia a sequía, la modificación de la fenología del cultivo para lograr cultivos precoces es una de ellas y lo más importante desde el punto de vista agronómico, es la introducción de tolerancia, asociada con altos rendimientos; sin embargo, la tolerancia a estrés hídrico involucra la participación de muchos genes con efecto aditivo (Ashraf, 2009), con baja heredabilidad y alta interacción entre los genes de tolerancia a sequía y los genes que proveen resistencia a sequía, lo cual ha limitado el mejoramiento por tolerancia a sequía (Amudha y Balasubramani 2011).

Debido a estas dificultades, la identificación de genes de tolerancia y el estudio de los mecanismos moleculares involucrados, ha requerido el uso de diversas tecnologías tales como el uso de mutantes, secuenciamiento de ADN, análisis de loci de caracteres cuantitativos (QTLs) y microarrays (Amudha y Balasubramani 2011). 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). Además, esta técnica permite capturar la dinámica del transcriptoma en diferentes condiciones sin tener que realizar una normalización sofisticada. Por esta razón, es de particular importancia en organismos no modelos con secuencias genómicas que no han sido determinadas (Wang *et al.* 2009), como los cultivos nativos.

Los cultivos nativos de Perú, como quinua, kiwicha, sachu inchi, tarwi, poseen potencial para mantener la seguridad alimentaria (Sevilla y Holle 2004) a pesar de ello, en la mayoría de estos no se han realizado investigaciones a nivel genético, por lo cual siguen siendo subutilizados (Camarena *et al.* 2012). El tarwi (*L. mutabilis* Sweet), en particular es una de estas especies nativas con mayor potencial agronómico para contribuir al desarrollo del país (Camarena *et al.* 2012). Esta planta es aprovechada en diversos lugares por su alto valor nutricional (Clements *et al.* 2008). Sin embargo, en Perú es subutilizada debido al elevado contenido de alcaloides en semillas, período vegetativo largo, susceptibilidad a plagas, enfermedades y sequías (Camarena *et al.* 2012). La disminución

en la productividad del tarwi se debe, entre otras cosas, a que su cultivo se realiza exclusivamente en condiciones de secano. Es así que las sequías retardan el crecimiento, disminuyen la eficiencia fotosintética y afectan más notablemente en etapas críticas como la floración y el llenado de vainas (Jacobsen y Mujica 2006).

Dado que se desconocen los mecanismos que operan a nivel genético en respuesta a estrés hídrico en tarwi, es necesario realizar estudios, con miras a incrementar su rendimiento en diversas condiciones ambientales, lo cual podría revalorarlo como un cultivo de importancia agrícola. De esta manera y dado que el estrés hídrico afecta en los diferentes estadios de desarrollo de la planta, el objetivo de esta investigación es analizar los cambios en la expresión génica de tarwi (*L. mutabilis*) en condiciones de estrés hídrico con el fin de conocer los mecanismos genéticos de respuesta a sequía que operan en una accesión tolerante a sequía.

Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar una accesión que presente alta tolerancia a sequía en base a las siguientes características: precocidad, mayor peso de semilla, mayor sobrevivencia a sequía, mayor peso seco de la parte aérea tras sequía y menor contenido de alcaloides
- Caracterizar la accesión tolerante a sequía de tarwi en etapa vegetativa mediante el contenido de elementos, y en la etapa reproductiva evaluando el contenido de prolina.
- Determinar la etapa fenológica en que se realizará el análisis transcriptómico en condiciones normales y de sequía en la accesión tolerante de tarwi.
- Determinar el rol de los mecanismos de detoxificación, fosfolípidos, canales y transportadores, proteasas y osmolitos, relacionados con genes funcionales, activados en respuesta a estrés por sequía en tarwi.
- Determinar el rol de las vías de transducción de señal, hormonas, factores de transcripción, epigenética, relacionadas con genes regulatorios de respuesta a estrés por sequía en tarwi.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ESTRÉS HÍDRICO

El agua condiciona la adaptación, desarrollo y producción de todas las especies vegetales. Es necesaria para procesos como la germinación, división celular y elongación para la promoción de crecimiento vegetal y actividades metabólicas como la síntesis de compuestos orgánicos, fotosíntesis, respiración y un gran número de procesos bioquímicos y fisiológicos. Las plantas necesitan una alta cantidad de agua a lo largo de su ciclo de vida, y su desarrollo es afectado si hay reducción en el contenido hídrico en el suelo (Akinci 2013). En sistemas naturales, esta reducción puede ser el resultado de bajas precipitaciones, baja capacidad de retención de agua del suelo, excesiva salinidad, temperaturas extremas frías o calientes, baja presión de vapor atmosférico o una combinación de estos factores (Moreno 2009).

Cuadro 1: Efectos del estrés hídrico a nivel morfológico, fisiológico y molecular.

Adaptado de Akinci (2013) y Farooq *et al.* (2009).

Efectos morfológicos	Efectos fisiológicos	Efectos bioquímicos
<ul style="list-style-type: none"><li>• Reducción del crecimiento.</li><li>• Reducción de la expansión foliar.</li><li>• Reducción en el número de hojas.</li><li>• Reducción en el rendimiento de cultivo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Reconocimiento de señales radiculares.</li><li>• Pérdida de turgencia y ajuste osmótico.</li><li>• Cierre estomático</li><li>• Potencial hídrico reducido.</li><li>• Reducción en la conductancia estomatal a CO<sub>2</sub>.</li><li>• Reducción de concentración interna de CO<sub>2</sub>.</li><li>• Reducción en fotosíntesis neta.</li><li>• Desbalance de toma de nutrientes.</li><li>• Desbalance hormonal.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Reducción en eficiencia fotoquímica.</li><li>• Reducción en la eficiencia de RuBisCo, PAPcase, NADP-ME, FBPase, PPDK.</li><li>• Incremento de especies reactivas de oxígeno ROS.</li><li>• Reducción de ATP.</li><li>• Fotorrespiración aumentada.</li><li>• Carboxilación limitada</li><li>• Toxicidad excesiva de iones.</li></ul>

Cuando la disponibilidad de agua disminuye, se genera estrés hídrico, el cual es evidenciado por cambios a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular en las

plantas (Madhava *et al.* 2006). Al causar efectos dañinos para el desarrollo de las plantas, el estrés hídrico es considerado el estrés más importante que limita y ha dirigido la evolución de la vida vegetal en la tierra (Wang y Frei 2011). El déficit de agua puede presentarse en cualquier estadio fenológico de un cultivo, causando alteraciones en el desarrollo vegetal. Cuando este fenómeno ocurre en etapas tempranas, interfiere con el proceso de imbibición y disminuye la actividad enzimática de las semillas, impidiendo la germinación, lo cual reduce el número de individuos de un cultivo, y por lo tanto, el rendimiento (Taiz y Zeiger 2010). Cuando ocurre en las fases de floración y llenado de granos, es capaz de reducir el rendimiento, llegando a causar cuantiosas pérdidas económicas particularmente en aquellos genotipos no adaptados a condiciones de estrés (Blum 2005).

Entre los fenómenos afectados por estrés hídrico a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico, se encuentran el crecimiento y desarrollo vegetal, las relaciones hídricas vegetales, la nutrición mineral, la captación de luz y la fijación de carbono (Aroca 2012; Madhava *et al.* 2006).

### **2.1.1. Efectos del estrés hídrico a nivel morfológico**

El estrés hídrico altera el crecimiento debido a que inhibe actividades enzimáticas, reduce la turgencia y disminuye el suministro de energía, afectando la división y el alargamiento celular (Farooq *et al.* 2009). Estas alteraciones producen cambios en la arquitectura de las plantas, que presentan menor altura, menor tamaño foliar, menor número de hojas, menos producción de frutos y cambios en la fase reproductiva (Shao *et al.* 2009). Además, el estrés hídrico reduce la expansión foliar y el macollamiento, y ocasiona senescencia temprana de las hojas (Cuadro 1; Aroca 2012).

Si el estrés hídrico es severo, la disminución de la elongación celular por interrupción de flujo de agua en el xilema puede inhibir el crecimiento de las células del mesófilo, lo que origina defoliación, causando una reducción severa del área foliar en cultivos como trigo (Schuppler *et al.* 1998). Todos estos cambios reducen la acumulación de materia seca en todos los órganos vegetales y la producción de semilla; sin embargo, esta respuesta varía según el órgano y la especie. Por ejemplo, plántulas de maíz sometidas a estrés hídrico en etapas tempranas mostraron una división celular alterada, con menor tasa mitótica y

células más alargadas en las zonas meristemáticas, lo que resultó en raíces más alargadas con mayor biomasa en relación a la parte aérea (Sacks *et al.* 1997; Aslam *et al.* 2012). En cebada, se ha observado una disminución en el tamaño de planta, número de granos y biomasa (Samarah 2004), mientras que en trigo solo los genotipos más susceptibles sufrieron disminución en la altura de la planta, el área foliar, y los pesos secos de raíces, tallos y plantas enteras (Boutraa *et al.* 2010).

Este tipo de estrés también es capaz de afectar la fenología al ocasionar un cambio temprano de la fase vegetativa a la fase reproductiva, acortando el ciclo de crecimiento de un cultivo, lo cual reduce el rendimiento (Desclaux y Roumet 1996) y la respuesta de las plantas es variable dependiendo de la fase en la que se produce el estrés hídrico, así como del cultivo (Aroca 2012). Si el estrés hídrico ocurre en periodos prolongados de la fase vegetativa de crecimiento, puede alterar el crecimiento y desarrollo de las plantas, reduciendo el periodo vegetativo mediante la activación de estrategias de evasión y escape a sequía (Xu 2010). Por ejemplo, en maíz sometido a estrés hídrico se ha observado disminución en el tamaño de los entrenudos, por menor tamaño de las células y menor peso fresco y seco en variedades susceptibles a sequía (Aslam *et al.* 2012). En tanto que en plantas de soja sometidas a condiciones de sequía se ha observado aceleración en la llegada de la floración y madurez fisiológica (Desclaux y Roumet 1996; Liu *et al.* 2003).

Los efectos negativos causados por estrés hídrico vienen acompañados de variación en la alocaión de materia orgánica en raíces y tallo, y la disminución del tamaño de los brotes para maximizar la toma de agua (Aroca 2012). Por eso, las plantas que sufren estrés hídrico durante la etapa de floración son más susceptibles, con mayor esterilidad del polen, tasa de abortos y senescencia floral, lo que a su vez disminuye el tamaño de los granos (Saini y Westgate 2000). De esta manera, la producción puede reducirse hasta en un 90%, por lo cual el estrés hídrico producido en la fase de llenado de granos es el más devastador (Lafitte *et al.* 2007).

### **2.1.2. Efectos del estrés hídrico a nivel fisiológico**

El estrés hídrico disminuye el contenido relativo de agua, el potencial hídrico foliar, el potencial osmótico, el potencial de presión y la turgencia (Kirkham 2005). Esto origina

dificultades fisiológicas como cierre estomático, variación en la tasa de transpiración, y cambios en la translocación de nutrientes (Cuadro 1; Shao *et al.* 2009).

La primera respuesta de las plantas al déficit hídrico es el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración, lo que eleva la temperatura, disminuye la toma de agua y nutrientes, y el ingreso de CO<sub>2</sub> (Madhava *et al.* 2006). El cierre de estomas se encuentra íntimamente ligado al contenido de agua en el suelo, lo cual evidencia la existencia de señales químicas producidas por deshidratación (Farooq *et al.* 2009). Dentro de las moléculas producidas se encuentra el ácido abscísico que ocasiona la apertura de canales de calcio, el cual induce la salida de potasio (K) y el aumento de potenciales osmóticos intracelulares lo que conlleva al cierre estomático (Lira 2007).

El bajo potencial hídrico en el suelo disminuye la difusión de agua y nutrientes de la matriz del suelo a la superficie de la raíz, además la actividad metabólica en la raíz disminuye, por lo que la captación y movilidad de nutrientes disminuye de manera general (Ciriaco *et al.* 2011). Por ello, las plantas que sufren estrés hídrico pueden presentar deficiencias nutricionales incluso en suelos bien fertilizados (Akıncı 2013). La escasa disponibilidad de agua en el tejido vegetal impide la solubilización y traslocación de los materiales y compuestos de reserva (Farooq *et al.* 2009). Es así que se las plantas sometidas a estrés hídrico muestran variación en el contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), entre otros. Esta variación depende del genotipo de la planta (Ciriaco *et al.* 2011). Además, en leguminosas afectadas por sequía hay menor captación de N por la reducida actividad de nitrato reductasa en hojas y nódulos (Ashraf y Iram 2005).

### **2.1.3. Efectos del estrés hídrico a nivel bioquímico**

A nivel bioquímico, el estrés hídrico produce inhibición de enzimas de carboxilación, y síntesis de ATP. Según su origen, las modificaciones producidas pueden ser estomáticas y no estomáticas (Cuadro 1; Ashraf *et al.* 2009; Ajum *et al.* 2011).

Las modificaciones no estomáticas incluyen la síntesis reducida y alteración en la actividad de enzimas clave como la ribulosa-1 5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo), fosfoenolpiruvato carboxilasa, piruvato fosfato quinasa, NADP malato

deshidrogenasa y enzima málica NADP, y pigmentos fotosintéticos como la clorofilas, carotenoides y xantofilas, síntesis disminuida de ATP, fotorrespiración y alto estrés oxidativo (Farooq *et al.* 2009).

Las modificaciones estomáticas incluyen el cierre de estomas, lo cual induce bajo potencial hídrico para evitar la pérdida de agua por transpiración. Esto disminuye el ingreso de CO<sub>2</sub>, lo cual altera la cadena transportadora de electrones fotosintética, reduciendo la fijación de carbono bajo sequía y la tasa fotosintética de los cultivos. (Madhava *et al.* 2006). Dadas las bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> y las altas cantidades de O<sub>2</sub> en los tejidos fotosintéticos, la enzima RuBisCo actúa como oxigenasa, incrementando la fotorrespiración a expensas de la fijación de carbono (Aroca 2012).

La fotorrespiración que se lleva a cabo en estrés hídrico induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales incluyen radicales superóxido, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y radicales hidroxilo (OH<sup>•</sup>), los cuales causan daño oxidativo que reduce la tasa fotosintética y afecta a diferentes componentes celulares que incluyen lípidos de membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Aroca 2012).

Además, la deshidratación disminuye el volumen celular, lo cual hace el contenido celular más viscoso, incrementando la interacción proteína-proteína, lo cual puede originar agregación y desnaturalización de las mismas (Farooq *et al.* 2009).

## **2.2. ESTRATEGIAS DE RESISTENCIA A ESTRÉS HÍDRICO**

Los daños mostrados por las plantas sometidas a estrés hídrico generan un conjunto de respuestas que confieren a las plantas la capacidad de adaptarse y aclimatarse. Las estrategias de resistencia de las plantas a estrés hídrico son clasificadas en escape, evasión y tolerancia. Algunas de las características fenotípicas asociadas a estas estrategias (fenotipos asociados), así como el tipo de ciclo de vida y las condiciones ambientales que las favorecen (contexto estacional) se muestran en la Figura 1. La estrategia del escape consiste en el acortamiento del ciclo de vida de las plantas y su rápido desarrollo en condiciones hídricas suficientes, de manera que las plantas completen su ciclo antes de que el estrés hídrico se presente (Harb *et al.* 2010). La evasión involucra el mantenimiento del potencial hídrico elevado, minimizando la pérdida de agua en tejidos, mejorando la

capacidad de las células vegetales para mantener el agua, e incrementando su toma. La tolerancia consiste en la habilidad para resistir déficit hídrico manteniendo tejidos con bajo potencial hídrico, a través del mantenimiento de la turgencia y reducción de la pérdida a través de la acumulación de solutos compatibles (Chaves *et al.* 2003).

Estrategia	Ciclo de vida	Fenotipos asociados	Contexto estacional
Escape	Anual	Crecimiento rápido Floración temprana Alto N foliar Alta capacidad fotosintética	Sequías terminales
Evasión	Anual Bianual Perenne	Alta eficiencia en uso de agua Baja conductancia de estomas Hojas densas o suculentas Elevada relación raíz tallo	Sequías leves durante periodo de crecimiento Sequías leves frecuentes
Tolerancia	Bianual Perenne	Elevados osmoprotectores Acumulación de azúcares Crecimiento radicular	Sequías moderadas durante etapa de crecimiento Sequías severas durante etapa de crecimiento

Figura 1: Estrategias de resistencia a sequía y algunas características asociadas. Las flechas designan el contexto ambiental que favorecería más cada estrategia.

Fuente: Kooyers (2015).

### 2.2.1. Escape

El escape es una estrategia que consiste en la habilidad de plantas anuales para completar su ciclo de vida y experimentar dormancia antes de que se presente la sequía. Muchas de estas plantas carecen de mecanismos de tolerancia, por lo que presentan periodos de crecimiento vegetativo muy corto, lo cual generalmente afecta el rendimiento (Turner *et al.* 2001). Cuando las plantas experimentan déficit hídrico con incremento en las temperaturas y disminución de las lluvias, mientras se encuentran en la etapa de desarrollo reproductivo, es decir durante la floración o llenado de vainas, se produce una sequía denominada sequía terminal (Palta *et al.* 2016). Dado que la etapa de floración es crítica para lograr una buena productividad, la estrategia de escape es más ventajosa en lugares donde ocurren sequías terminales con mayor frecuencia. Estas sequías afectan el

crecimiento reproductivo de especies como trigo y arroz, en que se ha observado esterilidad masculina parcial que conlleva a una reducción significativa en la producción de grano, o maíz, que experimenta aborto de embriones cuando la sequía ocurre luego de la polinización (Su *et al.* 2013). En contraste, los cultivos precoces capaces de completar su ciclo de vida antes de la ocurrencia del déficit hídrico, no son afectados en comparación con los cultivos tardíos (Meyre *et al.* 2001). En *Phaseolus vulgaris* sometido a sequía, se observó una tendencia al escape mediante la aceleración del desarrollo reproductivo de plantas cultivadas en déficit hídrico (Acosta *et al.* 2009). En tanto que en maíz (*Zea mays*) se han encontrado 16 líneas de maduración temprana, desarrolladas en el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) altamente resistentes a condiciones de agua limitantes. Además, se ha encontrado que las variedades TZEE-129, EEYH-15, EEYH-3 desarrolladas por el IITA mostraron una maduración más temprana, de manera que escaparon el estrés por sequía y mostraron menores pérdidas en las etapas de floración y llenado de grano (Magashi *et al.* 2015; Badu *et al.* 2011).

### **2.2.2. Evasión**

Otra estrategia de resistencia a sequía es la evasión, la cual consiste en mantener a la planta en estado hidratado bajo sequía, manteniendo alto potencial hídrico en los tejidos. Las plantas que experimentan este mecanismo experimentan cambios morfológicos y fisiológicos como la acumulación diferencial de biomasa y la plasticidad en el crecimiento radicular, que les permiten absorber más agua y minimizar la pérdida de agua por transpiración, manteniendo el rendimiento (Wang y Yamauchi 2006; Blum 2005). La reducción en el tamaño foliar se ha observado en respuesta a estrés hídrico, debido a que una menor área foliar es ventajosa al tener menor requerimiento de agua. Sin embargo, de manera general esta característica está ligada a bajos rendimientos (Sinclair y Muchow 2001). La reducción en la pérdida de agua por transpiración es otro de los mecanismos de evasión, involucrando resistencia cuticular y estomatal incrementada, estomas pequeños y en menor cantidad, área foliar reducida y orientación vertical de las hojas (Sinclair y Muchow 2001).

Algunos cultivos, como el maní (*Arachis hypogaea*) sometidos a sequía en la etapa previa a la floración, expresan mecanismos de evasión, sin reducir su producción. Particularmente, se ha observado que los genotipos de maní con mayor masa radicular

producen más vainas en comparación con aquellos que tienen menor masa radicular (Jongrunklang *et al.* 2011).

En arroz (*Oryza sativa*), algunos mecanismos de evasión se han logrado mediante la expresión del gen OsAHL1. Este gen regula el desarrollo radicular, el contenido hídrico de las hojas, la tasa de pérdida de agua foliar, además de algunas características relacionadas con la tolerancia (Zhou *et al.* 2016).

La evasión; sin embargo, no evita la reducción en la tasa de crecimiento en cultivos sometidos a déficit hídrico prolongado. Por ejemplo, se ha observado que, en las primeras etapas de estrés hídrico, las especies *Juncus effusus* L., *Peltandra virginica* L., y *Saururus cernuus* L., *Justicia americana* L. Vahl presentaron mayor crecimiento radicular; sin embargo, tras un periodo de sequía de dos semanas, el crecimiento y la productividad disminuyeron significativamente (Touchette *et al.* 2007).

### **2.2.3. Tolerancia**

La tolerancia es una estrategia de resistencia compleja, que consiste en resistir el déficit hídrico manteniendo el metabolismo con un bajo potencial hídrico en los tejidos. Esta característica está asociada con el grosor de la cutícula, regulación de estomas, sistema radicular, balance hormonal, sistema de defensa antioxidante, ajuste osmótico, y mantenimiento de contenido de agua en los tejidos (Farooq *et al.* 2009). La tolerancia se da como resultado de alteraciones bioquímicas y fisiológicas a nivel celular y molecular causadas por cambios rápidos en niveles de ARNm, que llevan al incremento y acumulación de solutos intracelulares compatibles como azúcares y aminoácidos que permiten a las células realizar el ajuste osmótico necesario (Chaves *et al.* 2003; Amudha y Balasubramani 2011).

Tanto la evasión como tolerancia confieren a las plantas la capacidad de sobrevivir y completar su ciclo de vida en condiciones de sequía. Por lo cual estas características son muy importantes desde el punto de vista agronómico al permitir que la productividad en plantas afectadas por déficit hídrico se mantenga (Aroca 2012).

## 2.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A SEQUÍA

Tanto la evasión como la tolerancia a estrés hídrico son mecanismos de resistencia que involucran procesos de adaptación a nivel fisiológico, bioquímico y molecular que permiten a las plantas sobrevivir y responder en condiciones de sequía (Figura 2; Akinci 2013).

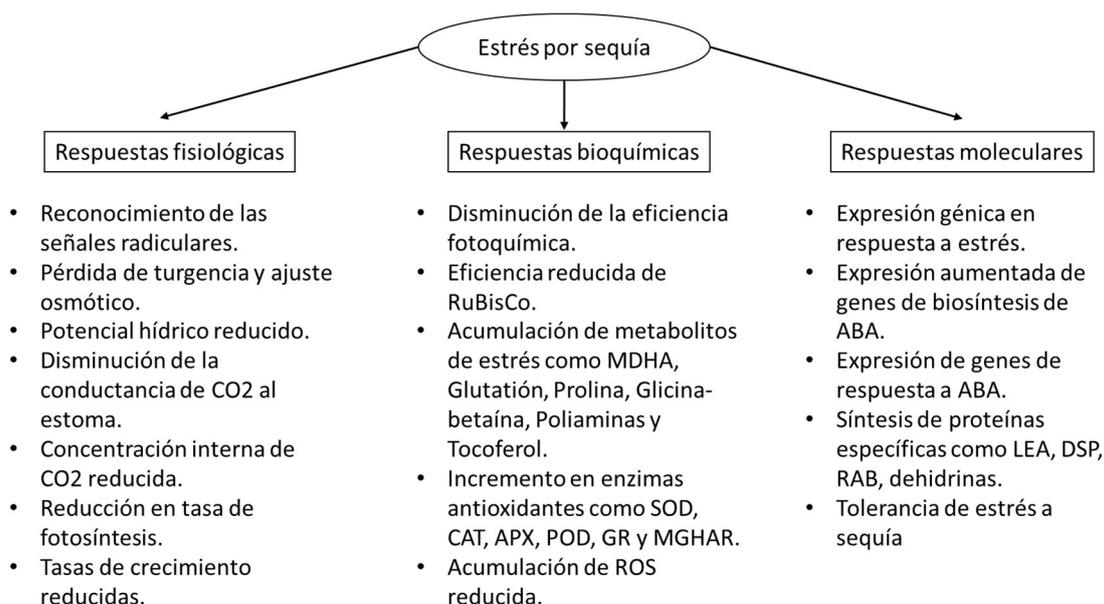


Figura 2: Adaptaci6n a sequía a nivel fisiol6gico, bioquímico y molecular.

Fuente Akinci (2013).

### 2.3.1. Mecanismos Fisiol6gicos y Bioquímicos

Se ha observado que los genotipos resistentes a sequía son capaces de mantener constante su potencial hídrico foliar por más tiempo y marchitarse más tarde que los genotipos no resistentes a sequía, manteniendo sus actividades metabólicas con un potencial hídrico bajo en sus tejidos. Sin embargo, estos efectos varían con la intensidad y severidad de la sequía (Aroca 2012). Entre los mecanismos de adaptaci6n a sequía a nivel fisiol6gico y bioquímico, se encuentran el ajuste osmótico, la dinámica variable de fitohormonas y el sistema de defensa antioxidante (Farooq *et al.* 2009).

### **2.3.1.1. Ajuste Osmótico**

El ajuste osmótico u osmoregulación es la acumulación de solutos orgánicos e inorgánicos bajo estrés hídrico para disminuir el potencial hídrico sin bajar el contenido de agua de los tejidos (Serraj y Sinclair 2002). Estos solutos, mantienen la presión de turgencia y a la vez protegen a las enzimas y macromoléculas celulares de los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y no tienen efectos nocivos en membranas, enzimas u otras macromoléculas, aún en altas concentraciones, por lo que son conocidos como solutos compatibles. Algunos de estos solutos compatibles son azúcares solubles, alcoholes, prolina, glicina-betaína, ácidos orgánicos, trehalosa, etc. (Cechin *et al.* 2006).

A nivel celular, el ajuste osmótico que producen los solutos reduce el daño inducido por estrés hídrico al mantener la turgencia a nivel foliar para mejorar la conductancia de estomas, lo cual mantiene la toma eficiente de CO<sub>2</sub>, y al promover la habilidad de absorción de agua por la raíz (Farooq *et al.* 2009). Además, el ajuste osmótico es uno de los procesos cruciales en adaptación a sequía, al mantener la actividad metabólica de los tejidos y permitir el crecimiento cuando hay rehidratación (Amudha y Balasubraman 2011).

Cuando el estrés hídrico es progresivo, las plantas continúan perdiendo agua a través de estomas abiertos y a través de la cutícula. A medida que el agua se va perdiendo, disminuye la turgencia del tejido foliar, y empieza a darse la marchitez, y luego la senescencia (Shin *et al.* 2015).

### **2.3.1.2. Variación de Fitohormonas**

En plantas sometidas a estrés hídrico, la regulación del crecimiento varía por alteración de la síntesis endógena de fitohormonas. Para regular el balance hídrico se produce mayor cantidad de retardantes del crecimiento (ABA y etileno), a expensas de la producción de promotores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas) (Farooq *et al.* 2009). Los procesos relacionados a la producción de ABA serán discutidos en la vía de señalización dependiente de ABA desarrollada en el punto 4.1. Las auxinas, por su parte, parecen cumplir un rol indirecto en las primeras etapas del estrés hídrico induciendo la formación

de nuevas raíces tras romper la dominancia apical inducida por citoquininas (Peleg y Blumwald 2011). Sin embargo, en arroz se ha encontrado que el estrés hídrico disminuyó el contenido de ácido indol acético por un cambio a nivel transcripcional de los genes involucrados en la síntesis de auxinas (Du *et al.* 2013). En este mismo estudio, se observó un aumento en la producción de la enzima ácido jasmónico carboximetil transferasa que incrementó la síntesis de jazmonato de metilo, el cual a su vez puede estimular la producción de ABA en condiciones de sequía (Du *et al.* 2013). Con respecto al ácido salicílico, se ha observado que en *Arabidopsis thaliana* sometida a estrés osmótico, induce la producción de especies reactivas de oxígeno en tejidos fotosintéticos (Borsani *et al.* 2001). Además, se ha observado que los genotipos mutantes *acd6* y *cpr5*, acumuladores de ácido salicílico, presentan mayor tolerancia a estrés por sequía al inhibir la apertura de estomas (Okuma *et al.* 2014).

### **2.3.1.3. Sistema de defensa antioxidante**

En la mayoría de los organismos aeróbicos el estrés genera ROS que deben ser eliminadas o detoxificadas por diversas vías según su naturaleza. Algunas ROS son altamente tóxicas y deben ser detoxificadas rápidamente, por lo cual las plantas tienen un sistema de defensa antioxidante, el cual incluye enzimas y metabolitos no enzimáticos (Amudha y Balasubraman 2011). Los componentes enzimáticos incluyen la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, glutatión reductasa, y ascorbato peroxidasa. Dentro de los componentes no enzimáticos se encuentran el ácido ascórbico, tocoferol, glutatión reducido, B-caroteno, salicilatos y solutos compatibles (prolina, glicina-betaína, zeaxantina) según Aroca (2012).

Para mantener la integridad de la membrana, los radicales  $O_2^-$  son convertidos a  $H_2O_2$  y luego a  $H_2O$  por la ascorbato peroxidasa, y la glutatión reductasa. Además, la superóxido dismutasa cataliza la conversión de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , el cual es reducido por la ascorbato peroxidasa utilizando el ácido ascórbico como donador de electrones (Amudha y Balasubraman 2011). Los radicales ascorbato producidos son reducidos usando el glutatión reducido (GSH) como donador de electrones en una reacción catalizada por la dehidroascorbato reductasa. El glutatión oxidado (GSSG) es luego reducido por la glutatión reductasa, usando como coenzima al NADPH, completando el ciclo del ascorbato-glutatión (Meyer 2008). Este mecanismo parece ser más eficiente que la

catalasa y peroxidasa para reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y su eficiencia es variable entre el citosol y el cloroplasto dependiendo del tipo de planta (Aroca 2012).

Los carotenoides están asociados a los fotosistemas de las plantas y evitan la formación de los estados excitados de tripletes de clorofila (3Chl) que se forman a partir de estados excitados de clorofila simple (1Chl), los cuales reaccionan para formar oxígeno y ROS. De esta manera, previenen la formación de O<sup>2</sup>, mediante la disipación de la energía en forma de calor por reacciones de epoxidación y de-epoxidación (Jahns y Holzwarth 2012). Además, se ha demostrado que las plantas resistentes a sequía, muestran un incremento de niveles de carotenoides, indicando que existe fotoprotección según la cantidad de luz absorbida (MunnéBosch y Alegre 2000). Además, los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en carotenoides son hipersensibles al estrés fotooxidativo (Havaux y Kloppstech 2001).

Los solutos compatibles se acumulan para proteger la integridad de la membrana y asegurar la entrada de agua al interior de la célula. Estos incluyen azúcares, compuestos amonios cuaternarios (glicina betaína y alanina betaína), proteínas hidrofílicas (proteínas abundantes de embriogénesis tardía), proteínas solubles y el aminoácido prolina (Ajum *et al.* 2011; Chaves *et al.* 2003).

### **2.3.2. Mecanismos Moleculares**

La respuesta molecular de las plantas al estrés hídrico, está dada por la modificación en la expresión génica. Durante el déficit hídrico, diferentes tipos celulares responden incrementando o disminuyendo la expresión de algunos genes (Moreno 2009). Estos genes codifican proteínas con diversas funciones. Algunas protegen las células del déficit hídrico al tener funciones metabólicas importantes, en tanto que otras participan en la regulación de genes para la transducción de señales en respuesta al déficit hídrico (Amudha y Balasubraman 2011).

Por lo tanto, los genes regulados implicados en tolerancia a sequía están clasificados en dos grupos. El primer grupo codifica proteínas que protegen células y órganos del estrés hídrico, es decir proteínas funcionales involucradas en la estabilización de membrana, proteínas y homeostasis celular. En tanto, el segundo grupo codifica proteínas necesarias

para la regulación y transducción de la expresión génica, tales como factores de transcripción, quinasas y fosfatasa de proteínas y enzimas relacionadas con la síntesis de ABA (Figura 3; Madhava *et al.* 2006; Sarwat *et al.* 2013). Las proteínas funcionales incluyen proteínas que trabajan directamente en la tolerancia a estrés. Las proteínas regulatorias son factores involucrados en la regulación de la transducción de señal y expresión génica, que probablemente trabajan en la respuesta a estrés.

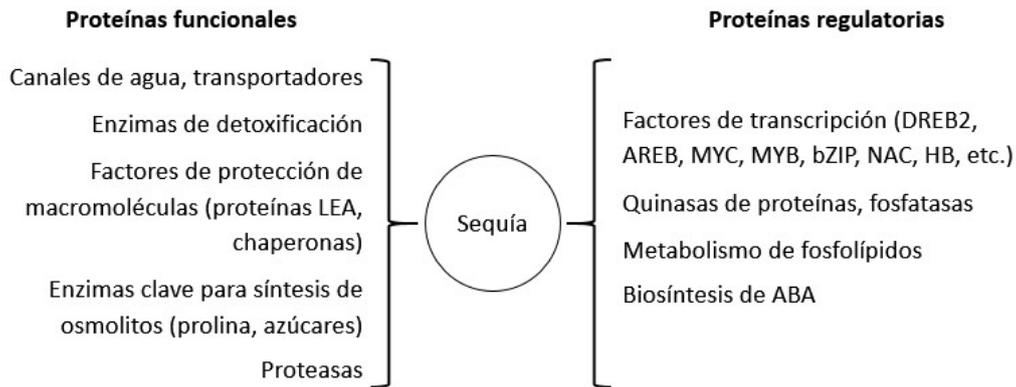


Figura 3: Proteínas inducidas por estrés por sequía en la respuesta y tolerancia a estrés por sequía.

Fuente: Shinozaki (2007).

### 2.3.2.1. Proteínas funcionales

Las proteínas funcionales protegen a las células y órganos del estrés hídrico. En este grupo se incluyen canales de agua e iones, enzimas necesarias para la formación de solutos compatibles, chaperonas moleculares, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía, proteínas involucradas en la degradación de otras proteínas y enzimas colectoras de especies reactivas de oxígeno, antioxidantes, y solutos compatibles (Ashraf *et al.* 2009).

Las aquaporinas son proteínas intrínsecas de membrana que facilitan y regulan el intercambio pasivo de agua a través de las membranas. Estas proteínas controlan el transporte pasivo de agua entre membranas, y se encuentran de manera normal en la membrana plasmática y vacuolar, en especial dentro de la raíz, donde regulan la toma de agua del suelo (Lian *et al.* 2004). Sin embargo, el papel que cumplen aún no ha sido aclarado debido a que se han observado efectos diversos. Por ejemplo, una proteína plasmática de membrana intrínseca de *Galega orientalis* denominada GoPIP1 incrementó

la sensibilidad a sequía sin mostrar variación cuando las plantas fueron sometidas a estrés salino en *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.* 2015). En cambio, plantas de tabaco que sobreexpresan la proteína PIP1b mostraron incremento en el vigor bajo condiciones favorables; sin embargo, esta proteína causó una marchitez rápida durante estrés hídrico (Ahaaron *et al.* 2003).

Las proteínas de choque térmico constituyen otro grupo de proteínas expresadas en estrés hídrico. Estas proteínas funcionan como chaperonas moleculares que estabilizan la estructura de otras proteínas al participar en reacciones de plegamiento y ensamblaje mediados por ATP, especialmente cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés (Aroca 2012).

Las proteínas de embriogénesis tardía (LEA) son proteínas no globulares altamente hidrofílicas, ricas en glicina y aminoácidos cargados resistentes a la coagulación y el efecto de altas temperaturas (De La Cruz *et al.* 2009). Estas proteínas se acumulan en altos niveles durante la etapa madura de la embriogénesis, justo antes del inicio de la desecación de la semilla. Algunas de ellas, como las dehidrinas, se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta al estrés osmótico generado por diversos agentes ambientales. Su función sería mantener la estructura de proteínas y membranas al agruparse de manera aleatoria alrededor de estas y secuestrar iones (Moreno 2009).

Durante la sequía, las limitaciones estomáticas de la fotosíntesis, reducción de la cadena transportadora de electrones fotosintética, fotorrespiración, forman una cantidad elevada de especies reactivas de oxígeno, radicales peróxidos de lípidos y otros agentes oxidantes. El sistema de defensa antioxidante mantiene el balance REDOX (Aroca 2012). Además, la formación de ROS como moléculas señalizadoras con funciones en la regulación del crecimiento, desarrollo y rutas de defensa (Mittler *et al.* 2004). El sistema de defensa antioxidante, el rol de las enzimas colectoras de especies reactivas de ROS, los antioxidantes y los solutos compatibles y enzimas relacionadas fueron discutidos en el punto 3.1.3.

La ubiquitina es una proteína involucrada en la degradación de otras proteínas. La ubiquitina es una proteína expresada universalmente que se une covalentemente a los residuos de lisina de diversas proteínas. La ubiquitinación de proteínas es un proceso que

depende de 3 enzimas: enzima activadora de ubiquitina (UBA: E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (UBC: E2) y la ubiquitina ligasa (E3) que catalizan la adición cíclica mediada por ATP de múltiples moléculas de ubiquitina a la proteína diana (Lyzenga y Stone 2012). Las proteínas que se unen a la ubiquitina son reconocidas y degradadas por el sistema Ubiquitina Proteasoma 26S, lo cual regula procesos de embriogénesis, morfogénesis y desarrollo de órganos (Pokhilko *et al.* 2011). Además, remueve las proteínas anormales, regula vías de señalización crucial. En situaciones de estrés, se ha observado el aumento de ubiquitina en plantas debido a que hay un exceso en el daño oxidativo, con la consiguiente necesidad de remover proteínas dañadas (Guo *et al.* 2004). Por ejemplo, en plantas de tabaco la sobre expresión del gen de ubiquitina de *Triticum aestivum* Ta-Ub2 mejora la tolerancia a estrés hídrico, favoreciendo un crecimiento más vigoroso, sin afectar el crecimiento y desarrollo en condiciones favorables (Guo *et al.* 2008).

### **2.3.2.2. Proteínas necesarias para la regulación y transducción de la expresión génica**

La tolerancia a estrés hídrico es un fenómeno complejo que involucra la expresión de diversos genes, los cuales son inducidos y regulados en condiciones de estrés (Kavar *et al.* 2007). Los elementos que cumplen un rol en la regulación incluyen los factores de transcripción, un grupo de proteínas que actúan durante la transducción de señales, capaces de modular la expresión génica mediante la unión a elementos de respuesta cis en la región promotora de diversos genes relacionados a estrés (Singh y Laxmi 2015). Estos factores están categorizados en diversas familias denominadas AREB, DREB, ERF, MYB, WRKY, NAC, bZIP.

Otras proteínas con funciones regulatorias son las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que están evolutivamente conservadas en la transducción en cascada de señales extracelulares al núcleo para un ajuste celular apropiado. Esta cascada consta esencialmente de tres componentes, una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPK conectada entre sí la fosforilación (Sinha *et al.* 2011). En *Arabidopsis* se ha encontrado que la expresión de AtMEKK1 y AtMPK3 se incrementó por el estrés por la sequía (Mizoguchi *et al.* 1996). Además, el estrés de sequía

resultó en la activación de OsMSRMK2 y OsMAPK5 en plantas de arroz (Xiong *et al.* 2003, Agrawal *et al.* 2002).

Los factores de transcripción cremallera de leucina básica (bZIP) son proteínas con un dominio conservado compuesto de una localización altamente básica junto a una región de unión al ADN en el extremo amino terminal, y una región rica en leucina para dimerización en el extremo C-terminal (Wang *et al.* 2015). Estos factores se han reportado como dependientes de ABA en plantas modelo como *Arabidopsis* (Joshi 2016). Por ejemplo, plantas de arroz que sobreexpresan OsZIP16 muestran tolerancia significativamente más elevada en las etapas de plántula y macollamiento (Chen *et al.* 2012).

La proteína de unión al elemento de respuesta a ácido abscísico (AREB/ABFs o factor de unión a ABRE) es un factor de transcripción importante al modular la expresión de genes en la vía de señalización dependiente de ABA en respuesta a sequía (Madhava *et al.* 2006). Estos factores de transcripción actúan sobre un elemento cis ABRE (elemento de respuesta a ABA) de 8 pares de bases (pb) conservada en la región promotora de diversos genes PyACGTGG/TC (Yoshida *et al.* 2014). Las proteínas AREB/ABFs pertenecen a la familia de cremallera de leucina básica (bZIP), por lo cual tiene en su estructura un dominio bZIP y cuatro dominios conservados de fosforilación para la quinasa treonina serina (SnRK2), los cuales solo son funcionales luego de su fosforilación inducida por ABA (Joshi *et al.* 2016). En estudios realizados en *Arabidopsis* (Li *et al.* 2014), arroz (Oh *et al.* 2005) y soja (Barbosa *et al.* 2013), se ha demostrado que la sobreexpresión del factor AREB1 mejora la tolerancia a sequía, principalmente durante el periodo vegetativo.

El factor de unión al elemento de respuesta a etileno/APETALA (ERFs) es una familia de factores de transcripción caracterizados por un dominio de unión al ADN altamente conservado el cual se une a la caja GCC, una secuencia de ADN involucrada en la transcripción en respuesta a etileno (Song y Hou 2013). Esta familia de proteínas ha sido categorizada en cuatro subfamilias, según el número y similitud de sus dominios ERF. Estas subfamilias incluyen Apetala 2 (AP2), proteínas similares a los factores de transcripción insensibles a ABA del tipo ABI3/VP1 (RAV por sus siglas en inglés), proteínas de unión a los elementos de respuesta a deshidratación (DREB), y elementos de respuesta a etileno (ERF) (Joshi *et al.* 2016). Estas proteínas se han estudiado por su

participación en la respuesta a estrés mediada por etileno en la vía de señalización independiente de ABA (Müller y Munné-Bosch 2015), estando relacionadas con la tolerancia incrementada a anoxia, hipoxia y sequía en *Arabidopsis* y arroz (Pegoraro *et al.* 2013). Sin embargo, en arroz, algunos ERF como es el caso de ERF109 parecen afectar negativamente la biosíntesis de etileno y la tolerancia a sequía (Yu *et al.* 2016).

Las proteínas de unión a los elementos de respuesta a deshidratación (DREB) y las proteínas de unión a las repeticiones C (CBF) son factores de transcripción que se unen al elemento de respuesta a sequía (DRE). DRE el cual es un elemento cis conservado de 9 pares de bases (TACCGACAT) reconocida por DREB, en tanto que la secuencia núcleo (A/GCCGAC) y un elemento cis llamado repetición C (CRT) pueden ser reconocidos por DREB y CBF (Singh y Laxmi, 2015). Estos factores de transcripción activan la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés corriente abajo en la vía independiente de ABA (Zhao *et al.* 2006). En contraste con ABRE, una simple copia de DRE es suficiente para inducir genes en plantas que sufren estrés osmótico. La sobreexpresión de DREB1B/CBF1 o DREB1A/CBF3 es capaz de inducir la expresión de genes inducibles por estrés, dando a plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* una mayor tolerancia a frío y sequía, así como menor tamaño (Kasuga *et al.* 1999). Por otra parte, los factores de transcripción DREB2A tienen afinidad por secuencias A/GCCGACNT y están relacionados con la expresión de la regulación génica bajo estrés por salinidad, en tanto que DREB2B se unen a regiones ACCGAC, las cuales son altamente inducidos en respuesta a condiciones de estrés por sequía (Sakuma *et al.* 2006).

Los factores de transcripción NAC (proteínas con un dominio no meristemo apical (NAM) y un dominio cotiledón en forma de copa (CUC2)) son proteínas que constituyen una de las familias más grandes de factores de transcripción en plantas (Nuruzzaman *et al.* 2013). Estas proteínas están involucradas en diversos procesos de desarrollo y además participan en la señalización de estrés biótico y abiótico (Singh y Laxmi 2015). Estas proteínas tienen una región conservada NAC en la región terminal N de orientación al núcleo, unión al ADN y formación de homodímeros y heterodímeros, y una región terminal C variable cuyo rol es la regulación transcripcional (Joshi *et al.* 2016). Los factores de transcripción NAC interactúan con la secuencia de reconocimiento a NAC (NACRS) que consiste en la secuencia ANNNNNTCNNNNNNNACACGCATGT, en la región promotora del gen de respuesta temprana a deshidratación (ERD1) (Shao *et al.*

2015). Muchos NACs están involucrados en la respuesta a sequía, participando en la ruta de señalización independiente de ABA (Nuruzzaman *et al.* 2013; Shao *et al.* 2015).

La familia de factores de transcripción MYB son proteínas que tienen en su estructura un dominio de unión a ADN MYB (Abe *et al.* 1997). Esta familia se divide en cuatro clases 1RMYB, R2R3MYB, 3RMYB y 4RMYB, siendo los MYB tipo R2R3 típicos de plantas (Baldoni *et al.* 2015). Estos factores controlan procesos diversos como el desarrollo vegetativo, la forma celular, la morfogénesis de pétalos, la diferenciación y proliferación celular, el desarrollo de tricomas y respuesta a estrés biótico y abiótico (Ambawat *et al.* 2013). En plantas, se ha encontrado relación de estos factores de transcripción con la transducción del gen RD22 (proteína de respuesta a deshidratación 22) y otras señales mediada por ABA, ácido salicílico, ácido giberélico y ácido jasmónico (Ambawat *et al.* 2013; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007). Los factores de transcripción MYC pertenecen a la familia hélice-bucle-hélice básica (bHLH), que se unen al promotor MYC, relacionado con genes de respuesta a ABA. MYB y MYC parecen regular la expresión de RD22 y conferir a las plantas mayor sensibilidad a ABA (Singh y Laxmi 2015).

Los factores de transcripción WRKY han sido reportados en estrés por sequía. Estas proteínas tienen uno o dos dominios WRKY, involucrados en la unión a ADN. La unión se produce a una secuencia conservada denominada caja W, regulando la expresión génica (Rushton *et al.* 2010). Estos factores de transcripción se han encontrado como reguladores positivos durante la germinación de la semilla, estando también asociados a la señalización dependiente de ABA en condiciones de estrés abiótico (Singh y Laxmi 2015). Además, se ha encontrado que WRKY40 se une a los promotores de los genes de factores de transcripción inducidos por estrés DREB1A/CBF3, DREB2A, y MYB2, reprimiendo su expresión (Shang *et al.* 2010).

Otras proteínas con funciones regulatorias son las quinasas de proteínas en la señalización (quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPK), quinasas de proteínas receptoras, quinasas de proteínas ribosomales, quinasas de proteínas de regulación de la transcripción, quinasa histidina, y proteínas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos) y fosfatasa de proteínas (fosfoesterasas y fosfolipasas) las cuales actúan activando diversas vías enzimáticas e induciendo la expresión de diversos factores de transcripción en respuesta a estrés abiótico (Joshi *et al.* 2016; Zhu 2002).

## 2.4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO

El déficit hídrico es percibido por la planta en las células guardián o en una zona cercana a estas, probablemente por una disminución de los potenciales osmóticos a nivel intracelular (Madhava *et al.* 2006). Esto ocasiona la activación de vías de señalización molecular en respuesta a estrés abiótico, la cual comprende pasos como la percepción, transducción y respuesta a una señal, combinados con la activación de reacciones metabólicas y fisiológicas (Joshi *et al.* 2016). En este proceso, las plantas son capaces de percibir los factores de estrés a través de receptores localizados en la membrana celular. Luego las moléculas de señalización receptoras activan a moléculas intracelulares mediante segundos mensajeros como los iones calcio, inositol fosfato, ROS, AMPc y GMPc, azúcares y óxido nítrico (Zhu 2002). Estas moléculas inician las rutas de señalización para transducir la señal de estrés hídrico a los genes diana. En la Figura 4 se muestran ejemplos de componentes de señalización en cada uno de los pasos. Moléculas de señalización secundaria pueden ocasionar liberación del receptor mediada por Calcio (indicada como una flecha de retroalimentación). Además, se muestran ejemplos de los acompañantes señal que modulan las rutas principales. Estos acompañantes pueden ser regulados por la ruta principal. La señalización puede también ser independiente de Ca<sup>2+</sup> o de las moléculas señal secundarias en pasos tempranos de la señalización. Abreviaturas: GPCR, G-receptor acoplado de proteína; InsP, inositol polifosfato; RLK, kinasa similar al receptor.

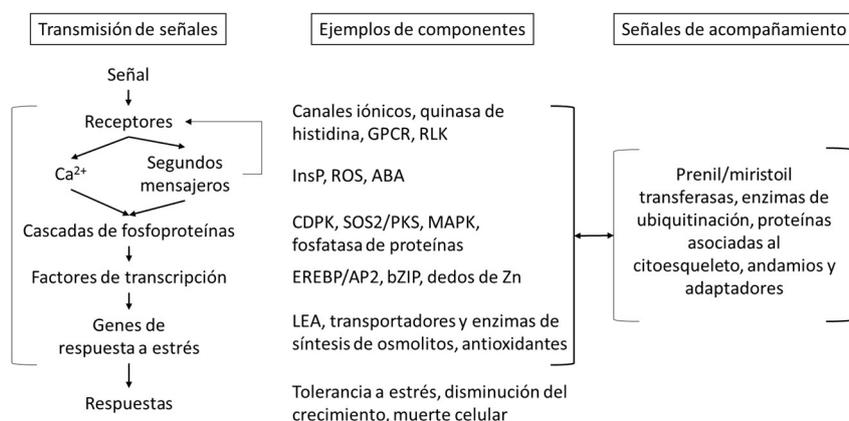


Figura 4: Ruta general para la transducción de señales de estrés hídrico en plantas.

Fuente: Xiong *et al.* (2002).

A nivel molecular, la acumulación de iones, las variaciones en la turgencia celular y los productos del daño por estrés son capaces de activar segundos mensajeros. Estos están agrupados en tres categorías funcionales que dan como resultado la expresión de genes corriente abajo (Zhu 2002).

a. Señalización de estrés iónica y osmótica para el restablecimiento de la homeostasis celular bajo condiciones de estrés, que se lleva a cabo por moléculas como inositol 3-fosfato (IP3), diacilgliceroles (DAGs), ácido fosfatídico (PA), etc., las cuales a bajas concentraciones son capaces de inducir aumento de Calcio ( $Ca^{++}$ ) citoplasmático y expresión de genes de respuesta adaptativa corriente abajo (De Wald *et al.* 2001).

b. Señalización de detoxificación para controlar y reparar los daños por estrés, que incluye eventos como hidrólisis de fosfolípidos, cambios en la expresión de genes de proteínas LEA, dehidrinas, chaperonas, proteinasas para remover proteínas desnaturalizadas, activación de enzimas involucradas en la generación y retiro de las especies reactivas de oxígeno, y otras proteínas de detoxificación (Zhu 2002).

c. Señalización para coordinar la división y expansión celular a niveles adecuados a las condiciones de estrés particulares. La división celular y maquinarias de expansión son reguladas por señalización activa. Estos procesos disminuyen durante estrés hídrico como resultado de supresión de transcripción de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) e inducción de inhibidores de CDKs (Bursens *et al.* 2000).

Estas moléculas son capaces de activar diversos mecanismos de tolerancia a través de la activación de múltiples factores de transcripción. Dependiendo de los factores de transcripción expresados y su dependencia de ABA, se han agrupado dos rutas de señalización que son resumidas en la Figura 5 (Madhava *et al.* 2006). En esta Figura Los factores de transcripción y los elementos CIS se muestran en Figuras ovaladas y rectangulares, respectivamente. Abreviaturas: ABA, ácido abscísico; AREB, proteínas de unión a ABRE; ABRE, elemento de respuesta a ABA; CE, elemento de acoplamiento; MYBR, sitio de reconocimiento de MYB; MYC, sitio de reconocimiento de MYC; DREB, proteína de unión a DRE; CBF, factor de unión a repeticiones C; DRE/CRT, elemento de respuesta a la deshidratación/repeticiones C; LEA, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía.

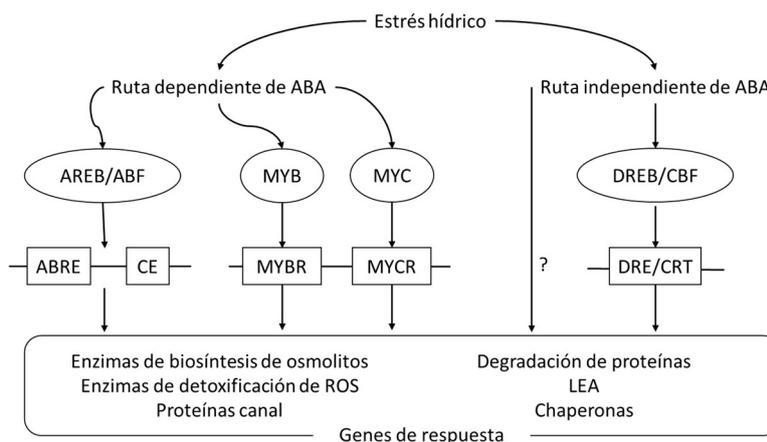


Figura 5: Factores de transcripción y elementos CIS involucrados en la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico.

Fuente: Madhava *et al.* (2006).

#### 2.4.1. Vía dependiente de ABA

El ABA, además de influenciar en el crecimiento y desarrollo, regula el balance hídrico y la tolerancia a estrés osmótico (Farooq *et al.* 2009). En todas las especies, se ha encontrado un incremento significativo en la cantidad total de ABA al ser sometidas a estrés, funcionando como un mensajero esencial en la respuesta de la planta a estrés hídrico (Seiler *et al.* 2011). Esta hormona es sintetizada en los plastidios y el citosol, a partir de compuestos carotenoides por enzimas ABA-sintetasas (zeaxantina epoxidasa, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa y aldehído oxidasa) inducidas en los ápices radiculares o las células del parénquima de los haces vasculares por estrés salino e hídrico (Koiwai *et al.* 2004). Luego, es conjugado en el citosol para ser enviado desde las raíces hasta las hojas. La forma libre puede escapar del xilema a los tejidos circundantes. En el espacio apoplástico la beta-D-glucosidasa hidroliza el ABA conjugado hacia su forma libre, lo cual activa un sistema de señalización en las células guardián que induce el cierre de estomas y muchas otras respuestas conocidas (Madhava *et al.* 2006). La ruta completa de la biosíntesis de ABA es mostrada en la Figura 6. Esta ruta consta de 3 pasos: (a) Síntesis del precursor de carotenoides en los pasos tempranos de biosíntesis del ABA. El ABA es sintetizado de los carotenoides C40 (fitoeno,  $\zeta$ -caroteno, licopeno y  $\beta$ -caroteno). Los carotenoides son sintetizados de un compuesto C5, IPP. En plástidos, IPP es sintetizado mediante el DXP del gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. (b) Formación del

epoxicarotenoide y su clivaje en los plastidios. El primer paso de esta ruta de síntesis de ABA son los dos pasos de epoxidación de la zeaxantina para formar transviolaxantina, catalizada por ZEP. NCED cataliza el clivaje oxidativo de un isómero 9-cis de epoxicarotenoide como la 9-cis-violaxantina y la 9'-cis-neoxantina para formar xantoxina. Las enzimas que catalizan la formación la conversión de la trans-violaxantina a 9-cis-violaxantina o 9'-cis-neoxantina no han sido identificadas. (c) reacciones en el citosol para la formación de ABA. Se proponen tres rutas posibles. La primera ruta a través de ABAld (1) es la que funciona más probablemente en plantas, como se muestra por la caracterización de Arabidopsis AO, la cual cataliza la oxidación de ABAld. Un miembro de SDR como ABA2 en Arabidopsis convierte la xantoxina a ABAld. La segunda ruta vía ácido xantoxico (2) podría también funcionar. En esta ruta, la xantoxina es primero oxidada a ácido xantoxico por AO y luego el ácido xantóxico es convertido a ABA, presumiblemente por SDR. La ruta (3) via alcohol abscísico parece ser una ruta alternativa pero es importante en mutantes impedidos en la oxidación de ABAld. Las enzimas (en rojo) y los nombres compuestos (en negro) discutidos en el texto se muestran en la Figura 6. Abreviaturas: ABA, ácido abscísico; ABAld, aldehído abscísico; AO, aldehído oxidasa; DXP, 1-deoxi-Dxilulosa-5-fosfato; DXS, DXP sintasa; GGPP, geranilgeranilpirofosfato; IPP, isopentil pirofosfato; NCED, 9-cisepoxicarotenoide dioxigenasa; PDS, fitoeno desaturasa; PSY, fitoeno sintasa; SDR, reductasa/deshidrogenasa de cadena corta; ZEP, zeaxantina epoxidasa. Tomado de Seo et al. (2002).

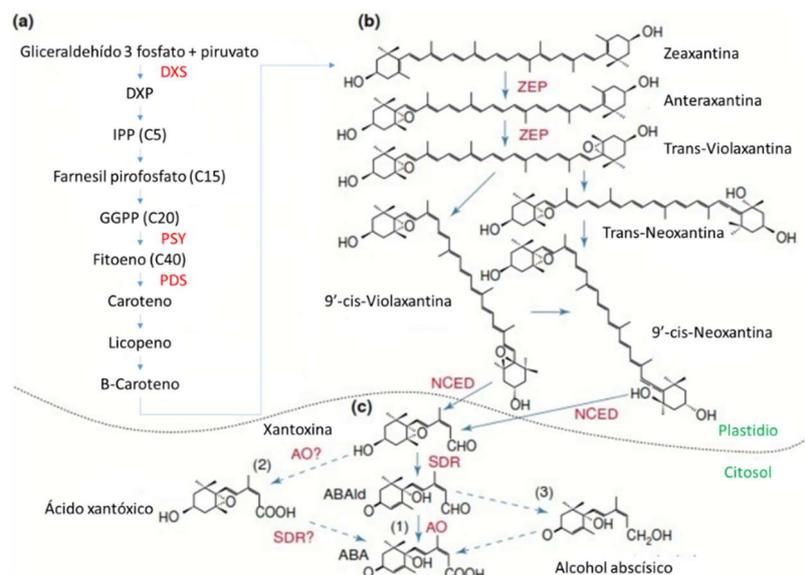


Figura 6: Ruta de la biosíntesis del ABA en plantas.

Cuando hay déficit de agua, hay un incremento en la concentración de ABA, la cual es reconocida por los receptores de ABA PYR/PYL/RCARs (pyrabactin resistance/pyrabactin resistance1- like/regulatory component of ABA receptors). Estos receptores se encuentran como dímeros y se separan en sus respectivos monómeros al unirse a ABA (Miyakawa *et al.* 2013). Los monómeros presentan un sitio de unión a la fosfatasa de proteínas 2C (PP2C), por lo cual, la actividad de PP2C es inhibida (Santiago *et al.* 2011). PP2C es un regulador negativo de la señalización de ABA que desfosforila e inactiva a la quinasa de proteínas relacionadas a SNF (SnRK2s) al estar ligada con ella. Por lo cual al darse la inhibición de PP2C, las SnRK2s son liberadas en su forma activa, se acumulan en la célula y fosforilan a diversos componentes, entre los que se cuentan los canales iónicos SLAC1 y KAT1 en las células guardián y el cierre de los estomas (Geiger *et al.* 2009; Sato *et al.* 2009), el factor ABI5 durante el desarrollo de la semilla y dormancia (Nakashima *et al.* 2009), y los factores de transcripción AREB/ABF, en tejidos vegetativos y tolerancia a estrés y regulación del crecimiento (Joshi *et al.* 2016). La fosforilación activa a los factores de transcripción AREB/ABF, dándoles la capacidad de unión a la secuencia ABRE de diversos genes, lo cual activa la expresión de los genes que responden a ABA (Fang y Xiong 2014). Entre los que se encuentran diversas enzimas relacionadas con la síntesis de osmolitos, proteínas canal, chaperonas, proteínas LEA, y enzimas colectoras de ROS (Madhava *et al.* 2006).

Además, el ABA induce la expresión de los factores de transcripción AREB/ABF, MYB y MYC. Los factores de transcripción AtMYB2 y RD22BP1 (AtMYC2) actúan sobre las regiones promotoras MYBR y MYCR respectivamente. Estas secuencias se encuentran en la región promotora del gen RD22. La activación de RD22 requiere de la síntesis de proteínas de novo, por lo cual se dice que la respuesta a sequía mediada por MYB y MYC ocurre en una etapa tardía de la vía dependiente de ABA (Abe *et al.* 1997). Sin embargo, se ha observado que no se puede inducir el cierre de estomas completamente al aplicarse altas concentraciones de ABA, por lo que se ha propuesto una vía de señalización alternativa en respuesta a sequía a nivel estomático (Yokota *et al.* 2002).

#### 2.4.2. Vía Independiente de ABA

Los factores de transcripción involucrados en vía independiente de ABA son DREB1/CBF y DREB2, los que son expresados de manera efímera poco después que la planta siente la sequía y regulan de forma positiva los genes diana involucrados en la tolerancia (Sarwat *et al.* 2013). El elemento cis involucrado en la secuencia promotora de los genes diana es el DRE/CRT (Jenks 2005). Este elemento fue caracterizado en *Arabidopsis*, en la región promotora del gen RD29A (Madhava *et al.* 2006) que codifica para una proteína que se acumula en respuesta a estrés osmótico. Además, se ha observado que DREB2A y DREB2B se inducen mediante la deshidratación, pero no durante el estrés por frío, lo cual indica el papel fundamental de DREB2 en la tolerancia a estrés por sequía (Sarwat *et al.* 2013). La unión del factor de transcripción a este promotor activa la expresión génica en la vía independiente de ABA.

A pesar de que la activación de DRE por estrés osmótico es independiente de ABA, esta hormona podría ser necesaria para la activación completa de genes de respuesta a estrés que contienen el promotor DRE (Jenks 2005). Ambas vías de señalización pueden tener un efecto simultáneo, como se ha postulado al encontrar que en *Arabidopsis* la región promotora del gen RD29 contiene los elementos CIS DRE y ABRE, habiéndose demostrado en experimentos sobre su activación en protoplastos de hojas de *Arabidopsis* que tanto DREBs como ABREs promueven la activación de la expresión del gen RD29 de manera conjunta (Narusaka *et al.* 2003).

La expresión de estos genes afecta procesos fundamentales de la célula, aumentando el empaquetamiento del ADN, biogénesis de ribosomas, y regulación negativa del plegamiento de proteínas (Harb *et al.* 2010), induciendo cambios fisiológicos y morfológicos como disminución de la capacidad de fotosíntesis, marchitez, cierre de estomas, redistribución de nutrientes en la célula y reducción en el crecimiento y alargamiento celular, y cuando el estrés hídrico es severo, se puede detener la capacidad catalítica, llevando a la interrupción del metabolismo y finalmente a la muerte de la planta (Shao *et al.* 2009).

## 2.5. ESTRÉS HÍDRICO EN LEGUMINOSAS

Las leguminosas representan la familia vegetal más utilizada, con 20 000 especies, teniendo usos diversos que van desde pastizales hasta alimentación humana (Stacey 2008). Las especies cultivadas incluyen frijol (*Phaseolus sp.*), soja (*Glycine max*), alverjas (*Pisum sativum*), maní (*Arachis hypogaea*), entre otros, representando el 27% de la producción primaria mundial, y el 33% del nitrógeno proteico dietario que requieren los humanos (Graham y Vance 2003). Dentro de esta familia, las leguminosas de granos constituyen algunos de los cultivos más susceptibles a las sequías debido a que son cultivadas en sistemas de producción de secano, estando expuestas a estrés por sequía durante su ciclo fenológico (Rosenzweig y Colls 2005).

En estos cultivos, las sequías pueden afectar en cualquier punto del ciclo fenológico retardando el crecimiento, o disminuyendo los rendimientos de grano. Sin embargo, los déficits hídricos que ocurren durante la reproducción y llenado de granos son más devastadores (Delmer 2005; Pushpavalli *et al.* 2014). Las sequías terminales afectan al cultivo mayormente durante el periodo de granos, pero pueden empezar antes de la floración (Pushpavalli *et al.* 2014).

En leguminosas, las sequías moderadas a severas reducen la biomasa vegetal, el rendimiento de granos, y los componentes de rendimiento (Baroowa y Gogoi 2013). La magnitud de la reducción depende de la duración e intensidad del estrés hídrico, variabilidad genotípica, y etapa de desarrollo fenológico. Por esto, se han desarrollado algunos enfoques para mejorar la resistencia a sequía terminal en las leguminosas de grano y así reducir las pérdidas en el rendimiento en áreas afectadas por sequías. El mejoramiento en estas especies se ha basado en el desarrollo de características para resistencia a sequía, el cultivo de plantas ciclos de vida cortos y eficiencia de uso de agua. Para lo cual se han usado 4 enfoques: 1) selección y mejoramiento por resistencia a sequía, 2) mapeo de QTL's relacionados con resistencia, 3) ómicas (transcriptómica, proteómica, metabolómica), y 4) el enfoque transgénico (Farooq *et al.* 2017).

El enfoque transgénico se ha basado en la predicción de genes candidatos asociados con individuos que presentan características deseables. De esta manera, ha sido posible identificar genes de respuesta a estrés en diferentes especies y diseñar leguminosas resistentes a sequía terminal usando la transformación genética por transferencia a través de biolística o mediada por *Agrobacterium*. Los genes de mayor interés son aquellos capaces de mejorar la resistencia a sequía sin reducir el rendimiento. Es así que se han desarrollado algunas leguminosas resistentes a sequía utilizando genes aislados de leguminosas y de otras especies.

Algunas experiencias iniciales involucran el desarrollo de plantas resistentes a sequía introduciendo productos de genes únicos que codifican enzimas involucradas en la modificación de la membrana lipídica (Kodama *et al.* 1994), proteínas de embriogénesis tardía y biosíntesis de osmoprotectores (Kavikishore *et al.* 1995). Sin embargo, el proceso depende de factores como la duración de la sequía, la habilidad para transferir el mecanismo de resistencia y el efecto sobre la biomasa y rendimiento (Mathur *et al.* 2009). Así mismo, se ha trabajado tanto con los genes que participan en las vías regulatorias, como con aquellos encargados de la expresión de diversos productos. Por ejemplo, el gen P5CSF129A con funciones osmorreguladoras, codifica la enzima D1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) fue introducido en un genotipo de garbanzo, incrementando la biosíntesis de prolina con una reducción en los radicales libres y niveles de malonaldehído, pero sin incrementar la acumulación de biomasa. Además, se ha observado que la introducción de este gen mejoró sustancialmente la eficiencia de transpiración en este cultivo (Mathur *et al.* 2009). El mismo gen de *Arabidopsis* ha sido introducido en plantas de soja transgénicas (P5CS), las cuales mostraron mayor tolerancia a estrés por sequía debido a un elevado contenido de prolina libre y contenido relativo de agua, y a una reducción en el nivel de ROS, particularmente peróxido de hidrógeno (de Ronde *et al.* 2004).

Otras experiencias han sido desarrolladas con genes regulatorios, teniendo en cuenta la sobreexpresión de diversos factores de transcripción. Dentro de estas, Anbazhagan *et al.* (2014) diseñaron plantas de garbanzo tolerantes a sequía a través de transformación mediada por *Agrobacterium*. Estas plantas sobreexpresaban el gen DREB1A gobernado por el promotor rd29A de tolerancia a sequía en *Arabidopsis*. En dicho trabajo, todos los eventos transgénicos mostraron incremento en la expresión del gen DREB1A antes de la

pérdida del 50 por ciento de humedad en el suelo, lo cual mostró la eficacia del constructo rd29A: DREB1A en los mecanismos referidos a toma de agua, respuesta estomática, eficiencia en transpiración y arquitectura de enraizamiento en plantas sometidas a estrés hídrico. Otro de los trabajos sobre resistencia a sequía en leguminosas fue desarrollado por Xuan *et al.* (2015). Este trabajo tuvo el objetivo de estudiar el clonamiento y expresión del gen GmDREB2 de los cultivares Vietnamitas resistentes a sequía para conocer las bases para mejorar la tolerancia a sequía en soja en Vietnam. El gen GmDREB2 de diversos cultivares de soja fue amplificado y clonado. En este trabajo se aisló la región codificante fue aislada de 6 cultivares de soja, conteniendo 480 pb y codificando 159 aminoácidos. Además, se diseñó y transformó en tabaco el vector recombinante 35S-GmDREB2 y se logró la expresión de la proteína recombinante en 5 líneas de tabaco con un peso molecular de 20KDa. Con ello, se demostró que GmDREB2 puede ser expresado en soja y diversas leguminosas para mejorar la tolerancia a sequía.

## **2.6. ESTRÉS HÍDRICO EN EL GÉNERO *Lupinus spp.***

Las plantas de *Lupinus* son susceptibles a sequía en todas las fases fenológicas del cultivo, desde la etapa de germinación, en el estadio de desarrollo vegetativo y reproductivo (Procrop 2011).

En la etapa de germinación, la humedad es vital para el establecimiento de *Lupinus*, dado que influye sobre el número de días que le toma a una planta emerger. Bajos niveles de agua reducen la extensión del hipocótilo e incrementan el crecimiento de la radícula. Esto aumenta el suministro de agua a las plántulas, pero restringe la emergencia, reduciendo la viabilidad, especialmente en suelos duros (Procrop 2011).

Durante el crecimiento vegetativo, *Lupinus* tiene menor capacidad que cultivos como trigo, garbanzo y lenteja para realizar ajustes osmóticos. En cambio, diversas especies de *Lupinus*, como *L. angustifolius*, *L. consentinii* y otras legumbres perennes muestran múltiples características de evasión a deshidratación (Rodrigues *et al.* 1995). Las raíces profundas le permiten a *Lupinus* acceder al agua que se encuentra en las capas más profundas dentro del perfil del suelo. Además, las plantas de *Lupinus* pueden reducir la tasa de pérdida de agua de diversas formas (Procrop 2011). Los estomas de esta planta son altamente sensibles a déficits hídricos por lo que se cierran más rápidamente

(Rodrigues *et al.* 1995). Por ejemplo, *L. angustifolius* presenta en la superficie superior de la hoja dos veces más estomas que en el envés. Además, cuando no hay suficiente agua, las hojas de *Lupinus* se enrollan para minimizar la intersección de radiación (Procrop 2011). La marchitez también puede ocurrir, pero en un potencial hídrico más elevado que en trigo, de manera que ocurre la pérdida de hojas mayores a medida que la sequía se vuelve más intensa (Rodrigues *et al.* 1995). Las plantas de *L. albus* sometidas a déficit de agua muestran senescencia foliar acelerada, pérdida masiva de hojas con impacto positivo sobre el ahorro del agua (Pinheiro *et al.* 2008). Si el estrés hídrico no es severo, las tasas de crecimiento pueden recuperarse completamente si la planta recibe luego el agua suficiente (Procrop 2011).

Sin embargo, cuando el déficit hídrico es severo, estas plantas son menos capaces de realizar ajustes osmóticos en el tejido vegetal para mantener su metabolismo (Procrop 2011). Algunos lupinos muestran cambios en metabolitos mayores de órganos como folíolos, peciolo, raíces, y tallo; la mayoría de las hojas se pierden y el tallo funciona como un almacén de reposición de azúcares (glucosa y sacarosa) y aminoácidos (asparagina y prolina) (Pinheiro *et al.* 2004). En tallo se ha observado también acumulación de carbohidratos solubles como monosacáridos, sacarosa, ciclitoles, y oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Piotrowicz 2007). Además, se ha reportado la producción y acumulación de dehidrinas (proteínas de respuesta a deshidratación, cuyo papel es conferir tolerancia) en tallo, y durante la maduración de la semilla (Pinheiro *et al.* 2008; Pinheiro *et al.* 2004).

Los cambios metabólicos específicos de tejidos que ocurren en las diferentes especies de *Lupinus spp.* sometidas a estrés hídrico, dependen de la intensidad del estrés y sugieren múltiples estrategias en tejidos diferentes para lidiar con el déficit de agua (Pinheiro *et al.* 2008). Además, el tallo parece funcionar como un órgano de almacenamiento temporal de metabolitos durante sequía (Pinheiro *et al.* 2004). Cuando el déficit hídrico es sostenido, el crecimiento de las ramas se hace más lento y los carbohidratos (asimilados) se desvían del crecimiento vegetativo a la etapa del desarrollo reproductivo (Procrop 2011).

Por otra parte, si el estrés por déficit hídrico se produce antes de la floración, o durante esta etapa, se produce el efecto más grande sobre el rendimiento. Este estrés ocasiona

aborto de flores y llenado de vainas deficiente. El estrés hídrico severo puede además acelerar el tiempo de floración, acortando el periodo de floración y el llenado de vainas (Procrop 2011). El déficit hídrico durante las fases del llenado de grano de *Lupinus*, origina cambios metabólicos bastante marcados como desviación de los fotoasimilados hacia ciertos órganos, y modificación de la composición mineral (Carvalho 2005). Estos cambios originan la reducción en el rendimiento y la calidad de las semillas.

Otros efectos de la sequía en *Lupinus spp.*, incluyen disminución de actividad metabólica en los nódulos, reducción de sacarosa y desaparición de gránulos de almidón (Comino *et al.* 1997).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron 25 accesiones precoces y 25 accesiones tardías de tarwi (*L. mutabilis* Sweet) (Anexo 1) donadas por el Banco de Germoplasma de Tarwi del INIA-Huancayo. Las semillas fueron evaluadas y seleccionadas según el peso de semilla y el grupo de accesiones con mayor peso de 100 semillas fue considerado para las siguientes etapas. El material fue sembrado en el tinglado del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Las plántulas fueron sembradas usando como sustrato una mezcla de arena con vermiculita en proporción 2:1 y regadas con solución hidropónica La Molina®.

#### 3.2. SELECCIÓN DE ACCESIONES DE *LUPINUS MUTABILIS* SWEET (TARWI) DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIA-HUANCAYO.

##### 3.2.1. Selección por sobrevivencia a sequía

Las plantas de *L. mutabilis* se cultivaron en un sustrato de arena con vermiculita (2:1). Cuando las plantas alcanzaron la 5ta hora verdadera fueron regadas a capacidad de campo (CC) y el riego se suspendió por 10 días tomando como referencia el trabajo realizado por Pinheiro *et al.* (2004) para luego restablecer el riego a capacidad de campo por 6 días consecutivos. El experimento consistió de 2 tratamientos: a) el grupo control que se mantuvo a capacidad de campo y b) el grupo al que se le suspendió el riego por 10 días. El contenido de agua en el sustrato fue determinado por el método gravimétrico (Reynold 1970). A CC el sustrato tuvo un contenido de agua del 20.89%. Después de 10 días sin riego, el contenido de agua en el sustrato fue de 1.51%. Este contenido de agua en el sustrato fue considerado como una sequía severa (Marchin *et al.* 2019). Las accesiones con mayor tolerancia a estrés hídrico fueron seleccionadas en base al porcentaje de sobrevivencia y peso seco de parte aérea.

##### 3.2.2. Peso seco de la parte aérea

Para esta determinación, se cortó el tallo a la altura del cuello de la planta y se llevó el material vegetal a secado por 72 horas a 105° C en estufa. Los pesos fueron determinados una vez alcanzado el peso constante.

### **3.2.3. Determinación del contenido de alcaloides**

Para la extracción de alcaloides se utilizó la metodología de Muzquiz *et al.* (1989). Según la cual a 2 g de semillas de tarwi molido se agregaron 32 ml de la mezcla de éter etílico (cloroformo: hidróxido de sodio 4N (20:10:2). Se agitó durante 30 min y se dejó reposar durante la noche. Se filtró en ampollas de decantación y el residuo se lavó dos veces con 20 ml de éter etílico. A los filtrados se añadió 10 ml de ácido clorhídrico 0.3 N. Los extractos ácidos se llevaron a pH 10 con hidróxido de sodio 4N y se extrajeron con 10 ml de cloroformo. Los extractos clorofórmicos se evaporaron a sequedad (30° C) y el residuo fue disuelto en 10 mL de metanol. El nivel de alcaloides se cuantificó utilizando el reactivo de Dragendorff como revelador y el software ImageJ para valorar la intensidad del revelado.

### **3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACCESIÓN P03 DE *LUPINUS MUTABILIS* SWEET EN CONDICIONES NORMALES Y DE SEQUÍA**

La variedad con mayor tolerancia a sequía fue sometida a 10 días de sequía, momento en que se evaluó el contenido de elementos y prolina en el tejido vegetal.

#### **3.3.1. Determinación del contenido de elementos**

Durante la etapa vegetativa, cuando las plantas alcanzaron el quinto entrenudo, se determinó el porcentaje de elementos en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina a partir de 3 g de tejido seco de muestras. Las muestras fueron secadas en estufa a 70 °C y posteriormente molidas en molino eléctrico. La determinación del nitrógeno se realizó por el método de micro-Kjeldahl modificado, utilizando la metodología de Nelson y Sommers (1980) y Jones (1991). El análisis de los elementos K, Ca, Mg y Na, fue realizado tras digestión vía húmeda en mezcla nitro-perclórica. Tras lo cual, se procedió a la lectura por espectrofotometría de absorción atómica usando el método de Zasoki y Burau (1977) modificado (ME.LF-03 y ME-LF09). Para la determinación de P, se empleó una modificación del método de Murphy y Riley (1962), en la cual se trabajó con el mismo extracto descrito en el párrafo anterior, el cual, tras reacción con el reactivo sulfomolibdico fue evaluado por colorimetría con azul de molibdeno. El azufre se determinó en el extracto anterior por turbidimetría con cloruro de bario, siguiendo el método de Tabatabai y Bremner (1970).

### **3.3.2. Determinación del contenido de prolina**

Durante la etapa reproductiva, cuando los brotes florales alcanzaron el estadio E06 (Altura 13 mm, Diámetro 5 mm, Peso 120 mg), se determinó la concentración de prolina en brotes y hojas según la metodología de Bates (1973). Se pesó 0.5 g de material vegetal, tras lo cual, se homogeneizó el tejido con 3 mL de Ácido Sulfosalicílico 3% (p/v) en nitrógeno líquido hasta lograr una pasta fina. El homogeneizado se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min, tras lo cual se tomó 1 mL del sobrenadante y se agregó 1 mL de ninhidrina 0.1 M (disuelta en 60 ml de ácido acético glacial caliente, luego se adicionó 40 mL de ácido fosfórico 3M) y 1 mL de ácido acético glacial concentrado. La solución resultante fue mezclada en un agitador vórtex por 20 s, y se llevó a ebullición en baño María por 1 h. La reacción fue detenida bruscamente en hielo, dejando reposar las muestras 15 min. Finalmente, se agregó 3 mL de tolueno para extraer el complejo cromóforo-Prolina y se volvió a mezclar en agitador vórtex durante 60 s. La fase superior fue leída en Espectrofotómetro Genezi a una absorbancia de 520 nm usando como blanco el Tolueno. El contenido de prolina fue calculado a partir de una curva de calibración con L-Prolina. Estos resultados sirvieron para establecer el punto de análisis de expresión génica por ARN-seq.

### **3.4. 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  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$ , donde  $Y_{ij}$  es la respuesta,  $\mu$  es la media del experimento,  $\tau_i$  es el efecto de tratamientos y  $\epsilon_{ij}$  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.

### **3.5. ARN-SEQ DE NOVO DE LOS BROTES VEGETATIVOS**

#### **3.5.1. 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 condiciones controladas a 25 °C de temperatura con un fotoperiodo de 16:8

horas luz:oscuridad. Al alcanzar los cinco entrenudos, las plantas recibieron uno de los dos tratamientos siguientes:

Tratamiento 01: Plantas con riego a capacidad de campo

Tratamiento 02: Plantas sin riego por 10 días.

Transcurridos los 10 días, se cosechó la parte apical de las plantas para la extracción del ARN total. Para minimizar la variación entre muestras, se hizo un pool de tejidos apicales de la parte aérea de 10 plantas diferentes. De manera que se utilizaron 3 repeticiones de cada una de las unidades experimentales, las cuales estuvieron compuestas por 2 macetas con cinco plantas cada una.

### **3.5.2. 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 ARN-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 ARN-seq.

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

Los reads pareados 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 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 Ramos *et al.* (2020), para obtener un ensamblaje más completo.

El ensamblaje de novo del transcriptoma se realizó utilizando el software Trinity (Grabherr *et al.* 2011), de acuerdo con el protocolo de análisis de ARN-seq (Haas *et al.* 2013). La cantidad de cada transcripto fue estimada por RSEM (Haas *et al.* 2013).

Utilizando TransDecoder (Haas *et al.* 2013), se identificaron los ORFs con más de 200pb, para predecir los genes a partir de los ensamblados.

#### **3.5.4. Anotación y enriquecimiento**

Las funciones putativas para las secuencias únicas fueron alineadas en BLASTX contra la base de datos de secuencias proteicas no redundantes (nrNCBI), utilizando un valor  $E \leq 1e-20$ , porcentaje de identidad  $\geq 50\%$  y porcentaje de cobertura del gen  $\geq 50\%$ . Los genes diferencialmente expresados (DEGs) fueron identificados utilizando el paquete EdgeR (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 DEGs, se realizó de acuerdo a Alafiatayo *et al.* (2020).

#### **3.5.5. Filtrado de genes según la base de datos de sequía DroughtDatabase**

Los genes diferencialmente expresados con valores de  $\log_2FC$  mayores de 2, menores que -2 y con  $FDR < 0.05$  fueron curados de forma manual para asegurar mayor precisión. Para ello, se usó como referencia la base de datos de sequía (DroughtDatabase; [http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/droughtdb/drought\\_db.html](http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/droughtdb/drought_db.html); Alter *et al.* 2015) y las bases de datos: Recursos de Información de *Arabidopsis* (TAIR; [www.Arabidopsis.org](http://www.Arabidopsis.org)) y el Sistema de Información de Leguminosas (LIS; [www.legumeinfo.org](http://www.legumeinfo.org)). La clasificación de las rutas se realizó de acuerdo a Alter *et al.* (2015) en dos grandes grupos: genes que codifican para proteínas funcionales y genes que tienen función regulatoria. El flujograma del análisis de ARNseq de novo es mostrado en la Figura 7.

#### **3.5.6. Análisis de datos**

Los valores de FPKM 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.

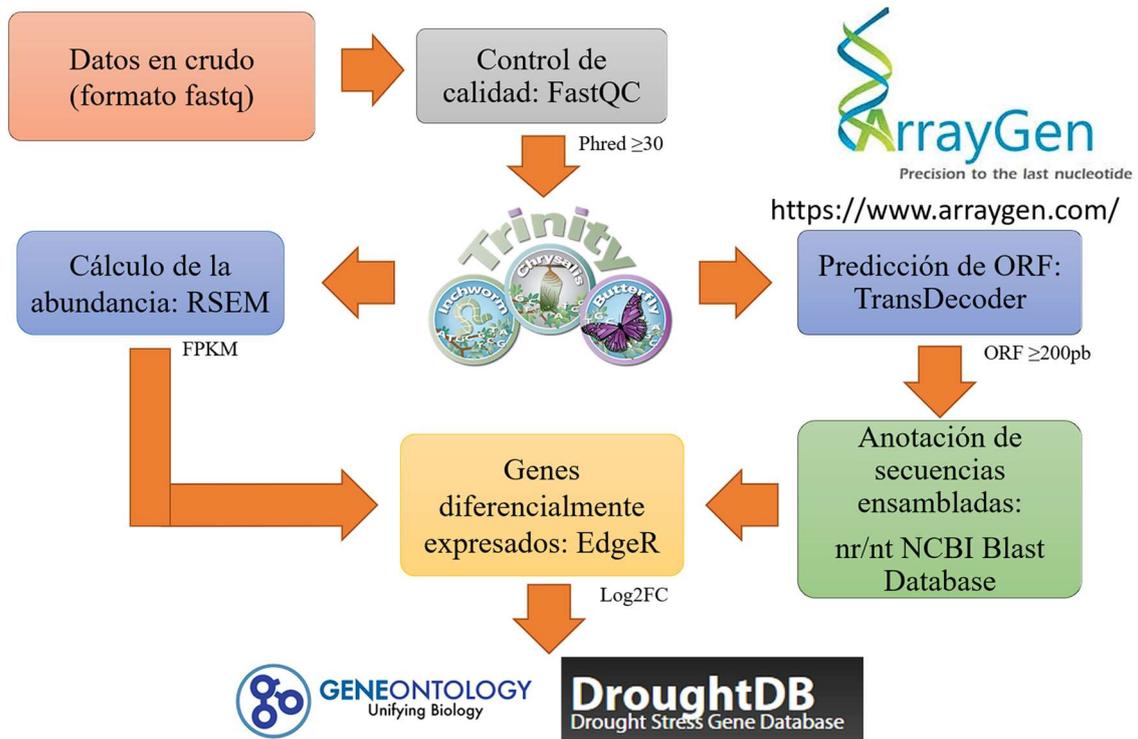


Figura 7: Flujograma del análisis de ARNseq de novo.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La selección y cruzamiento de genotipos que presenten características de resistencia a sequía es una de las estrategias más importantes para minimizar los daños causados por este factor e incrementar la productividad en los cultivos (Condon *et al.* 2004). Estos genotipos podrían presentar alelos que proporcionan tolerancia a estrés hídrico. Por esta razón, en el cultivo de *Lupinus*, se ha buscado genotipos que expresen diversas estrategias de resistencia a sequía (Palta *et al.* 2016). Particularmente, la estrategia óptima para las condiciones de secano en que se cultiva *Lupinus* sería el escape, es decir que las plantas de *Lupinus* completen su ciclo de vida antes de que ocurran déficits de agua severos (Slabu *et al.* 2010). El uso del escape a la sequía implica seleccionar los genotipos de *Lupinus* más precoces a floración que mantengan características agronómicas deseables. En las leguminosas de grano, una de estas características a tener en cuenta es el peso de 100 semillas, el cual está correlacionado con el rendimiento en *L. mutabilis* ( $r=0.924$ ) (Zou, 2009). Es así que al evaluar los dos grupos de accesiones (precoces y tardías) de *L. mutabilis* (tarwi) provistas por el Banco de Germoplasma de Tarwi del INIA-Huancayo (Anexo 1), se observó que las accesiones caracterizadas como precoces presentaron diferencias significativas, con mayor peso de semilla 25.60 g/100 semillas, en contraste con las accesiones consideradas tardías 22.77 g/100 semillas (Figura 8A).

Dado que la precocidad es una estrategia de escape frente al estrés hídrico (Meyre *et al.* 2001), se sometieron a las accesiones precoces a sequía progresiva por espacio de 10 días y se regaron nuevamente las plantas, se observó una gran diferencia en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas (Figura 8B). Tal como se describió en la sección Materiales y Métodos, el contenido hídrico del sustrato a CC fue de 20.89%, en tanto que, al cabo de 10 días de sequía progresiva, este valor alcanzó 1.51%, lo cual fue considerado como una sequía severa (Marchin *et al.* 2019). Un elevado porcentaje de sobrevivencia a sequía es una característica deseable en la búsqueda de cultivos resistentes a estrés hídrico (Farooq *et al.* 2009). Por esta razón, se consideraron en la prueba de comparación de medias las accesiones que presentaron por lo menos 50% de sobrevivencia a sequía (Figura 8C). Las accesiones P03, P23 y P24 presentaron mayor sobrevivencia a sequía

(83.33% de las plantas en promedio), seguidas por P09 y P18 (75% de sobrevivencia a sequía) con las cuales no se hallaron diferencias significativas. La accesión P11 mostró una sobrevivencia a sequía de 50%, lo cual fue menor estadísticamente que los valores de las accesiones mencionadas previamente. En tanto, la variedad comercial Andenes mostró una respuesta a sequía muy limitada, alcanzando una supervivencia de 8.33% de plantas en promedio. Las accesiones P04, P13, P17, P20, P21 y P25 no sobrevivieron a la sequía progresiva impuesta. La tolerancia mostrada por las accesiones que sobrevivieron a sequía puede haberse debido a diferentes mecanismos fisiológicos y moleculares que permitirían a estas accesiones producir en condiciones de déficit hídrico, y de esta manera responder para reducir las posibles pérdidas ante sequías eventuales (Farooq *et al.* 2009). Es así que, al haber mostrado mayor sobrevivencia, se tomaron las accesiones P03, P09, P18, P23 y P24 para continuar con la selección por el peso seco de la parte aérea bajo estrés hídrico por sequía.

En la siguiente etapa, las accesiones con mayor sobrevivencia a sequía (P03, P09, P18, P23 y P24) fueron evaluadas y seleccionadas según el peso seco de la parte aérea. En la Figura 8D, se observa que la accesión P18 presentó mayor peso seco medio (2.29 g), mostrando valores estadísticamente similares a Andenes (2.05 g), P03 (2.00 g), P09 (1.94 g) y P24 (1.82 g); sin embargo, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de P18, P03 y P09 al ser comparadas con la accesión P23 que mostró los valores de peso seco más bajos (1.35 g). El valor menor en la biomasa de P23 en respuesta a estrés hídrico puede deberse a la minimización del uso de agua como medida de adaptación, lo cual está generalmente relacionado con la reducción en el rendimiento potencial de un cultivo (Blum, 2005). Además, muchos cultivos susceptibles a sequía, tienden a mostrar una disminución de su biomasa y crecimiento, siendo la acumulación de materia seca uno de los parámetros afectados de forma más notoria durante el estrés abiótico (Amudha y Balasubramani 2011; Cerekovic *et al.* 2013). Por otra parte, la mayor adquisición de materia seca, es una característica de resistencia a sequía que también ha sido relacionada con movilización de carbono a los productos de cosecha y con mayores rendimientos en condiciones de estrés (Condon *et al.* 2004). De esta manera, estas diferencias indicarían la capacidad de las accesiones P03, P09, P18 y P24 para producir mayor biomasa en condiciones de déficit hídrico, lo cual puede contribuir a asegurar los rendimientos con una cantidad de agua limitada (Amudha y Balasubramani 2011), sobre todo si se tiene en cuenta que, en leguminosas como frijol común, se ha establecido que una mayor biomasa

en condiciones de déficit hídrico, contribuye a un mayor rendimiento de granos (Polania *et al.* 2016). Además, el estudio de Slabu *et al.* (2010), determina que los cultivares de *L. albus* que presentan mayor tolerancia a sequía son aquellos que tienen una reducción menor de su biomasa al ser expuestos a una sequía sostenida del 40 por ciento de la capacidad de campo durante 4 semanas. Cabe mencionar que en el estudio de Rodrigues *et al.* (1995) en *Lupinus albus*, se encontró que las plantas sometidas a sequía mostraban signos de marchitez, respondiendo a las condiciones impuestas con una pérdida considerable de área foliar en las accesiones más tolerantes a sequía, en tanto que el peso seco del tallo se incrementó en más del 50% en todas las plantas estresadas; por lo que dicho estudio concluye que el particionamiento de biomasa hacia las raíces y el tallo, representa una respuesta adaptativa importante a condiciones de sequía en *L. albus*. En contraste, en el presente estudio, no se observó una pérdida considerable de área foliar en la mayoría de accesiones sometidas a estrés hídrico, de manera que la estrategia adaptativa de *L. mutabilis* parece ser más variable en este aspecto.

Las accesiones precoces con mayor porcentaje de sobrevivencia a sequía y biomasa (P03, P09, P18 y P24) fueron luego analizadas según la cantidad de alcaloides en semilla medida a través de la intensidad de la prueba de Dragendorff. Esta prueba permite distinguir las semillas con mayor contenido de alcaloides, lo cual es considerado como uno de los problemas más serios en *L. mutabilis*, ocasionando una baja demanda de esta leguminosa (Jacobsen y Mujica 2006). Los resultados muestran que la accesión P03, presentó la menor intensidad de coloración (49442 UR; Figura 1E), lo cual indica que presenta menor contenido de alcaloides. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los alcaloides son compuestos nitrogenados derivados del metabolismo de aminoácidos (Aniszewski, 2007) cuya cantidad parece estar relacionada con el contenido de proteínas y otras características agronómicas de importancia en *Lupinus*. Un ejemplo claro es dado por Christiansen *et al.* (1997), cuyo trabajo demostró que el contenido de alcaloides en semillas de *L. angustifolius* está correlacionado de forma negativa al peso de la semilla, y que su nivel se incrementaba en condiciones de sequía. Jansen *et al.* (2012) estudia la relación que existe entre el contenido de alcaloides, proteínas y rendimiento en *Lupinus angustifolius*, siendo todas estas características influenciadas considerablemente por el nivel de pH del suelo. Además, los *Lupinus* con mayor contenido de alcaloides parecen tener una mejor capacidad adaptativa y producir mayor número de semillas (Cowling *et al.* 1998). Respecto a la naturaleza genética de esta característica, se han realizado

diversos trabajos que han resaltado la naturaleza monogénica de esta característica. Entre estos se encuentra el trabajo de Lin *et al.* (2009), que reporta que en *L. albus*, se ha logrado identificar e incorporar en diversas variedades mejoradas 3 genes responsables de conferir bajo contenido de alcaloides en semillas (*Pauper*, *Exiguus*, y *Nutricius*), los cuales presentan herencia mendeliana. De entre estos genes, *Pauper* confiere menor contenido de contenido total de alcaloides (20 mg de alcaloides totales Kg<sup>-1</sup>) (Harrison y Williams, 1983), pudiendo ser identificado a nivel molecular por el marcador específico de PCR ‘PauperM1’. En tanto que en *L. angustifolius* se ha reportado el gen *Iucundis* (*Iuc*), el cual controla la producción de alcaloides, y en su forma recesiva resulta en la producción de semillas dulces (Palta y Berger 2008). Por lo expuesto y teniendo en cuenta que hay un número de características que parecen estar ligadas, es de importancia encontrar genotipos que presenten un bajo contenido de alcaloides manteniendo características agronómicas de importancia. En ese sentido, la accesión P03 es una accesión promisoriosa que además de poseer las ventajas de elevada sobrevivencia a sequía y peso seco luego de sequía, podría presentar alelos especiales que confieren niveles bajos de alcaloides.

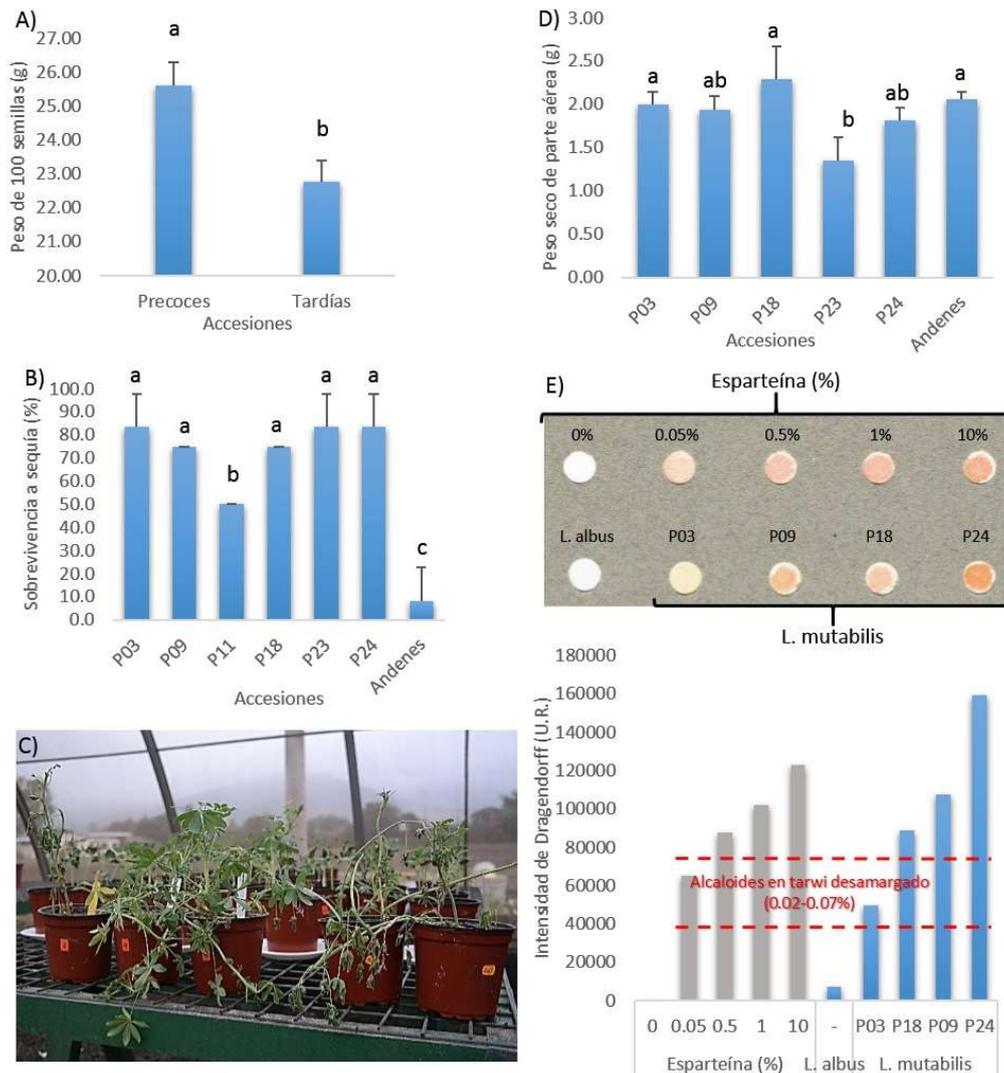


Figura 8. Selección de accesiones de *L. mutabilis* Sweet (tarwi) del Banco de Germoplasma del INIA-Huancayo. A) Peso de 100 semillas de accesiones precoces y tardías. B) Porcentaje de sobrevivencia mayor al 50% en accesiones precoces después de 12 días de sequía y 3 días de rehidratación. La comparación de medias se realizó con los datos transformados ( $\text{Log}(\%+1)$ ). C) Respuesta de accesiones precoces a sequía luego de 3 días de rehidratación. D) Peso seco de la parte aérea de las accesiones con sobrevivencia a sequía mayor a 50%. E) Contenido de alcaloides en semillas de las accesiones precoces con mayor porcentaje de sobrevivencia y peso seco de *L. mutabilis*, comparadas con *L. albus* (control negativo) y soluciones estándar de esparteína (0%, 0.05%, 1%, 10%). 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. SEQUÍA EN ETAPA VEGETATIVA

### 4.2.1. Progresión del desarrollo en sequía y rehidratación

El estrés hídrico afecta el crecimiento y desarrollo de especies como *L. albus*, ocasionando variación en parámetros como el crecimiento (número de hojas, área foliar), diversos parámetros fisiológicos (estado hídrico foliar, contenido relativo de agua, conductancia de los estomas y tasa neta de fotosíntesis) y componentes del rendimiento (producción de semillas) de *L. albus*, fueron afectados por la sequía (Ramalho y Chaves 1992; Rodríguez *et al.* 1995 y Pinheiro *et al.* 2004). Estos resultados concuerdan con el presente trabajo, en el cual las plantas de la accesión P03 de *L. mutabilis* fueron afectadas (Figura 9A), disminuyendo su crecimiento y mostrando marchitez a nivel foliar. La rehidratación de las plantas sometidas a sequía, promovió una reanudación de su crecimiento, existiendo reversión de marchitez, principalmente en las hojas más jóvenes. Lo cual podría deberse a que cuando se riega después de un periodo de estrés, existe un incremento de la mineralización y crecimiento (He y Dijkstra 2014). En el caso de los lupinos, está reportado que en *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, el déficit hídrico está relacionado con una senescencia foliar dramática, superior al 50 por ciento del total del follaje (Rodríguez *et al.* 1995). Estos resultados también tienen concordancia con lo reportado por Pinheiro *et al.* (2004), quienes evaluaron el crecimiento de *L. albus* al ser sometido a sequía y luego de la rehidratación, encontrando que las plantas sometidas a condiciones de sequía pierden rápidamente las hojas maduras, puesto que la planta almacena compuestos en el tallo. Este órgano actúa como un almacén de biomasa, acumulando metabolitos como glucosa, sacarosa, asparagina y prolina, que podrían ser fuente de esqueletos carbonados que permiten a la planta recuperarse una vez que se reanuda el riego.

### 4.2.2. Contenido de elementos en la parte aérea en condiciones normales y sequía

Los nutrientes minerales necesarios para el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas presentan concentraciones variables en el suelo. Por ello, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten mantener la absorción de nutrientes según sus necesidades, en vez de según la concentración de estos elementos en la rizósfera (Nath 2015). Sin embargo, el estrés hídrico es capaz de afectar la absorción de nutrientes. Durante déficit hídrico, existe un aumento en la concentración de solutos fuera de la raíz, comparado con el ambiente interno, lo que origina osmosis reversa y disminución del contenido hídrico

al interior de la raíz (Waraich *et al.* 2011a). Esto les impide absorber cantidades óptimas de nutrientes, lo cual altera el metabolismo y la concentración de elementos en la planta (Ciriaco *et al.* 2011). Por esta razón, las concentraciones de elementos en el tejido vegetal son un indicador importante de la limitación en la absorción impuesta por el factor de estrés sobre la planta (He y Dijkstra 2014). Actualmente 17 nutrientes se consideran esenciales para que las plantas completen su ciclo de vida (Waraich *et al.* 2011b). Elementos que han sido divididos en dos categorías. Los macronutrientes incluyen el Carbono (C), Hidrógeno (H), Oxígeno (O), N, P, K, Ca, Magnesio (Mg) y Azufre (S). Los micronutrientes son el Zinc (Zn), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Boro (B), Molibdeno (Mo), Cloro (Cl) y Niquel (Ni). En el presente trabajo, las concentraciones de los elementos P, K, Ca, Mg y Na en condiciones de sequía mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas del grupo control de la parte aérea de la accesión P03 de *L. mutabilis*. (Figura 9B). Esta variación podría deberse al aumento en la translocación de hojas senescentes hacia las hojas más jóvenes, como resultado de la activación de mecanismos de respuesta de la planta ante el estrés hídrico (Pinheiro *et al.* 2001), puesto que estos nutrientes no solo son necesarios para el crecimiento vegetal y desarrollo, sino también para aliviar diferentes tipos de estrés abiótico, como la sequía (Waraich *et al.* 2011a). Es así que el estado mineral de la planta cumple un rol esencial que les permite desarrollar un amplio rango de mecanismos de resistencia y adaptativos para mantener la seguridad y productividad en condiciones de estrés (Marschner 2012).

#### 4.2.2.1. Nitrógeno

El N es un elemento esencial para las plantas, pues forma parte de aminoácidos, enzimas, ácidos nucleicos, clorofila y alcaloides, siendo el elemento del suelo más absorbido por las plantas en condiciones normales de cultivo. Por esta razón, también es el componente que con más asiduidad se encuentra de manera deficiente en la mayoría de los cultivos en todas las partes del mundo (Balta *et al.* 2015). Tiene influencia en la floración y fructificación y, por ende, en el rendimiento del cultivo. El nitrógeno puede ser absorbido por las plantas en la forma de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), según la especie vegetal (Coraspe *et al.* 2009), siendo absorbido principalmente como  $\text{NH}_4^+$  por plantas del género *Lupinus* (Procrop 2012). Dentro de la planta, el N tiene una acción directa sobre el incremento de la masa seca al favorecer el desarrollo del tallo, el crecimiento del follaje y contribuir en la formación de frutos y granos (Balta *et al.* 2015). Su concentración en los tejidos está altamente correlacionada con la absorción por parte de la planta, por lo

cual, en condiciones de estrés, se observa variación en los niveles de nitrógeno (Marschner 2012). Las plantas de la accesión P03 sometidas a sequía mostraron valores de N (2.98%) ligeramente mayores, pero estadísticamente similares a los de las plantas bien hidratadas del grupo control (2.76%). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Chapin y Baarten (1986), quienes señalan que la concentración de N en dos especies de *Lupinus* es elevada (2.8-3.9%). En *Lupinus*, el ligero aumento en el contenido de N está reportado por Pinheiro *et al.* (2001), quienes encontraron que este elemento se incrementaba como parte un mecanismo de adaptación a sequía. Dado que está reportado que las variaciones en el metabolismo de N en *Lupinus* afectan a componentes del crecimiento, como la tasa de expansión foliar, número de hojas y tamaño (Procrop 2011), estos resultados podrían indicar que la accesión P03 tiene un mecanismo que le permite mantener la eficiencia en el metabolismo de N bajo sequía, estrategia de respuesta a estrés hídrico que complementaría a la estrategia de escape dada por la precocidad de esta accesión y le conferiría una ventaja ecológica en ambientes sometidos a condiciones de estrés (Marschner 2012).

Por otra parte, los niveles de N en la parte aérea de *L. mutabilis* en el estudio podrían haberse mantenido gracias a su movilización entre diversos tejidos para evitar su pérdida. La sequía promueve el transporte de este elemento hacia el tallo en forma de aminoácidos como asparagina y a su inclusión en la prolina, que aparece en todos los tejidos vegetales, especialmente en hojas jóvenes y tallo. Al reanudarse el riego, estos compuestos pueden funcionar como reserva y fuente de carbono (Pinheiro *et al.* 2004). Además, este elemento está relacionado con la eficiencia fotosintética, de manera que su déficit, activa una ruta de glucólisis alternativa que produce malato. Este compuesto se incrementa en plantas que presentan ajuste osmótico como estrategia de resistencia a sequía (Patonnier *et al.* 1999; Foyer *et al.* 2003); sin embargo, en *L. albus* sometido a condiciones de sequía, se ha encontrado que la concentración de malato disminuye, especialmente en folíolos y raíces, lo cual indica que el ajuste osmótico no es un mecanismo relevante de tolerancia a estrés hídrico en esta especie (Pinheiro *et al.* 2004). Por lo que se puede inferir que el N no está relacionado a la activación de rutas bioquímicas relacionadas con el ajuste osmótico en esta especie. Dado que la absorción de amonio se realiza a través de los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (AMT), los niveles encontrados en el presente estudio pueden deberse a la sobreexpresión de esta proteína impuesta por las condiciones de sequía, tal como fue demostrado en *Triticum aestivum* L. por Duan *et al.* (2016) quienes encontraron

que la concentración del transportador TaAMT1.2 era inducida por sequía. Se debe mencionar también, que el N es un elemento que tiene capacidad de movilización relativamente elevada una vez que se encuentra en forma de  $\text{NO}_3$  o  $\text{NH}_4^+$  (Ahmad *et al.* 2011), por lo cual una vez en el sustrato, pudo haber seguido siendo absorbido por las raíces.

#### 4.2.2.2. Fósforo

El Fósforo (P) es uno de los elementos menos móviles en los suelos, encontrándose en menor cantidad comparado con el N y K, y siendo el segundo nutriente más deficiente en las plantas, luego del N (Ahmad *et al.* 2011). Se debe tener en cuenta que, en el sustrato utilizado, carente de P, y al utilizar la solución nutritiva, el P se encontraba en forma de fosfato ( $\text{Pi}$ ) para las plantas de tarwi. Bajo esta forma, el P es extraído del suelo en concentraciones micromolares y transportado entre membranas y compartimentos intracelulares por cotransportadores especiales de protones y fosfato (Schachtman *et al.* 1998; Shenoy y Kalagudi 2005). Dentro de la planta, el P se mantiene en concentraciones constantes de 5-10 mM a nivel citosólico (Mimura 1995), siendo el elemento principal involucrado en los procesos energéticos vegetales (Palta 2000). A nivel molecular, este elemento es esencial por ser un constituyente de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas, por lo cual, es necesario para procesos que incluyen el almacenamiento y transferencia de energía, fotosíntesis, la regulación de algunas enzimas y el transporte de carbohidratos (Hu y Schmidhalter 2001). Este elemento es de vital importancia por el rol que cumple el ATP en la recuperación de las plantas sometidas a sequia (Palta 2000).

En condiciones de estrés hídrico, tales como las impuestas a las plantas de tarwi, existe reducción en la humedad del suelo, que puede reducir la absorción de nutrientes al inhibir la mineralización y la difusión de nutrientes y el flujo de masa en el suelo (He y Dijkstra 2014). Debido a la sequía, el suministro de P se limita, por lo cual el proceso de movilización de  $\text{Pi}$  se realiza a través del tonoplasto (Schachtman *et al.* 1998). En estas condiciones, se induce la expresión de los cotransportadores protón/fosfato ( $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4$ ) denominados PTH1 y PTH2 en la raíz que conlleva a un aumento en la capacidad de este órgano para tomar el P (Shenoy y Kalagudi 2005). La inducción de estas proteínas y su sobreexpresión es tratada en la sección Hidrolasas ácido-anhidrido (Figura 20). También se debe tener en cuenta que, en el presente trabajo, el P fue agregado a las plantas de tarwi del grupo control junto con la solución nutritiva, en tanto que las plantas sometidas a

sequía dejaron de percibir este elemento. Lo cual podría explicar por qué la absorción de este elemento no pudo incrementarse por, lo cual probablemente explica la reducción en los niveles de P en la parte aérea de las plantas sometidas a estrés hídrico (0,37%), en comparación con las plantas control (0,65%). Estos valores, son elevados, al ser comparados con el porcentaje de P = 0.2% en *L. lepidus* y *L. latifolius* (Chapin y Baarten 1986).

La disminución de P en esta etapa del desarrollo también podría deberse a su absorción disminuida por parte de la planta. Se debe tener en cuenta que los bajos niveles de P afectan más al desarrollo reproductivo, retardando el tiempo de floración y reduciendo el número de flores en la inflorescencia; en comparación a los daños en la etapa de desarrollo vegetativo de *Lupinus* durante la cual la deficiencia de este elemento disminuye la aparición de hojas, lo cual retarda el crecimiento (Procrop 2011). En la etapa vegetativa, la determinación de los niveles de P da información sobre el estado energético y crecimiento de la planta al estar relacionada con la concentración de ATP, ácidos nucleicos y membranas plasmáticas, por lo cual la reducción de este elemento en condiciones de estrés hídrico es un resultado esperado.

A nivel molecular, la disminución del P, sería capaz de activar rutas metabólicas alternas en genotipos tolerantes. Según el uso de P, los cultivares pueden ser clasificados como eficientes (mayor rendimiento que otros cultivares con suministros de P disminuido) y/o receptivos (con mayor rendimiento que otros cultivares cuando hay mayor disponibilidad de P (Gerloff 1977). Dado que la accesión P03 de *L. mutabilis* fue capaz de reanudar su crecimiento tras la sequía y el consecuente déficit de P impuestos, esta accesión podría ser considerada como eficiente en uso de P. De esta manera, estas plantas pueden ser capaces de inducir la síntesis de enzimas que les permiten realizar la glucólisis siguiendo la ruta que no requiere P, conocida como ruta de no fosforilación. En esta ruta actúa la enzima citosólica Gliceraldehído 3 fosfato NADP oxidorreductasa dependiente de NADP que no fosforila (GAPDHN, EC 1.2.1.9), la cual no utiliza Pi (Valverde y Serrano 1999). Además, en diversas plantas se ha reportado un incremento de los transcritos de ARNm del cotransportador de Pi (VPT1 o PHT5.1) en tonoplasto, que conlleva a un aumento en la movilización del P desde la vacuola hasta el citosol (Schachtman *et al.* 1998; Shenoy y Kalagudi 2005). Actualmente, las estrategias de mejoramiento permiten seleccionar a los cultivares receptivos, pero no a los eficientes. Para mejorar la eficiencia de uso de P,

se deben conocer y mejorar los caracteres que la componen, como la adquisición de P (absorción y uso), traslocación (transporte, compartimentalización y remobilización), y utilización interna. Existen variaciones inter e intra específicas en estas características, y se sabe que están bajo control genético y fisiológico, pero modificados por interacciones planta ambiente (Shenoy y Kalagudi 2005).

Cabe mencionar, con respecto a N y P, que debido a que la sequía afecta más a la toma de P que a la absorción de N, las plantas sometidas a estrés hídrico presentan un incremento en la relación N:P (He y Dijkstra 2014). Este mismo patrón fue encontrado en el presente trabajo, en el cual las concentraciones de N en la parte foliar no mostraron diferencias significativas cuando las plantas fueron sometidas a sequía. En tanto que la concentración de P disminuyó significativamente en condiciones de sequía.

#### **4.2.2.3. Potasio**

El Potasio (K) es el nutriente vegetal más abundante presente en las plantas, representando entre el 2 y el 10 por ciento de su peso seco (Nath 2015). Este elemento puede acelerar el flujo y translocación de los productos sintetizados durante la fotosíntesis, tales como los carbohidratos para que puedan ser transportados desde las hojas hasta los órganos de reserva (frutos, semillas, tubérculos, etc.) (Ahmad *et al.* 2011). De esta manera, el K incrementa el rendimiento y calidad de la cosecha, mejorando el sabor, el contenido de azúcares y el color de los frutos (Balta *et al.* 2015). A nivel fisiológico, el K está involucrado en muchos procesos como la activación enzimática, síntesis de proteínas, fotosíntesis, osmorregulación, extensión celular, movimiento estomatal y otros procesos (Mengel y Kirkby 2001; Marschner 2012; Mengel 2007). Al tener una movilidad elevada en todos los niveles de las plantas (dentro de las células individuales, así como en el transporte a larga distancia vía floema y xilema), este elemento es el catión más abundante en el citoplasma, manteniendo la turgencia celular (Marschner 2012). En condiciones normales, a nivel intracelular el K aumenta de forma pasiva en el citoplasma y a nivel vacuolar. Sin embargo, cuando sus concentraciones son muy bajas, se libera activamente (Ciriaco *et al.* 2011). De esta manera, las sales de K cumplen un papel importante en la regulación del estado hídrico, contribuyendo al potencial osmótico de las células y tejidos en las especies glucofitas (Marschner 2012), además de regular la apertura de estomas (Mengel y Kirkby 2001) y promover mayor firmeza y resistencia de los tejidos vegetativos (Balta *et al.* 2015).

El contenido de K en las plantas de la accesión P03 sometidas a sequía mostró valores de K significativamente superiores (2,86%) a las plantas del grupo control (2,61%). Este hallazgo parece contradecir los estudios realizados sobre la importancia y el rol del K en la supervivencia de las plantas bajo condiciones de estrés hídrico (Marschner 2012; Mengel y Kirkby 2001). El déficit hídrico es el factor principal que disminuye la disponibilidad de K en el suelo, así como su absorción y translocación de las raíces al tallo (Ciriaco *et al.* 2011). Se señala que el exceso de Na y Cl en estas condiciones, incrementan el desbalance iónico a nivel intracelular y reducen la absorción de otros nutrientes como K, Ca y Mn, los cuales se empiezan a compartimentalizar de manera diferencial en distintos órganos de las plantas (García *et al.* 2012). Además, en respuesta a esta disminución de K, las plantas tienden a reducir la apertura de estomas en condiciones de estrés intermedio, cerrando completamente estas estructuras cuando el estrés hídrico es severo (Larcher 2006). Todas estas evidencias indicarían que en las plantas sometidas a estrés hídrico, se esperaría encontrar una disminución en la cantidad de K, especialmente en las más susceptibles.

Se debe tener en cuenta que el K es un elemento que en concentraciones más elevadas permite a plantas como maíz, papa y cebada tolerar el estrés hídrico (Premachandra *et al.* 2008; Khosravifar *et al.* 2008; Favez y Bazaid, 2014). Además, en soja, se ha encontrado su acumulación en genotipos considerados tolerantes a estrés hídrico (Shawquat *et al.* 2014). Lo que señala que las plantas que mantienen niveles adecuados de K y lo usan de manera más eficiente son capaces de tolerar mejor la sequía, en contraste con las plantas deficientes en este elemento (Procrop 2011). Por lo cual, se podría explicar por qué los genotipos más tolerantes a sequía, como la accesión P03 presentan mayor contenido de K en sus tejidos en condiciones de estrés hídrico (Procrop 2011).

La habilidad de las plantas para diferenciar el Na y el K puede ser determinada por la relación K/Na. La absorción selectiva de K en lugar de Na es considerada como uno de los mecanismos fisiológicos que contribuyen a la tolerancia a estrés hídrico (Shawquat *et al.* 2014). Es así que, en condiciones de estrés hídrico, esta relación se incrementa cuando las plantas son tolerantes, mientras que disminuye en las plantas susceptibles (Flowers 2004; Shawquat *et al.* 2014).

#### 4.2.2.4. Calcio

El Calcio (Ca) es un elemento importante, necesario para el mantenimiento de la estructura celular, la construcción de la pared celular, división celular, homeostasis, e integridad de la membrana celular (Hussain *et al.* 2007; Waraich 2011). Es particularmente importante en la fisiología celular, donde su movimiento dentro y fuera del citoplasma es una señal para muchos procesos, así como la síntesis de pared celular en el huso mitótico durante la división celular, y otros procesos (Shao *et al.* 2008). A nivel intracelular, el Ca se une a una proteína llamada calmodulina (abreviación para CALcium MODULated protein) en 4 sitios, formando un complejo Ca-calmodulina. Este complejo activa numerosas proteínas diana involucradas en una variedad de procesos celulares (Taiz y Zeiger 2006). A través de esta proteína, el Ca es un controlador importante del metabolismo y desarrollo vegetal. A nivel molecular, el Ca es capaz de actuar como segundo mensajero en muchas vías de transducción de señal en las plantas. Al igual que otros elementos, su concentración en la planta depende de su biodisponibilidad, dado que el Ca es un macroelemento altamente disponible para la toma por las plantas en la solución del suelo. Cuando se encuentra en concentraciones elevadas, puede ser absorbido con pocas restricciones, de manera que su concentración en niveles elevados en la planta se debe a la alta concentración de este elemento en el suelo, en vez de a una toma más eficiente, velocidad de transpiración o incluso la adición de enmiendas en el suelo (Jodral-Segado *et al.* 2006). Debido a la reducción de su disponibilidad en el suelo en condiciones de estrés hídrico, sus concentraciones en la planta pueden variar durante el estrés (Hussain *et al.* 2007). De hecho, la liberación de protones de las raíces promueve la reacción de intercambio del Ca unido en las fases orgánicas y minerales del suelo, resultando en la desorción de Ca (Van Praag *et al.* 2000).

Tal como se puede apreciar en la Figura 9B, se observó un incremento estadísticamente significativo de Ca en la parte aérea en las plantas que fueron sometidas a sequía (1.02%), con respecto a las plantas del grupo control (0.73%). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en *Cynodon dactylon*, en que se encontraron cantidades incrementadas de Calcio en tejido foliar cuando las plantas fueron cultivadas en condiciones de sequía en campo. En plántulas de *Dalbergia sissoo* se ha reportado un incremento de más del 300% en hojas y raíces, luego de siete meses de condiciones de estrés severo (Singh y Singh 2004). Otros estudios han explicado el rol del Ca en la mediación de la respuesta a estrés

durante el daño, recuperación y aclimatación a estrés (Palta 2000). Por ejemplo, se reporta que el Ca puede mejorar la tolerancia a sequía en *Catharanthus roseus* al incrementar la actividad de glutamil quinasa y reducir la actividad de prolina oxidasa (Abdul Jaleel *et al.* 2007). También se ha sugerido que el Ca es necesario para la recuperación de la sequía al activar la enzima de membrana plasmática ATPasa, la cual bombea de vuelta los nutrientes que se perdieron en el daño celular (Palta 2000). La calmodulina también se menciona como un modulador de importancia de los niveles de Ca cuando las plantas son sometidas a estrés, activando vías metabólicas y mejorando el crecimiento vegetal (Waraich 2011). Los factores de estrés son capaces de activar la vía de señalización de Ca, induciendo la expresión de genes de respuesta a estrés, que dan lugar a las respuestas fenotípicas mencionadas para favorecer la tolerancia a estrés y la regulación de la progresión del ciclo celular (Tuteja y Mahajan 2007).

Asimismo, se ha encontrado que los niveles elevados de Ca en el exterior regulan y mantienen la concentración de K en las plantas (Hussain *et al.* 2007). Sin embargo, cabe mencionar, que hay estudios contradictorios que muestran disminución de Ca en condiciones de déficit hídrico en algunas especies (Ciriaco *et al.* 2011). Además, el número de genes que responden a la señalización de Ca es limitado (Tuteja y Mahajan 2007).

#### **4.2.2.5. Magnesio**

El Magnesio (Mg) es el catión divalente más abundante en el citoplasma vegetal. Sus funciones están relacionadas con su capacidad de interactuar con ligandos nucleofílicos (Shaul 2002). Cumple su rol como átomo central de la clorofila y como puente para la agregación de ribosomas, además participa en procesos de conversión de energía, síntesis de proteínas y como cofactor en muchos procesos enzimáticos asociados a la fosforilación, defosforilación, hidrólisis de varios componentes y es un estabilizador estructural de los nucleótidos (Ciriaco *et al.* 2011). Entre las enzimas activadas, están ATPasas, Ribulosa 1,5 Bifosfato Carboxilasas, ARN polimerasa, Glutamato Sintetasa y Quinasas de proteínas, UDP, ATP, GTP Glucosa pirofosforilasa (Ahmad *et al.* 2011; Guo *et al.* 2015). El Mg cumple un rol importante en la exportación de fotosintatos desde la fuente hasta los órganos de almacenamiento. Además, se ha postulado su participación en las vías de transducción de señal de Ca y en las vías de señalización de estrés

dependientes de ABA, que serían activadas por la disminución, o incremento de este elemento en las plantas (Nath 2015; Guo *et al.* 2015).

La absorción de Mg es afectada por las condiciones del suelo y la rizósfera, como la sequía (Ciriaco *et al.* 2011). Los niveles de Mg se ven afectados por la presencia de cationes que compiten y evitan su absorción, como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$  en suelos ácidos y  $\text{Na}^+$  en suelos bajo estrés hídrico (Mengel y Kirkby, 2001; Shaul, 2002), disminuyen su disponibilidad física y fisiológica y evitan el crecimiento vegetal normal (Ahmad *et al.* 2011). La disminución de Mg ocasionada por sequía, contrasta con los resultados presentados en la Figura 9B, en la cual se observó incremento en la parte aérea de las plantas de tarwi sometidas a sequía (0.80%), con respecto a las plantas del grupo control (0.59%). Teniendo en cuenta que Senbayram *et al.* (2015) reportan que las plantas que sufren de deficiencia de Mg son más sensibles al estrés hídrico, y una cantidad adecuada de Mg se necesita para la formación de un rendimiento óptimo en situaciones de sequía. Podría inferirse que los genotipos con tolerancia a sequía, como la accesión P03 podrían haber desarrollado una estrategia de acumulación de Mg en condiciones de sequía, que les permitirían evitar los problemas generados por la deficiencia de este elemento.

Con respecto a su interacción con otros elementos, se ha encontrado que las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  pueden disminuir las concentraciones de Mg al inhibir su transporte por canales homólogos a RCA encontrados en trigo, los cuales son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , y  $\text{Na}^+$  (Pineros y Tester 1997; White *et al.* 2000). Por otra parte, esto nos permitiría asumir que el flujo de Mg a la parte aérea no se ha inhibido en *L. mutabilis* bajo condiciones de sequía. Además, el nivel de Mg está asociado con el N por su rol en la síntesis de proteínas. Las hojas con deficiencia de Mg muestran disminución de la proporción de nitrógeno proteico (Shaul 2002). De hecho, la sequía durante los periodos de crecimiento de *Picea abies* indujo una reducción en el contenido de N y Mg, más que en el P y K (Grabarová y Martinková 2001).

#### **4.2.2.6. Azufre**

El Azufre (S) es un elemento esencial para el crecimiento y funciones biológicas en las plantas. Es un elemento de baja movilidad, que puede ser absorbido del suelo como sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), el cual es la fuente principal de S (Ciriaco *et al.* 2011). Este elemento es

componente de algunos aminoácidos, que son esenciales para la síntesis de proteínas, para la síntesis de vitaminas y enzimas (Taiz y Zeiger 2006). En el tarwi, el S se usa para formar la clorofila y diversas proteínas. Ante la deficiencia de S, se inhibe la síntesis de proteínas y las plantas se vuelven pálidas, con síntomas similares a los de deficiencia de N en leguminosas (Procrop 2011). Estudios en *Quercus ilex* demuestran que en condiciones de sequía, se observa una reducción en la concentración de S a nivel foliar y en raíces (Sandars *et al.* 2008), lo cual contrasta con los resultados obtenidos en la accesión P03 de *L. mutabilis* en el presente estudio (Figura 9B), donde las concentraciones de S en la parte aérea de las plantas de *L. mutabilis* no mostraron diferencias significativas en condiciones de sequía (0.57%), con respecto al grupo control (0.45%). Esta pequeña variación, con tendencia al aumento, es similar a los resultados encontrados por Pinheiro *et al.* (2001), quienes reportaron que el S se acumula en todos los órganos vegetales en mayor cantidad cuando las plantas están sometidas a sequía.

#### **4.2.2.7. Sodio**

Tal como se muestra en la Figura 9B, el Sodio (Na) se incrementó significativamente en condiciones de estrés hídrico (0.69%), con respecto a las plantas del grupo control (0.24%). Al disminuir el contenido hídrico a nivel intracelular, se da un incremento relativo de los iones Na y Cl. Según Slabu *et al.* (2010), este incremento a nivel de cloroplastos está relacionado con menor contenido de clorofila en *Lupinus albus* sometido a condiciones de estrés hídrico. Por lo tanto, su aumento puede ser perjudicial para la planta. De hecho, Tester y Davenport (2003) indican que uno de los mecanismos de tolerancia a sequía es la exclusión de los iones Na del tallo, o al menos de las hojas y manteniendo niveles elevados de K. Tal como se encontró en una variedad tolerante a sequía en soja, en que el estrés con NaCl ocasionó una menor acumulación de Na y mayor cantidad de K en tejidos foliares (Md. *et al.* 2014).

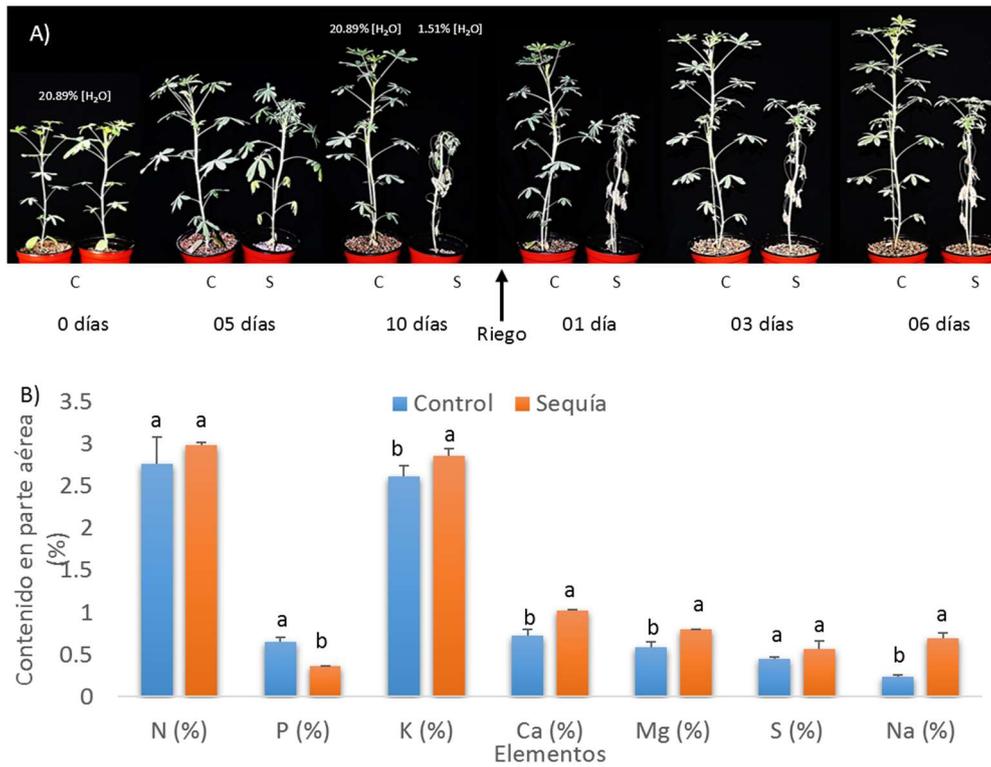


Figura 9. Evaluación de la accesión P03 de *L. mutabilis* Sweet en condiciones normales y de sequía durante el periodo de crecimiento vegetativo. A) Progresión del desarrollo a los 0, 5 y 10 días de sequía, y 1, 3 y 6 días después de rehidratación (C: Control, S: Sequía). B) Contenido de elementos en la parte aérea en condiciones normales y sequía. 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. SEQUÍA EN ETAPA REPRODUCTIVA

#### 4.3.1. Caracterización del desarrollo de brotes florales sometidos a sequía

La floración y el crecimiento de vainas son las etapas más sensibles a estrés hídrico en *Lupinus*, puesto que el déficit hídrico puede llevar a un aborto severo de flores, y a una reducción en el número y crecimiento de vainas (Rodríguez *et al.* 1995; Slabu *et al.* 2010). Las plantas de la accesión P03 sometidas a estrés hídrico en esta etapa, mostraron marchitez a nivel foliar (Figura 10A) y una tendencia al escape de las flores inferiores una vez que las condiciones de déficit hídrico fueron superadas (Figura 10B). En la inflorescencia de tarwi se puede observar que la sequía afecta el crecimiento y número de flores producidas.

Además, cuando se vuelve a regar las plantas, las flores que están en la parte inferior de la inflorescencia empiezan a desarrollarse nuevamente, mientras que las flores de la parte superior mueren. Lo cual es congruente con la presencia de mecanismos de escape a nivel de órganos, que podrían conllevar a una reducción en el rendimiento. Esto concuerda con el trabajo realizado por Ramalho y Cháves (1992), quienes encontraron que el estrés hídrico redujo de manera significativa la producción de semillas en una línea precoz de *Lupinus albus*. Sin embargo, esto contrasta con el estudio de Rodríguez *et al.* (1995), quien menciona que después de un estrés hídrico de 15 días y tras la rehidratación, las plantas pueden recuperarse y desarrollar hojas, flores y vainas de manera similar a las plantas no estresadas. De manera que, en dicho estudio, el rendimiento de *Lupinus albus* no es afectado, a pesar de la disminución dramática del área foliar total.

#### **4.3.2. Determinación del contenido de prolina**

En esta etapa, uno de los mecanismos principales de ajuste osmótico en las plantas sometidas a estrés es la acumulación de sustancias orgánicas e iones inorgánicos a expensas del crecimiento (Akinci 2013). Los solutos orgánicos también llamados solutos compatibles son compuestos altamente solubles de bajo peso molecular que no son tóxicos a elevadas concentraciones dentro de las células (Ashraf 2007). Dentro de estos, se encuentran ciertos aminoácidos libres como la prolina. La prolina se acumula producto de la hidrólisis de proteínas y cumple un rol importante como osmoprotector en cultivos como trigo, arveja, papa y otros (Hong *et al.* 2006, Sánchez *et al.* 1998, Knipp y Honermeier 2006). Además, la prolina estabiliza membranas, proteínas, contribuye a la remoción de radicales libres (Ashraf 2007) y su concentración elevada se encuentra asociada positivamente con la resistencia y recuperación, al funcionar como una fuente de carbono (Ünyayar *et al.* 2004).

En el grupo control el nivel basal de prolina en brotes de la accesión P03 de *L. mutabilis* fue mayor (0,04961 ug prolina/mg tejido fresco) al de las hojas 0,0067 ug prolina/mg tejido fresco (Figura 10C). Estos niveles de prolina tuvieron un incremento significativo cuando las plantas fueron sometidas a sequía; sin embargo, a nivel foliar el incremento fue hasta 20 veces mayor (0,1379 ug prolina/mg tejido fresco) en condiciones de estrés, con respecto al grupo control. En contraste, los brotes mostraron un valor de 0,0967 ug prolina/mg tejido fresco, lo cual representó un incremento de 1.95 veces con respecto a

los valores del grupo control. Esto demuestra que la prolina se acumula de manera diferencial en brotes vegetativos y reproductivos (Mattioli *et al.* 2009; Figura 10C).

Es necesario mencionar que los estudios demuestran que la prolina es uno de los metabolitos más importantes involucrados en la resistencia al estrés hídrico en los organismos vegetales. Estudios realizados en *L. albus* demuestran que, en condiciones normales, el nivel de prolina es detectable en tejido foliar en cantidades muy bajas. Sin embargo, la síntesis de este aminoácido se incrementa cuando la planta presenta déficit hídrico, siendo detectada en todos los tejidos, especialmente a nivel del tallo e incluso, aunque en menor concentración, a nivel radicular. Además, cuando se reanuda el riego, los niveles de prolina disminuyen rápidamente (Pinheiro *et al.* 2014), lo que hace de este aminoácido uno de los principales cuando se evalúa el estrés hídrico.

La prolina es un aminoácido con un rol fisiológico en la determinación de estructuras de membrana y proteicas, y la reducción de EROs bajo estrés salino. Además, no solamente tiene un rol como un osmotolerante, si no también es una fuente nutricional en condiciones de estrés (Ashraf y Foolad 2007). Su incremento ante condiciones de déficit hídrico, salinidad, baja temperatura, acumulación de metales pesados, entre otros (Chun *et al.* 2018), determina que la expresión de genes relacionados con la síntesis de este aminoácido constituye una respuesta adaptativa para evitar el daño en estas condiciones, manteniendo o incluso incrementando los rendimientos y mejorando la adaptación (Elewa *et al.* 2017), tal y cual será discutido más adelante en la sección Genes de Detoxificación. Por esta razón, la mayor acumulación de este compuesto a nivel de tejidos vegetativos en *L. mutabilis* (Figura 10), indica la necesidad de realizar el análisis de expresión genético por ARN-seq en brotes vegetativos.

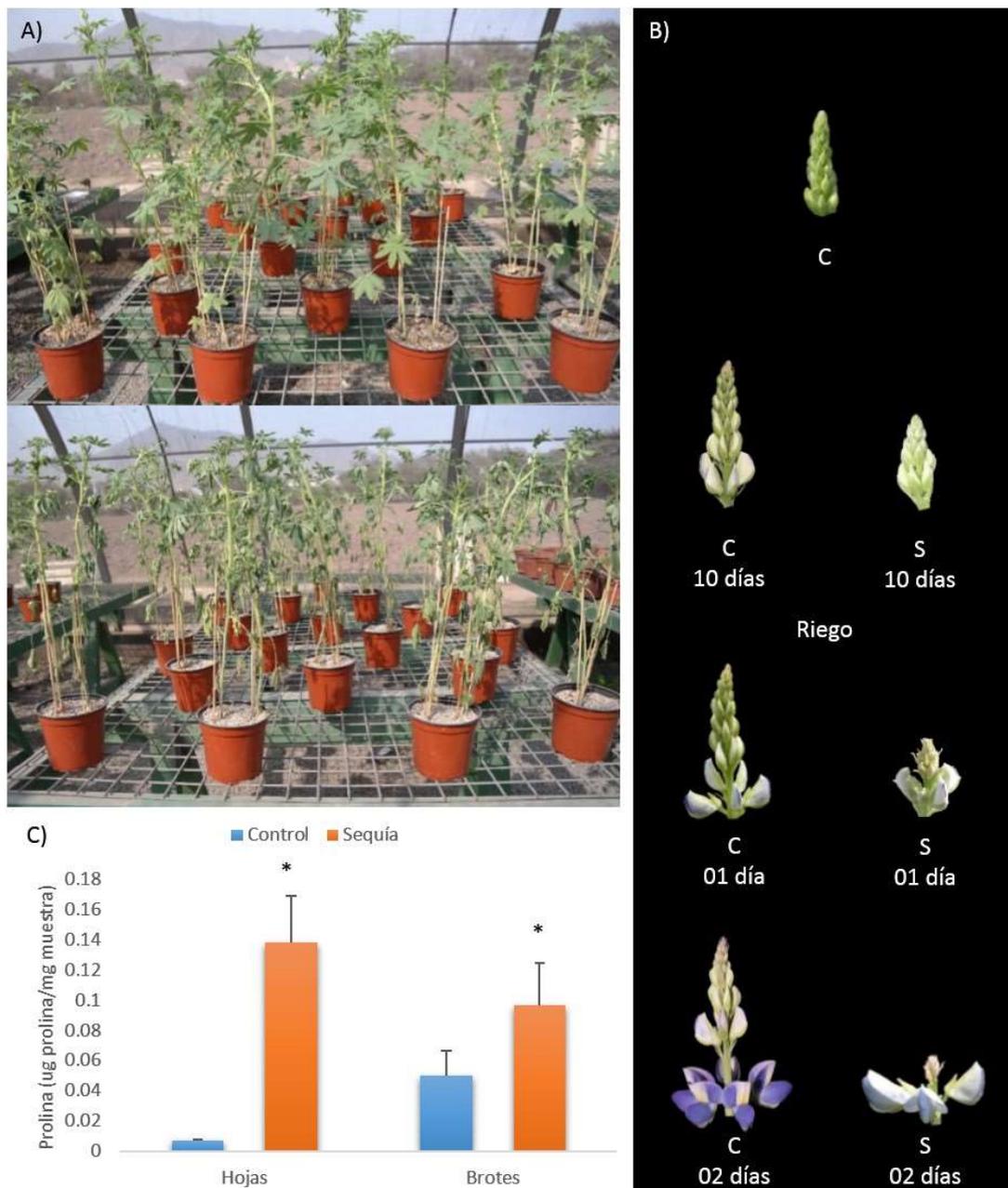


Figura 10. Evaluación de la accesión P03 de *L. mutabilis* Sweet en condiciones normales y de sequía durante el periodo reproductivo. A) Plantas en condiciones normales versus plantas sometidas a sequía durante 10 días. B) Desarrollo del brote floral en condiciones normales y en sequía progresiva durante 10 días, y 01 y 02 días después de rehidratación (C: Control, S: Sequía). C) Contenido de prolina en hojas y brotes, en condiciones normales y tras 10 días de sequía. El asterisco indica diferencias significativas según la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ). Las líneas sobre las barras expresan la desviación estándar.

#### **4.4. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO ARN-SEQ DE NOVO DE LOS BROTES VEGETATIVOS**

Los mecanismos de tolerancia a sequía son complejos y están regulados por múltiples genes, interacciones entre estos genes y factores ambientales (Tardieu y Tuberosa 2010). Por esta razón, para entender la función de los genes, se requiere la realización de análisis de expresión de alto rendimiento de plantas sometidas a estrés. Estos análisis permiten el aislamiento y caracterización de un gran número de genes de respuesta a estrés por sequía en diferentes especies durante los últimos años (Amudha y Balak 2011).

En este trabajo, se realizó el secuenciamiento de ARN de novo (ARN-seq de novo) en una accesión de *L. mutabilis* tolerante a sequía. El ARN-seq de novo permite identificar y cuantificar los transcriptos presentes en una condición determinada, sin tener conocimiento genético previo y usando un genoma de referencia (Yandell y Ence 2012). Ante la ausencia de un genoma de referencia, el secuenciamiento de ARN permite anotar los genes por similitud con otras especies (Nagalakshmi *et al.* 2010). Esta es una ventaja del ARNseq, ya que al realizar el secuenciamiento de ADNc generado de la población de ARN total de muestras en evaluación, permite prescindir de una secuencia genómica de ARN o incluso una base de datos EST para interpretar y analizar los datos obtenidos (Costa-Silva *et al.* 2017). De esta manera, se pueden comprender los mecanismos de regulación transcripcional, aún sin tener información previa, tal y como ocurre en *L. mutabilis*.

##### **4.4.1. Secuenciamiento, ensamblaje y filtrado de datos**

El secuenciamiento de ARN total mediante ARN-seq de Illumina, se realizó con el secuenciador HiSeq 2500, obteniéndose un total de 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 transcriptos, de los cuales se encontraron 83 145 genes totales (Cuadro 2).

Se hizo la determinación de la abundancia con RSEM y luego se realizó el filtrado de los transcriptos 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 transcriptos, originaron 37 044 genes totales. Los datos son mostrados en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Estadísticas de Ensamblaje y Filtrado del transcriptoma de *L. mutabilis*.

	<b>Resumen de ensamblaje</b>	<b>Resumen de filtrados</b>
<b>Genes totales según Trinity</b>	83145	37044
<b>Transcriptos totales según Trinity</b>	172370	85120
<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

Estos resultados contrastan con los resultados reportados por O'Rourke *et al.* (2013), quienes realizaron el análisis transcripcional de *L. albus* sometido a deficiencia nutricional de fosfato. En dicho estudio se encontraron 277 224 180 reads de Illumina con 125 821 secuencias únicas con un tamaño promedio de 1 155 pb.

#### 4.4.2. Análisis de expresión diferencial

Tras el cálculo de la abundancia con RSEM, y la detección de secuencias con ORF mayores a 200 pb, se procedió a determinar los genes con expresión diferencial utilizando EdgeR. Estos genes fueron filtrados según su nivel de expresión ( $\log FC < -2$  y  $\log FC > 2$ ) y su significancia  $p > 0.05$ , dando como resultado un total de 7 813 genes diferencialmente expresados. De estos, 4 588 genes estuvieron upregulados, en tanto que 3 225 genes fueron downregulados (Cuadro 3). Esto también contrasta con los resultados de O'Rourke *et al.* (2013), en *L. albus* sometido a deficiencia nutricional de fosfato, se

encontraron 2 128 transcritos diferencialmente expresados en *L. albus* (2 veces sobreexpresados;  $P < 0,05$ ; RPKM  $> 3$ ).

Cuadro 3: Genes diferencialmente expresados en plantas sometidas a sequía.

<b>Resumen de los transcritos del experimento de sequía</b>	
Número de genes significativos con valor ( $p < 0.05$ )	7 813
Genes upregulados	4 588
Genes downregulados	3 225

#### 4.4.3. Anotación funcional y enriquecimiento

Los datos transcriptómicos, están directamente relacionados al genoma, dado que son productos de la transcripción génica. Por esta razón, es importante integrar los datos transcriptómicos con la información genómica que se maneja en diferentes bases de datos, (Redestig *et al.* 2011). Este paso se conoce como anotación e incluye dos procesos distintos. La anotación estructural es el proceso de identificación de genes y sus estructuras intrónicas y exónicas. En tanto, la anotación funcional es el proceso de agregar meta datos, como los términos de ontología génica, a las anotaciones estructurales (Yandell y Ence 2012). 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 7). De esta manera, se logró la identificación de los términos de ontología génica downregulados y upregulados según proceso biológico, componente celular y función molecular, y las rutas metabólicas en las cuales están involucrados. Tal como se muestra en el Cuadro 4, se encontraron 4 747 genes upregulados con respecto a Proceso Biológico, en tanto que solamente 2 459 genes estuvieron downregulados. Los datos de Componente Celular revelan 130 genes upregulados y 329 genes downregulados. Por último, los datos relacionados con Función Molecular, muestran 1888 genes upregulados y 562 genes downregulados.

Cuadro 4: Detalle de los transcritos clasificados según su expresión y ontología génica.

	<b>Términos Upregulados</b>	<b>Términos Downregulados</b>
<b>Proceso Biológico</b>	4747	2459
<b>Componente Celular</b>	130	329
<b>Función Molecular</b>	1888	562

#### 4.4.3.1. Términos de Ontología Génica

Los términos de ontología génica que fueron upregulados y downregulados en tarwi sometido a estrés por sequía, son mostrados al detalle en la Figura 11.

Dentro de los términos upregulados de procesos biológicos, los cinco principales estuvieron relacionados con proceso metabólico (786), proceso metabólico primario (560), proceso metabólico celular (516), proceso metabólico macromolecular celular (407) y proceso biosintético (267). Mientras que los 5 términos downregulados principales fueron proceso metabólico (1092), proceso metabólico carbohidrato (152), proceso metabólico de molécula pequeña (127), proceso metabólico de lípidos (103), proceso metabólico componente nitrógeno celular (69).

Con respecto a Componente Celular, los 5 términos con más genes upregulados fueron: mitocondria (19), citosol (16), parte citosólica (10), ribosoma citosólico (10) y lumen organelos intracelulares (10). En tanto que los términos downregulados principales fueron: tilacoides (43), plastidios (37), membrana fotosintética (36), fotosistema (34) y cloroplasto (31).

Los términos de Función Molecular upregulados más relevantes fueron actividad catalítica (722), actividad transferasa (269), actividad quinasa (164), actividad fosfotransferasa (163) y actividad proteinquinasa (152). Entre los términos downregulados más importantes están: actividad hidrolasa, acción sobre enlaces glucosídicos (92), actividad hidrolasa, compuestos que hidrolizan O-glucosilos (85),

actividad metiltransferasa (67), actividad transferasa (67) y unión a proteínas del citoesqueleto (48).

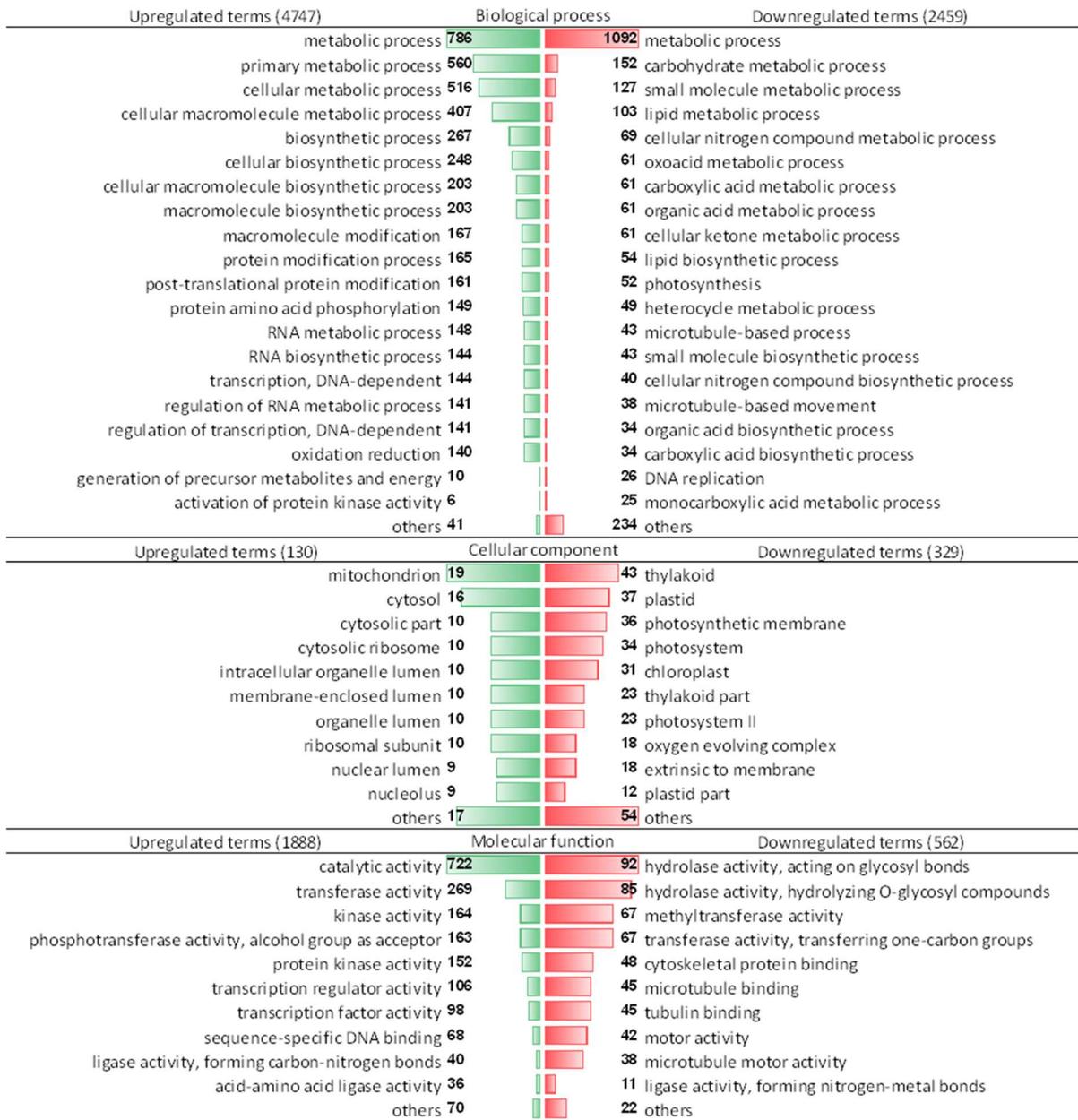


Figura 11: Datos del enriquecimiento de ontología génica de los genes diferencialmente expresados según su ontología génica.

#### 4.4.3.2. Genes relacionados con sequía según DroughtDatabase

La clasificación de los genes diferencialmente expresados en la base de datos de sequía (DroughtDatabase; [http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/droughtdb/drought\\_db.html](http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/droughtdb/drought_db.html)), permitió la identificación y clasificación de los genes que cumplen roles esenciales en tolerancia a sequía (Alter *et al.* 2015). La clasificación se realizó en dos grandes grupos: genes que codifican para proteínas funcionales (enzimas con función metabólica conocida), y genes que tienen función regulatoria (elementos regulatorios capaces de inducir o reprimir la expresión génica).

##### a. Genes asociados con proteínas funcionales

Del total, se obtuvieron 1796 genes diferencialmente expresados asociados a proteínas funcionales, los que fueron clasificados en canales y transportadores (452), detoxificación (431), fosfolípidos (317), proteasas (200), fotosíntesis (189), osmolitos (178) y factores de protección (29).

##### a.1. Canales y transportadores

Las proteínas que permiten el paso de moléculas a través de la membrana fueron comprendidas dentro de canales y transportadores (Figura 12). En este grupo se incluyeron los transcritos correspondientes a transportadores ABC (53), canales iónicos y sus reguladores (46), canales de agua (20) y otros transportadores (333). Las proteínas codificadas por estos transcritos son de vital importancia al permitir el flujo de numerosos compuestos beneficiosos y facilitar la compartimentalización de compuestos nocivos. Este transporte diferencial es otra de las características de las plantas que presentan tolerancia a estrés hídrico (Farooq *et al.* 2009).

Los transportadores del tipo ABC (ATP-Binding Casette), son bombas que transportan ciertos compuestos en contra de su gradiente de concentración, hidrolizando ATP como fuente de energía (Shabala 2011). Si bien, fue el grupo que mostró más transcritos con expresión diferencial, es paradójico que la proteína white-brown complex homolog protein 11 haya mostrado expresión bastante disminuida ( $\log_{FC}=-7$ , Figura 12). Esta proteína es un transportador del tipo ABC localizado a nivel de membrana y requerido para el transporte de cutina a la matriz extracelular (Panikashvili *et al.* 2007). La cutina, formada por ácidos grasos de cadena media (16-18C), forma una matriz que, junto a compuestos como ceras, cetonas, alcoholes y ácidos grasos, forman la cutícula (Tafolla-

Arellano *et al.* 2013). Una cubierta capaz de reducir enormemente la transpiración al evitar las pérdidas de agua. Por lo tanto, en una accesión tolerante a estrés hídrico, esta proteína debería ser sobreexpresada, lo cual no ocurre en tarwi. Esto puede deberse al hecho de que genotipos diferentes de *Lupinus* responden de manera muy diferente enfrentados a sequía terminal, siendo una de las características más beneficiosas, la distribución de fuentes de carbono al tallo y estructuras reproductivas (Palta *et al.* 2007).

Los canales iónicos son capaces de regular el transporte de diferentes iones a través de la membrana, permitiendo la exclusión de iones como Na y Cl del citoplasma. En particular los transcriptos correspondientes a la proteína Canal de Cloruro D muestran una expresión disminuida (Figura 12). Estos canales actúan como transportadores de Cl y NO<sub>3</sub> a nivel del aparato de Golgi, y están involucrados en la acumulación y almacenamiento de nitrato en *Arabidopsis*, la regulación del pH luminal del aparato de Golgi, el tráfico vesicular y el crecimiento radicular óptimo (Fecht-Bartenbach *et al.* 2007). Por lo cual, podrían su expresión podría disminuir ante la presencia de vías de señalización de senescencia medidas por ABA y etileno, discutidas en la sección Hormonas (Figura 23).

Los canales de agua son proteínas que incluyen a las acuaporinas, cuyos transcriptos fueron sobreexpresados en tarwi sometido a sequía (Figura 12). Las proteínas codificadas por estos genes son abundantes en tonoplasto y membrana plasmática, en donde tienen la capacidad de regular el intercambio pasivo de agua (Bellati *et al.* 2016). De esta manera, regulan la conductividad hidráulica de las membranas y potencian un incremento de 10 a 20 veces la permeabilidad al agua (Farooq *et al.* 2009). En condiciones de estrés hídrico severo, como es el caso de las sequías terminales, estas proteínas se expresan en respuesta a estímulos como sequía, deshidratación, desecación, salinidad e incremento de ABA (Vera-Estrella 2004). Por lo que su sobreexpresión indicaría una característica ventajosa en la tolerancia a sequía en tarwi.

Otros canales permiten el intercambio de compuestos orgánicos diversos como azúcares, iones e incluso hormonas. En particular, se debe destacar aquellos canales iónicos que inducen al cierre estomático y la activación de las vías de defensa frente al estrés por sequía. Estas rutas serán desarrolladas en la sección de Hormonas (Figura 23).

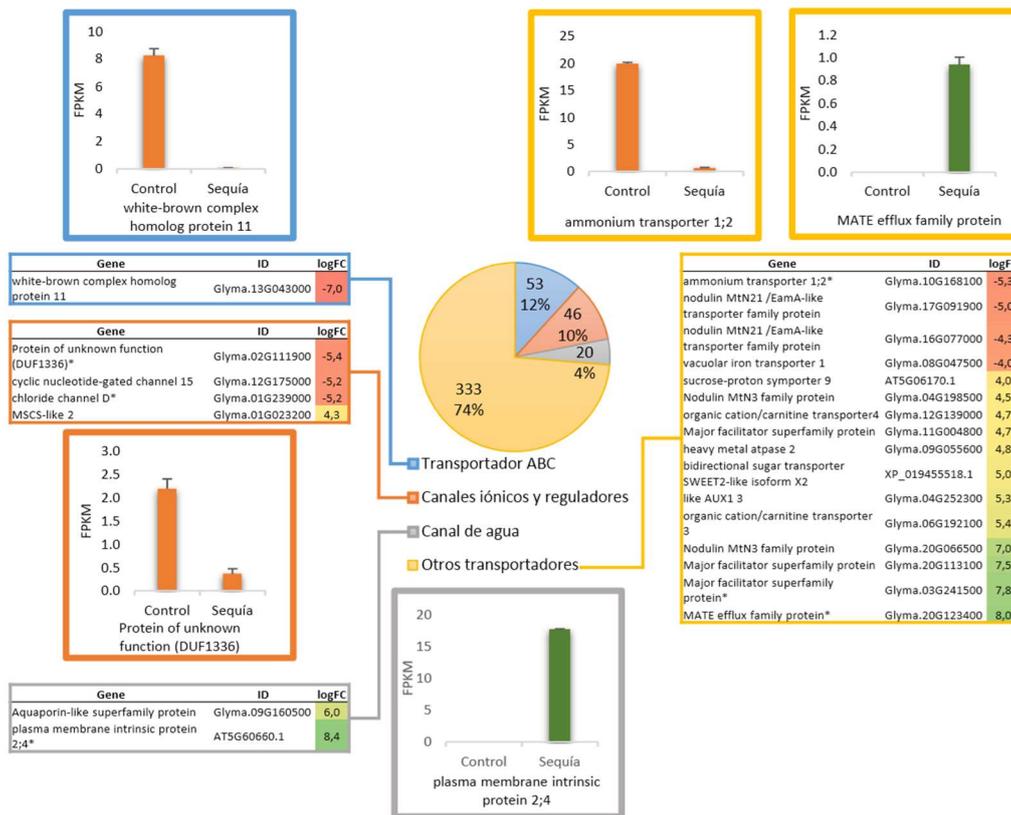


Figura 12. Genes funcionales asociadas a canales y transportadores en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

## a.2. Metabolismo de fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas con función estructural a nivel de membrana, pero su metabolismo genera productos importantes en las vías de señalización. A niveles bajos, pueden activar respuestas adaptativas corriente abajo, mientras a niveles elevados, los productos generados a partir de fosfolípidos pueden reflejar daño por estrés, o incluso, ser nociva (Zhu 2002). En respuesta a estrés, los fosfolípidos de membrana son hidrolizados por fosfolipasas activadas por calmodulina (PLD, PLC, PLA), lo cual afecta la señalización molecular y el crecimiento (Bhattacharjee y Saha 2014). Esta ruta de señalización molecular derivada del metabolismo de fosfolípidos involucra segundos mensajeros como el ácido fosfatídico, diacilgliceroles, polifosfatos de inositol (Kuromori *et al.* 2014, Bhattacharjee y Saha 2014). De hecho, en el transcriptoma de *L. albus* en condiciones de estrés por déficit de fosfato, se encontró incremento de transcritos involucrados en la degradación de fosfolípidos, lo cual contribuye a incrementar la disponibilidad de acetyl-CoA para la síntesis de malato y citrato (Liu *et al.* 2012).

Los resultados obtenidos en tarwi, demuestran que la modificación de este proceso metabólico también es de vital importancia para mantener la homeostasis en respuesta a estrés por sequía. Las proteínas que metabolizan fosfolípidos (Figura 13) fueron agrupadas según si pertenecían al proceso isopentenilo (160), inositol (59), de fosfolípidos en general (44), ceramida (16) y otros (38). Encontrándose expresión diferencial en enzimas con roles diferentes, desde la señalización de EROs, hasta la unión a proteínas diana como PP2C, PDK, y NADH oxidasas, las cuales están involucradas en la generación de segundos mensajeros con capacidad de activar H-ATPasas o MAPKs de respuesta a estrés (Kuromori *et al.* 2014).

El proceso metabólico isopentenilo, con 160 transcritos, representa el grupo con mayor número de transcritos diferencialmente expresados dentro de la ruta de metabolismo de fosfolípidos. La asociación de las enzimas isopentenilo con la ruta de síntesis de hormonas como las citoquininas ha sido bien establecida, siendo la isopentenilo transferasa es la enzima regulatoria en la síntesis de estos reguladores (Merewits *et al.* 2016). Además, su expresión, ha sido relacionada con la expresión de genes de resistencia a estrés por sequía y que alteran el metabolismo de citoquininas en *Manihot esculenta* y *Agrostis palustris* (Zhang *et al.* 2010; Merewits *et al.* 2016). Por lo cual, es utilizada en transformación, junto a promotores inducibles por senescencia.

El proceso metabólico inositol, con 59 genes diferencialmente expresados, es el segundo grupo de importancia en el metabolismo de fosfolípidos encontrados en el transcriptoma de *L. mutabilis*. El inositol es un segundo mensajero generado a partir de la degradación de fosfolípidos (Xiong *et al.* 2002). La señalización mediante el inositol tiene un rol esencial en diferentes aspectos del crecimiento y adaptación. Las quinasas y fosfatasa de inositol pueden afectar la disponibilidad de esta molécula, afectando procesos como la liberación de Ca, señalización de ABA, tráfico vesículas, entre otros, y proporcionando una repuesta a estrés abiótico (Jia *et al.* 2019). Esto podría explicar la disminución en la expresión de enzimas como Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase family protein (Figura 13).

Con respecto al proceso metabólico de fosfolípidos, destaca el rol de quinasas de proteínas dependientes e independientes de SOS (Salt Overly Sensitive), que se activan

ante el exceso de Na, y activa una señalización citoplasmática de Ca, dando como resultado cambios en la expresión y actividad de transportadores de iones como el Na, K e H (Zhu 2002). Precisamente, la sobreexpresión de la enzima C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyl transferase (Figura 13) indica la modificación de las rutas de transducción involucradas en la modulación del calcio (desarrollada en la sección de señalización molecular).

Otro de los hallazgos realizados fue la disminución de la expresión de la enzima fatty acid desaturase 5 (Figura 13), una enzima capaz de incrementar la producción de ácidos grasos insaturados. Estos ácidos grasos están presentes en las membranas y son particularmente sensibles al ataque por radicales OH y otros agentes oxidantes. Su oxidación en las biomembranas conlleva a la formación de una gran diversidad de aldehídos, algunos de los cuales son altamente reactivos, lo cual puede desencadenar un daño en cadena incrementando la fluidez y permeabilidad de la membrana (Pessarakli 2019).

Las rutas de metabolismo de fosfolípidos también se interconectan con rutas metabólicas de otras hormonas, como auxinas o ABA. Los segundos mensajeros generados pueden actuar sobre proteínas como SAUR1, un regulador negativo de la producción de auxinas (Bhattacharjee y Saha 2014). También Las fosfolipasas A, B y C, también están involucradas en la vía dependiente de ABA (Kuromori *et al.* 2014, Bhattacharjee y Saha 2014). El rol de estos genes en tarwi, será discutido en las secciones Hormonas (Figura 23) y Transducción de señal (Figura 21), respectivamente.

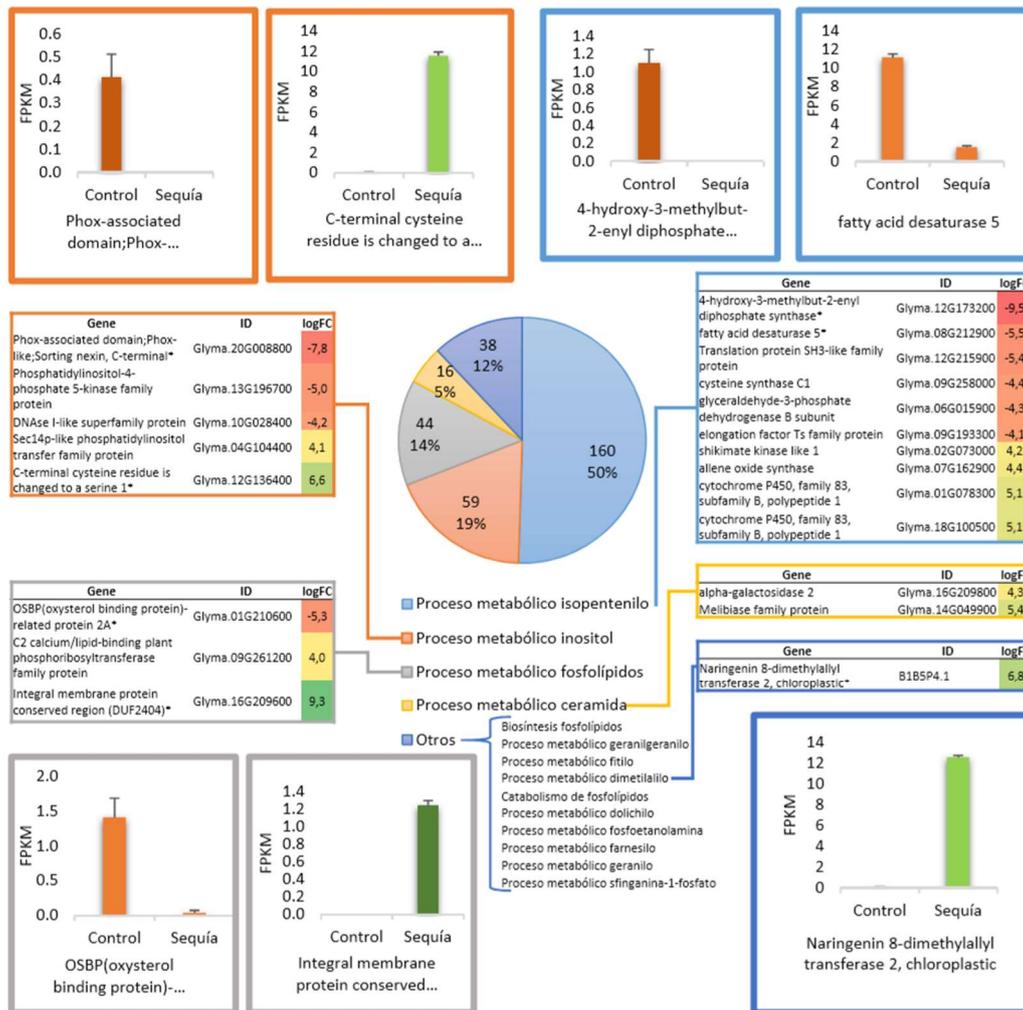


Figura 13. Genes funcionales asociados al metabolismo de fosfolípidos en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### a.3. Fotosíntesis

La sequía terminal es gran limitante para la producción de *Lupinus*, al causar reducción en el rendimiento mediante una reducción del potencial fotosintético. En especies como *L. albus*, se ha encontrado que el estrés por sequía es capaz de disminuir la capacidad fotosintética, metabolismo de C y balance hormonal en diferentes órganos (Pinheiro *et al.* 2011). Etapas como el llenado de grano, dependen enteramente de la asimilación y la fotosíntesis, siendo muy sensibles a déficit hídricos. Por lo cual, durante una sequía terminal, procesos como el llenado de semilla se reduce por una reducción en la disponibilidad de C y N, lo que origina aborto de semillas y vainas, con una reducción considerable en el rendimiento (Palta *et al.* 2007). A nivel molecular, estos daños son causados por la reducción gradual en la disponibilidad de agua. Esto conlleva a una

limitación de estomas, disminuyendo la actividad máxima de carboxilación de Rubisco y transporte de electrones y, por lo tanto, la regeneración de ribulosa 1,5-bifosfato (Pinheiro *et al.* 2011).

Los resultados observados en el transcriptoma de tarwi sometido a sequía, demuestran que existe cambios en la expresión de genes relacionados a fotosíntesis, los cuales fueron colocados en 3 grupos (Figura 14). El primero incluye a las proteínas que participan en las reacciones de la fase luminosa (103), luego están las proteínas relacionadas a fotosíntesis (85) y finalmente las relacionadas a regulación de la fotosíntesis (1). Uno de los hallazgos más resaltantes es la regulación negativa de la enzima Ribulose bisphosphate carboxylase, lo que estaría relacionado con la inhibición de la fotosíntesis bajo sequía, causada a su vez por la reducción en la capacidad de regeneración y eficiencia en la carboxilación de ribulosa 1,5 bifosfato (Rivero *et al.* 2007). En legumbres de grano, como el tarwi, el control estomático de la pérdida de agua es una respuesta vegetal temprana a la sequía, que resulta en disminución de la toma de C por las hojas. Esta disminución durante la sequía, es responsable de las reducciones en la fotosíntesis al inhibir a la enzima en el sitio de unión de Rubisco o ATP sintasa. Esto a su vez, origina downregulación del aparato fotosintético (Farooq *et al.* 2017).

Las vías de glucólisis y de pentosas fosfato, son reguladas por enzimas como fosfofructoquinasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, respectivamente, y ambas son modificadas de manera significativa por el estrés hídrico. En particular, la presencia de sequía, tiene un efecto activador sobre la actividad de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, mientras que inhibe la actividad de fosfofructoquinasa en plantas como *Morus alba* (Yao y Wu 2016). La disminución en la expresión de la enzima Fosfofructoquinasa observada en el transcriptoma de tarwi sometido a sequía podría indicar la reducción en las vías metabólicas de producción de energía, como la glucólisis, para favorecer las rutas que permitan regenerar antioxidantes. Este hallazgo, coincide con la sobreexpresión de enzimas relacionadas a la vía de las pentosas fosfato, una vía paralela a la glucólisis que permite regenerar NADPH.

Estudios relacionados con la evaluación de parámetros fotosintéticos en *Lupinus spp.*, han demostrado que el déficit hídrico durante las fases del llenado de grano, origina variaciones metabólicas bastante marcadas como desviación de los fotoasimilados hacia

ciertos órganos, y modificación de la composición mineral (Carvalho 2005). Si el déficit hídrico es severo, algunos lupinos muestran cambios en metabolitos mayores de órganos como folíolos, peciolos, raíces, y tallo; la mayoría de las hojas se pierden y el tallo funciona como un almacén de reposición de azúcares glucosa y sacarosa y de los aminoácidos asparagina y prolina (Pinheiro *et al.* 2004). En tallo se ha observado también acumulación de carbohidratos solubles como monosacáridos, sacarosa, ciclitoles, y oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Piotrowicz 2007). Además, se ha reportado la producción y acumulación de deshidrinas (proteínas de respuesta a deshidratación, cuyo papel es conferir tolerancia) en tallo, y durante la maduración de la semilla (Pinheiro *et al.* 2004). Otros efectos de la sequía en *Lupinus spp.*, incluyen disminución de actividad metabólica en los nódulos, reducción de sacarosa y desaparición de gránulos de almidón (Comino *et al.* 1997).

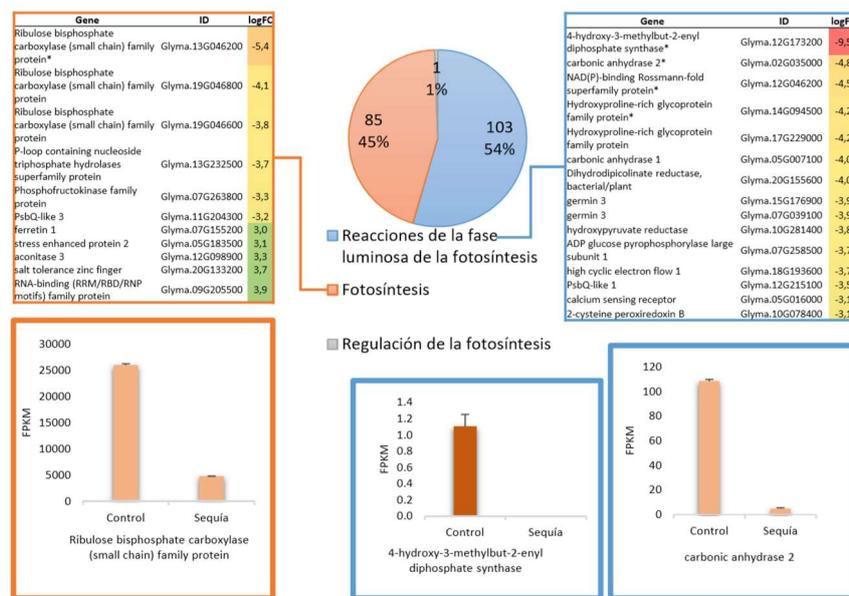


Figura 14. Genes funcionales asociados a fotosíntesis en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

#### a.4. Genes de detoxificación

Los genes del grupo de detoxificación fueron clasificados según si pertenecían a la ruta de oxidación-reducción (358), actividad peroxidasa (41), actividad peróxido dismutasa (23), y otros (9). Los genes con mayor expresión diferencial ( $\logFC < -4$ ;  $\logFC > 4$ ) dentro de esta vía son mostrados en la Figura 15. Es importante destacar el alto número de genes relacionados con los procesos de oxidación-reducción encontrados pues está relacionado

con la generación de EROs que se producen en cantidades elevadas durante el estrés abiótico. Si bien es cierto, las EROs pueden regular redes de señalización que controlan crecimiento, desarrollo y la respuesta a estrés en plantas, al actuar como segundos mensajeros, también se debe tener en cuenta que al ser moléculas tóxicas también son capaces de dañar las células (Mittler *et al.* 2004, Xiong *et al.* 2002). Al acumularse durante el estrés por sequía, se pierde el balance entre los EROs y la defensa antioxidante, lo que origina estrés oxidativo (Waraich *et al.* 2011).

Para reducir la toxicidad por EROs, las plantas utilizan su sistema de defensa antioxidante. Dentro de este sistema, se encuentra antioxidantes de bajo peso molecular, así como enzimas protectoras (Waraich *et al.* 2011). Por lo tanto, en condiciones de estrés, las plantas son capaces de inducir la producción de enzimas que producen glutatión reducido, ascorbato, además de peroxidasas y peróxido dismutasas (Fang y Xiong 2015). Estas enzimas fueron precisamente expresadas de forma diferencial en tarwi sometido a estrés hídrico (Figura 15), lo cual indica la capacidad de tarwi para poder hacer frente a daño oxidativo mediante la modificación de la expresión del sistema de defensa antioxidante enzimático.

Las enzimas con actividad superóxido dismutasa actúan como una primera línea de defensa mediante la detoxificación de los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno que son convertidos en agua y oxígeno molecular, previniendo el daño oxidativo (Farooq *et al.* 2017); sin embargo, según los datos obtenidos en *L. mutabilis*, solamente 23 de los genes diferencialmente expresados están relacionados con esta actividad enzimática (Figura 15). Esto indicaría que estas enzimas no tienen un rol funcional en la respuesta de tarwi a sequías terminales, señalando la predominancia de vías alternas de eliminación de estos compuestos.

Por el contrario, los resultados demuestran que el ciclo de glutatión-ascorbato tiene mayor relevancia en la respuesta de tarwi a sequía terminal. Esta aseveración es soportada por la expresión de las enzimas correspondientes a la regeneración de sustratos intermediarios de este ciclo. En particular, el hecho de que el segundo grupo con mayor cantidad de transcritos pertenezca a la actividad peroxidasa (Figura 15), las se encargan de la remoción de compuestos nocivos como el peróxido de hidrógeno utilizando ascorbato y

glutación, los cuales dependen en última instancia de la regeneración de NADPH+ (Sofa *et al.* 2015).

La presencia del ciclo de glutatión-ascorbato está soportada por la sobreexpresión de enzimas oxidorreductasas responsables de la producción del NADPH+. Estas enzimas son capaces de regenerar NADPH+. La presencia de esta coenzima reducida permite la reducción del glutatión, que es uno de los antioxidantes más importantes a nivel de membrana (Meyer 2008). De hecho, las NADP+ oxido-reductasas normalmente se encuentran sobreexpresadas en condiciones de estrés oxidativo (Meyer 2008). Su expresión en tarwi (Figura 15) podría ser blanco de modificación genética para obtención de plantas tolerantes a sequía. Esto ha sido demostrado por Laporte *et al.* (2002) quienes demostraron que la expresión de la enzima mítica NADP modifica el comportamiento de estomas en tabaco, incrementando su masa fresca por unidad de agua y mejorando su eficiencia de uso de agua.

Otra de las enzimas que mostró expresión diferencial disminuida fue el citocromo P450 (Figura 15). Esta enzima está involucrada en las rutas de degradación de ABA (Zhu 2002), lo cual indicaría que el estrés oxidativo que se presenta en tarwi es capaz de influir sobre el equilibrio de óxido-reducción, que también promovería las modificaciones en las rutas hormonales de ABA en tarwi. Esta ruta es tratada más adelante.

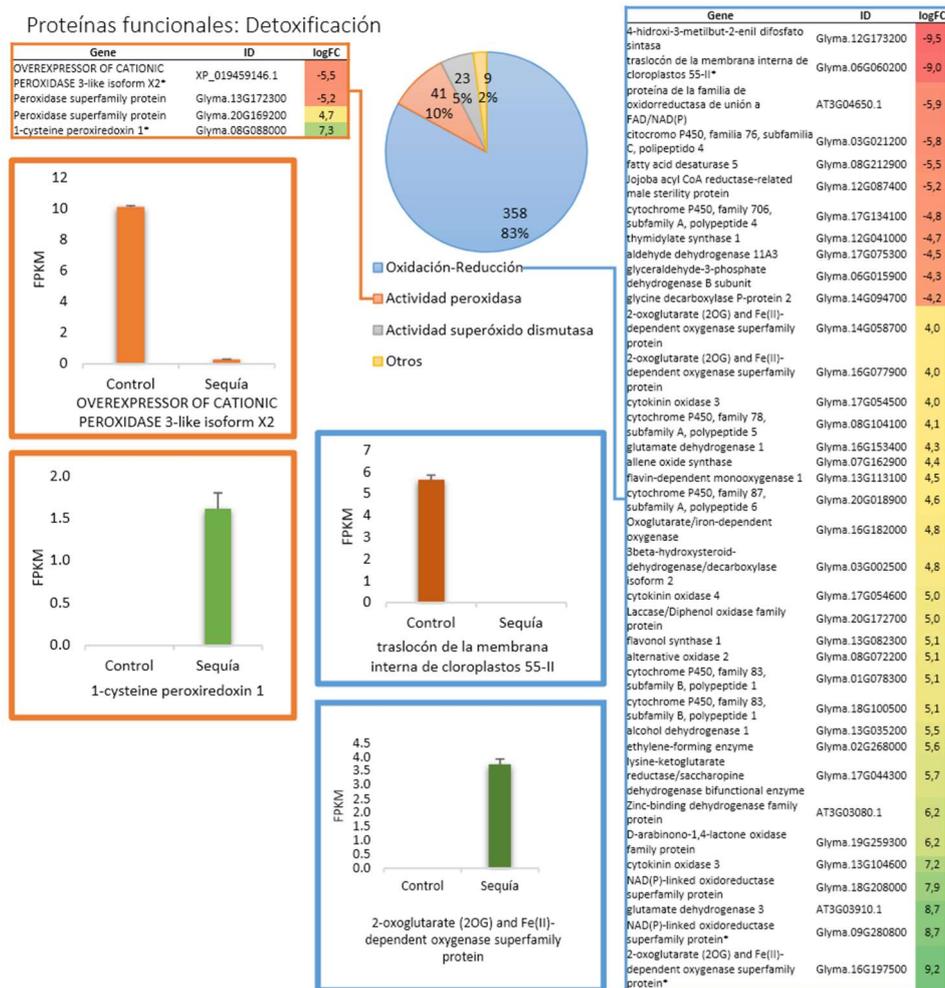


Figura 15. Genes funcionales asociados a las vías de detoxificación en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### a.5. Osmolitos

La acumulación de ciertos solutos orgánicos conocidos como osmoprotectores, o solutos compatibles, constituye una adaptación metabólica común frente al estrés abiótico presente en organismos tolerantes al estrés. Estos solutos protegen a las proteínas y membranas del daño de concentraciones elevadas de iones inorgánicos (Rathinasabapathi 2000). Algunos osmoprotectores, también protegen a la maquinaria metabólica del daño oxidativo y otras moléculas desestabilizadoras (Farooq *et al.* 2009). Los genes que codifican proteínas relacionadas con la producción de estos osmolitos (Figura16) fueron divididos según el proceso metabolito con el cual están relacionadas. Encontrándose los

grupos de prolina (68 transcriptos), glicina (53 transcriptos), trehalosa (14 transcriptos), arginina (12 transcriptos) y otros (31 transcriptos).

Tal como se puede apreciar, la mayor parte de las enzimas relacionadas con la síntesis de osmolitos se encuentran relacionadas a la producción de prolina. La síntesis de este aminoácido es regulada por la expresión de D1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS), la cual mostró expresión diferencial muy baja en el transcriptoma de tarwi que se presenta (Anexo 10: Osmolitos) y prolina deshidrogenasa ProDH (Hayashi *et al.* 2000). La presencia de estos transcriptos indica que tarwi es un acumulador de prolina, tal como otras especies de *Lupinus* (Pinheiro *et al.* 2004). Este aminoácido es esencial en procesos de estrés, pudiendo actuar como soluto compatible, agente detoxificador de EROs, generador de otros aminoácidos como glutamato, arginina y glicina y molécula señal en las vías de transducción (Szabados y Saviouré 2010).

El incremento en los niveles de prolina está claramente relacionado con los procesos de oxidación presentes en condiciones de estrés por déficit hídrico (Farooq *et al.* 2009). La relación de prolina y los procesos de óxido-reducción ha sido reportada en numerosas especies tolerantes a sequía, entre las cuales se encuentra *L. mutabilis* (Gulisano *et al.* 2019). Con respecto a la detoxificación de EROs, la prolina es capaz de aceptar electrones desapareados, evitando procesos de oxidación en otras macromoléculas. De esta manera, permite la reducción de compuestos prooxidantes entre los cuales están el oxígeno singleten y radicales hidroxilo, entre otras EROs (Matysik *et al.* 2002).

La síntesis de prolina consume agentes reductores, principalmente en la forma de NADPH, los cuales provienen de la vía de las pentosas (Kishor *et al.* 2005). Esta relación permite que los compuestos reductores generados durante la fotosíntesis puedan ser almacenados como prolina, además de permitir la regulación de los niveles disponibles de NADP<sup>+</sup> y NADPH (Lehmann *et al.* 2010, Kishor *et al.* 2005). El transporte de este aminoácido a compartimentos específicos intracelulares, como el interior de la mitocondria permite llevar este poder reductor a la cadena transportadora de electrones (Verslues y Sharma 2012). Este transporte es realizado por las proteínas transportadoras de prolina (ProT), cuya sobreexpresión fue encontrada en el transcriptoma de tarwi que se presenta (Figura 16).

Con respecto a la interconexión de las vías de metabolismo de prolina con otras vías de señalización, se puede resaltar la presencia de transcritos con expresión diferencial como la proteína FKBP peptidil-prolil cis-trans isomerasa (Figura 16), la cual está involucrada en numerosos procesos biológicos, como la expresión génica, transducción de señal, secreción de proteínas, desarrollo y regeneración de tejidos, lo cual resalta su importancia (Unal y Steinert 2014).

Por otra parte, se debe tener en cuenta que la prolina no se acumula solamente en condiciones de estrés. Según lo reportado por (Mattioli *et al.* 2009), quien menciona que en tejidos reproductivos de *Arabidopsis*, la prolina representa la mayor parte del pool de aminoácidos, como resultado de la sobreexpresión de P5Cs. De hecho, en la determinación de prolina en tarwi, se demuestra que su acumulación a nivel de hojas es mucho más significativa en condiciones de sequía (Figura 10C).

La glicina es otro aminoácido relevante en condiciones de estrés. Está presente en aminos cuaternarios como glicinabetaína y en proteínas de protección como deshidrinas (Farooq *et al.* 2009). Los resultados del análisis transcriptómico muestran disminución en la expresión de las enzimas de degradación de glicina, como la glicina descarboxilasa (GDC) (Figura 16), indicaría el aumento de la capacidad de tarwi para mantener este compuesto por mayor tiempo, lo cual prolongaría su efecto protector. Se debe mencionar también, que GDC es una enzima que participa de la vía de fotorrespiración, una vía metabólica estimulada en condiciones de estrés y déficit hídrico, que es responsable de la disminución en la tasa de fijación de C (Douce *et al.* 2001). Por lo cual, la disminución en la expresión de esta enzima, puede resultar beneficiosa cuando se busca incrementar la tolerancia a estrés hídrico. Además, está el hecho de que el aminoácido glicina genera NADPH y tetrahidofolato (THF) durante su degradación a nivel mitocondrial (Douce *et al.* 2001), lo cual relaciona esta vía metabólica con las vías de protección contra el estrés oxidativo.

La glicinabetaína es uno de los amonios cuaternarios más estudiados al actuar como soluto compatible en muchos organismos, que también podría participar en las rutas de transducción de señal (Farooq *et al.* 2009). Su síntesis se realiza a través de la oxidación de colina monooxigenasa (CMO) y betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) encontradas a nivel del estroma, y que codifican transcritos que pueden ser procesados de manera

anómala y degradados en cereales como arroz, lo cual impide la formación de este compuesto y su acumulación (Giri 2011). La acumulación de glicinabetaína se da en plantas luego de estrés por sequía, temperatura, o salinidad, sin efectos negativos para las plantas (Xu *et al.* 2018). Su rol es la estabilización de la estructura cuaternaria de proteínas y la estructura altamente ordenada de proteínas y membranas para hacer frente al efecto deletéreo de salinidad elevada, sequías o elevadas temperaturas (Sakamoto y Murata 2000). La síntesis de este compuesto para resistir resistencia a estrés osmótico se ha relacionado con la activación de genes de respuesta a ABA mediante ABRE, y recientemente, ha sido relacionada con las vías metabólicas de ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno (Xu *et al.* 2018), las cuales son discutidas en la sección correspondiente a Factores de Transcripción. Por lo tanto, la introducción de genes que sintetizan glicinabetaína es un cambio deseable cuando se realizan trabajos de mejoramiento orientados a aumentar la tolerancia a estrés en diversos tipos de plantas. Por ejemplo, se ha comprobado que el aumento del contenido de glicinabetaína, incrementó la tolerancia a estrés en algodón (Farooq *et al.* 2009). Mientras que, en cebada, las plantas sometidas a estrés por sequía y salinidad, mostraron cantidades elevadas de este compuesto, lo cual brinda protección a la actividad enzimática y a la vez funciona como una fuente de nitrógeno de fácil movilización para el alivio del estrés (Ahmed *et al.* 2013).

A pesar de no ser considerado un osmolito, el glutamato es un aminoácido relevante en el metabolismo central, al estar relacionado directamente con otros aminoácidos considerados solutos compatibles, como arginina, glutamina, asparagina e incluso prolina (Pandey 2015). Este aminoácido es sintetizado a partir del alfa-cetoglutarato en una reacción catalizada por glutamato deshidrogenasa (GDH) (Wei *et al.* 2004), una enzima presente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) que se expresa a nivel mitocondrial y se encuentra sobreexpresada en el transcriptoma de tarwi reportado (Figura 16). Al incorporar  $\text{NH}_4^+$ , esta enzima es capaz de aliviar el estrés oxidativo ocasionado por el catabolismo de aminoácidos en condiciones de sequía (Wei *et al.* 2004).

Las variaciones observadas a nivel de los transcritos de las enzimas que controlan el metabolismo de glutamina/glutamato (Figura 16) demuestran que los esqueletos carbonados presentes en los aminoácidos están siendo utilizados para su degradación esto parece ser una característica de tolerancia de la acesión de tarwi evaluada, probablemente en respuesta a las restricciones nutricionales impuestas por el estrés

hídrico en tarwi. Entre esas variaciones, se encuentra la disminución en la expresión de Glutamina Sintetasa (GS) (Anexo 10: Osmolitos), una enzima capaz de sintetizar glutamina a partir de glutamato (Verslues y Sharma 2012). Este hallazgo contrasta con lo reportado por Brugiere *et al.* (1999), quien encontró que la inhibición de GS ocasiona una reducción en los niveles de glutamina y prolina, con un incremento de sensibilidad al estrés salino.

Por otra parte, la glutamina es degradada para formar glutamato, reacción catalizada por la enzima Glutaminasa (Verslues y Sharma 2012). Según los resultados obtenidos, esta enzima estuvo ligeramente elevada en el transcriptoma de tarwi (Anexo 10: Osmolitos) y que en conjunto con la sobreexpresión observada en GDH, podrían explicar la disponibilidad de glutamato. Esto puede ser determinante en la tolerancia a sequía observada en tarwi, puesto que el glutamato es un precursor de la prolina (Ahmad y Prasad 2012) y en condiciones de estrés, actúa como reservorio de este compuesto (Verslues y Sharma 2012).

El glutamato también puede ser precursor del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), mediante una reacción catalizada por Glutamato Descarboxilasa (GD). GD y el receptor de glutamato (GR) participan en la señalización de Ca (Pandey 2015). Por lo cual, es capaz de modular las vías de transducción de señal de hormonas como el ácido indolacético (AIA) con el cual forman complejos capaces de generar respuestas específicas a nivel intracelular (Pandey 2015). Esto podría estar relacionado con la proteína transportadora de eflujo de auxinas sobreexpresada en el transcriptoma de tarwi (Figura 16). Las implicancias de este hallazgo se discutirán en la sección correspondiente a Hormonas (Figura 23).

La asparagina sintetasa dependiente de glutamina fue una de las enzimas cuyos transcritos fueron sobreexpresados en el transcriptoma de tarwi en condiciones de estrés hídrico (Figura 16). Esta enzima está relacionada con la síntesis de asparagina, un aminoácido capaz de actuar como soluto compatible, cuyo papel ya ha sido resaltado en la tolerancia a sequía en *L. albus* (Pinheiro *et al.* 2004).

Estos resultados resaltan la importancia de los solutos compatibles en condiciones de estrés, y la interconexión de sus rutas metabólicas con procesos hormonales. Por ejemplo,

en brotes y raíces de maíz expuesto a estrés por salinidad, se incrementó el nivel de sacarosa en tanto que malato, succinato y GABA se incrementaron en raíces, mientras que glicinabetaina, asparagina y glutamato se incrementaron en tallos (Pandey 2015).

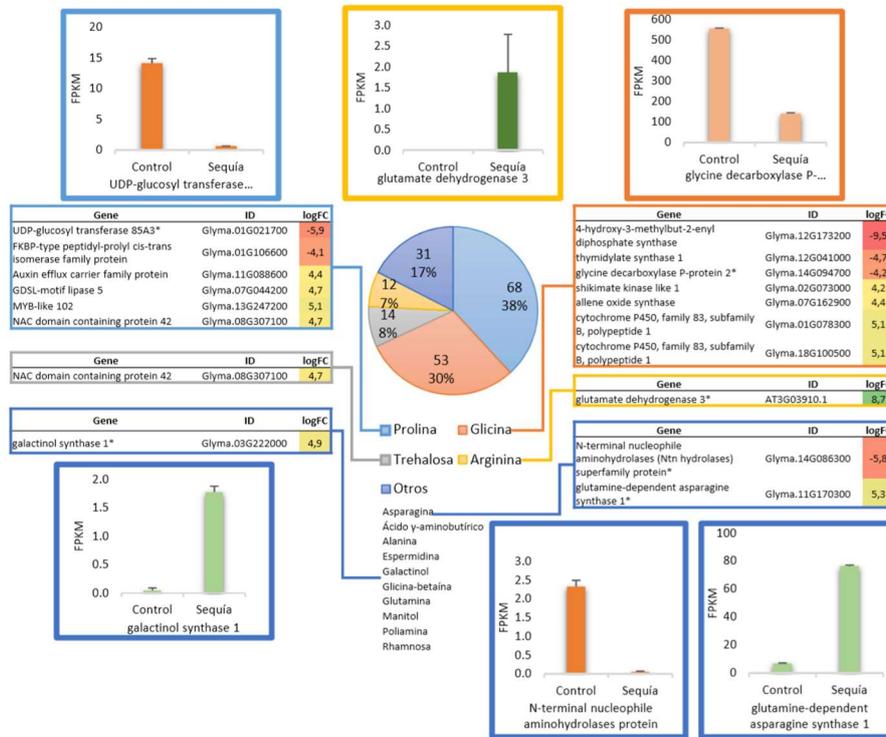


Figura 16. Genes funcionales asociados a osmolitos en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### a.6. Factores de protección

Las proteínas que actúan como factores de protección son mostradas en la Figura 17. En el trabajo, se encontraron los transcritos de 29 factores de protección con expresión diferencial (11 transcritos con expresión disminuída y 18 con expresión aumentada). La totalidad de estos transcritos corresponden a proteínas abundantes de embriogénesis (LEAs), que fueron descritas en el marco teórico. La acumulación de estas proteínas ha sido reportada en respuesta a estrés por sequía, en diferentes especies, que incluyen a *L. albus* (Pinheiro *et al.* 2008).

Destaca la sobreexpresión de la proteína abundante de embriogénesis tardía (LEA) D-29-like isoforma X4 [*L. angustifolius*]. Esta proteína es capaz de formar hélices anfífilas que, durante la desecación, pueden actuar como trampas de iones, secuestrando iones que están concentrados en condiciones de estrés hídrico (De La Cruz *et al.* 2009). Homólogos de esta proteína brindan resistencia a la desecación en diferentes organismos (Wise,

2003). Además, se ha observado la inducción de LEAs mediada por ABA durante el desarrollo embrionario y en la respuesta a diferentes tipos de estrés medioambiental (De La Cruz *et al.* 2009). Homólogos de este gen han sido estudiados e introducidos en especies como algodón y soya para realizar estudios relacionados con la tolerancia a estrés por sequía y salinidad (Hsing *et al.* 1995; Galau *et al.* 1986).

Otro grupo de transcritos con expresión diferencial en *L. mutabilis*, son homólogos de la proteína HVA22 (Figura 17). Estos elementos codifican una proteína inducida por estrés y ácido abscísico (Bahieldin *et al.* 2005). En cebada, los transcritos de este gen se acumulan gradualmente en respuesta a ABA para mantener la dormancia. Además, la sobreexpresión de esta proteína inhibe la formación de vacuolas digestivas grandes inducidas por giberelinas (Guo y Ho 2008). Los cambios a nivel transcripcional en este gen señalan la interconexión de este elemento con la señalización hormonal dependiente de ABA, tal como se menciona en la sección Hormonas (Figura 23).

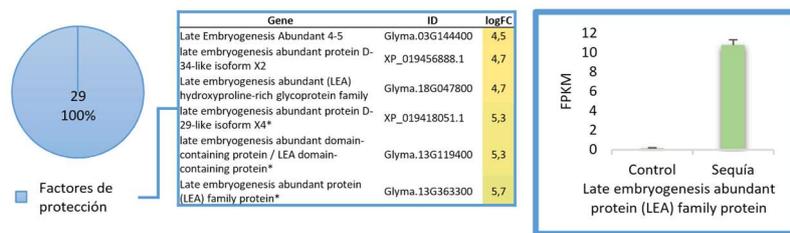


Figura 17. Genes funcionales asociadas a factores de protección en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### a.7. Proteasas

Adicionalmente a las modificaciones postraduccionales y segundos mensajeros, otro mecanismo regulatorio de transducción de señal es la proteólisis (Kuromori *et al.* 2014). La proteólisis afecta a los sistemas de transducción de señal mediante el control de las cantidades de factores de señalización al nivel de proteína. Esta proteólisis selectiva depende de la ubiquitinación de proteínas diana por las ligasas de ubiquitina E3 (Kuromori *et al.* 2014). Algunos tipos de ligasas E3 han sido registradas en plantas, y parecen estar involucradas en la señalización de ABA. Las proteasas a su vez, también pueden ser activadas mediante fosforilación por quinasas de proteínas dependientes de Ca., que están asociadas a retículo endoplásmico, citoesqueleto, néclo y membrana plasmática (Mitra 2015).

Las proteínas relacionadas a proteólisis fueron incluidas dentro de las proteasas. Los 4 grupos (Figura 18) presentes estuvieron relacionados a actividad endopeptidasa (126), actividad peptidasa (50), proteasa (22) y exopeptidasa (2). La sobreexpresión marcada de enzimas como Eukaryotic aspartyl protease family protein en el transcriptoma de tarwi en condiciones de estrés por sequía (Figura 18), puede ser causada por el ataque de las EROs en las proteínas. Estos compuestos prooxidantes pueden causar la modificación de aminoácidos específicos de sitio, fragmentación de la cadena polipeptídica, agregación de productos de reacción cruzada, carga eléctrica alterada, entre otros, lo cual origina susceptibilidad incrementada a la proteólisis (Pessaraki 2019).

Por otra parte, proteasas como subtilisin-like protease SBT4.4 con regulación diferencial en *L. mutabilis* (Figura 18), corresponde a la familia de genes Subtilisin-like protease, que ha sido asociada con interacciones con micorrizas arbusculares y asociaciones con rizobios en los genomas de *Medicago truncatula* y *L. angustifolius*. Estos genes han sido postulados como importantes dentro de la asociación con microorganismos, pero podrían tener otros roles en *Lupinus*, al no establecer asociaciones simbióticas con micorrizas (Hane *et al.* 2017).

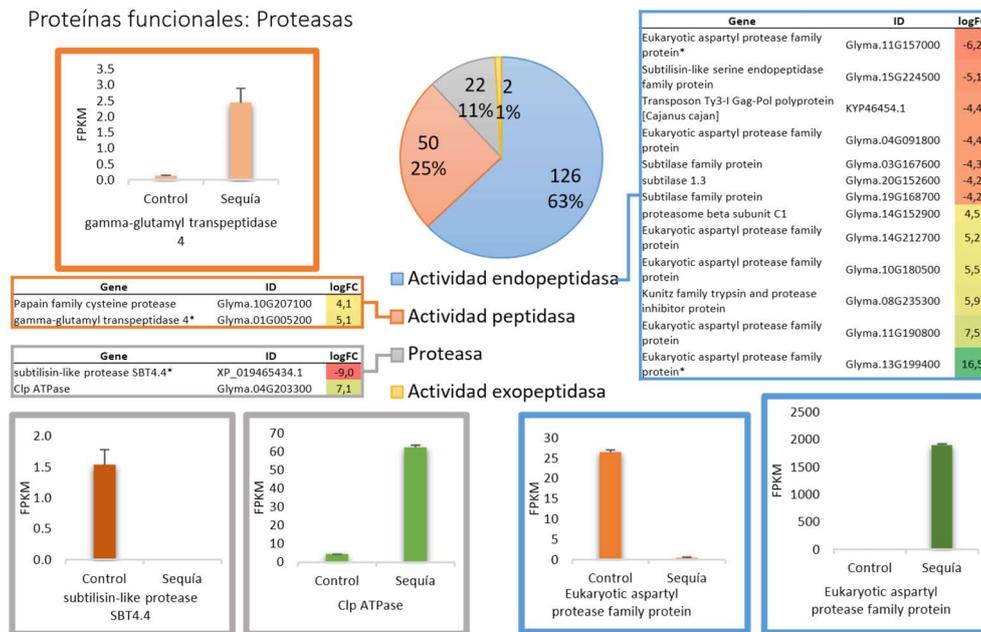


Figura 18. Genes funcionales asociados a proteasas en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

## **b. Genes diferencialmente expresados que codifican proteínas regulatorias**

### **b.1. Complejos ligasa de ubiquitina**

El estrés abiótico induce cambios deletéreos a nivel sistémico en proteínas tanto funcionales como regulatorias (Ashraf 2010). Estas proteínas dañadas o mal plegadas se van acumulando y deben ser removidas. En células eucariotas, uno de los mecanismos de remoción más importante a nivel de citosol y núcleo, es la vía de degradación por el sistema Proteasoma 26S – Ubiquitina (Ub/26S) (Pandey 2015). La maquinaria molecular de Ub/26S comprende alrededor de 31 subunidades diferentes, las cuales catalizan la degradación proteica de dianas ubiquitinadas (Vogues *et al.* 1999). En esta ruta, la ubiquitina se liga a las proteínas destinadas a degradación, y los complejos resultantes de proteína-ubiquitina son luego reconocidos y catabolizados por el proteasoma 26S (Smalle y Vierstra, 2004). La ruta Ub/26S es una de los mecanismos regulatorios más elaborados en plantas. El genoma de *Arabidopsis* codifica más de 1400 genes, que representan más del 5% del proteoma y que pueden ser conectados a casi todos los aspectos de su biología (Lyzenga y Stone 2012; Smalle y Vierstra, 2004). Los complejos ligasa de ubiquitina, son parte de la ruta Ub/26S al ser responsables de la ubiquitinación. En este proceso, la ubiquitina es agregada de manera secuencial a las proteínas, generando cadenas de poliubiquitina estructuralmente diversas (Lyzenga y Stone 2012). Los genes correspondientes a las ligasas de ubiquitina han sido reportados en el genoma de *Lupinus angustifolius*, con roles en la interacción simbiótica con micorrizas y rizobios (Hane *et al.* 2017). En el presente trabajo, se ha encontrado presencia de estos transcritos, los cuales fueron separados en 4 grupos: complejo ubiquitina-ligasa cul4-RING E3 (16 transcritos), complejo ubiquitina-ligasa SCF (8 transcritos), actividad ligasa ubiquitina-proteína (3 transcritos) y otros (4 transcritos) (Figura 19). Lo cual señala la importancia de la ruta Ub/26S en la ubiquitinación proteínas diana en tarwi sometido a estrés por sequía.

#### **b.1.1. Complejo ubiquitina-ligasa Cul4-RING E3 (WD40)**

Las proteínas ligasa de ubiquitina (E3) representan más del 50% del total de transcritos diferencialmente expresados en tarwi sometido a sequía (Figura 19). Estas proteínas catalizan el último de 3 pasos en el proceso de ubiquitinación (Lyzenga y Stone 2012). Por lo tanto, son las encargadas de reclutar a los sustratos que serán poliubiquitinados (Stone 2014). La degradación de proteínas por ubiquitinación a través de estas enzimas

se ha relacionado con funciones como la degradación, endocitosis, activación de proteínas, y tráfico intracelular (Lyzenga y Stone 2012). Las proteínas de la familia WD40, así como su ortólogo en *Arabidopsis* JINGUBANG tuvieron expresión diferencial en el transcriptoma de tarwi, en particular el transcrito anotado como “Glyma.09G198200” (Figura 19). Estas proteínas han sido postuladas como proteínas de unión al ADN dañado (Lyzenga y Stone 2012), lo cual podría estar relacionado con la modificación de la cromatina y los cambios en el sistema de defensa antioxidante, y sus transcritos han presentado expresión diferencial en trigo sometido a condiciones de estrés (Hu *et al.* 2018).

### b.1.2. Complejo ubiquitina-ligasa SCF (BTB)

Los E3 basados en CUL1 (también referidos como Skp1-Cullin-F-box [SCF]) son proteínas que actúan como andamiaje que unen los complejos Ub-E2 activados y la proteína diana, para promover la conjugación sin necesidad de un intermediario E3-Ub (Stone, 2014). En el transcriptoma de tarwi presentado, se han encontrado las proteínas F-box con expresión disminuida. Este tipo de proteínas tiene homología con Drought tolerance repressor (DOR), una proteína F-box que puede participar en un anillo de ligasa RING E3 basado en CUL1, la cual es un regulador negativo de las respuestas mediadas por ABA (Zhang *et al.* 2008). Por lo tanto, la disminución en la expresión del transcrito anotado como “Glyma.02G191900” (Figura 19) podría estar relacionada con la activación o disminución de diversas rutas hormonales en respuesta a sequía, tal como se ha observado en auxinas y ácido jasmónico en arroz (Du *et al.* 2013)

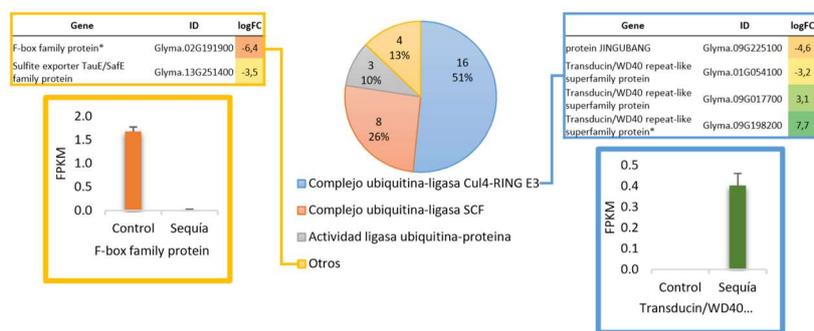


Figura 19. Genes regulatorios asociados a Complejos Ligasa de Ubiquitina en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

## **b.2. Hidrolasas ácido-anhídrido**

Las proteínas que actúan como hidrolasas de ácido anhídrido comprenden un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis de enlaces difosfato en compuestos como nucleósidos di y tri fosfatados, y anhídridos que comprenden sulfonilos, como el adenil sulfonato (Casida y Quistad 2005). Los datos de expresión de este grupo de enzimas son mostrados en la Figura 20. La agrupación comprende pirofosfatasas (13 transcriptos) y ATPasas de protones (1 transcripto).

Las pirofosfatasas son enzimas que degradan el pirofosfato (PPi), regulando los niveles de PPi presentes a nivel intracelular como producto del metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos de membrana (Gutiérrez-Luna *et al.* 2017). Las condiciones de estrés ambiental afectan de manera negativa la nutrición y el metabolismo de P en plantas, lo cual también se observa en tarwi sometido a sequía (Figura 9B Contenido de elementos en la parte aérea). Esto podría constituir una base para la variación observada en la expresión de estas enzimas. De hecho, se ha reportado alteración en la actividad de enzimas fosforolíticas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y ATPasa en plantas expuestas a condiciones ambientales de estrés abiótico, como la salinidad del suelo, estrés osmótico y exceso de metales pesados (Mishra y Dubey 2008); sin embargo, se debe tener en cuenta que hay trabajos que indican que la actividad de algunas de estas enzimas, como las fosfatasas, es independiente de los niveles de fosfato, lo cual sugiere que la respuesta génica depende del genotipo de la planta (Szabo-Negy *et al.* 1992).

Proteínas como Alkaline-phosphatase-like family protein presentan expresión diferencial disminuída ( $\log_2FC=-3,4$ ) en tarwi sometido a estrés por sequía (Figura 20). Esta proteína corresponde a un grupo de glicoproteínas de membrana ubicuas que catalizan la hidrólisis de monoésteres de fosfato a pH básicos, de manera que estas enzimas tienen un rol potencial en la utilización de fosfomonoésteres como fuente de Pi requerido para el mantenimiento del metabolismo celular (Sharma *et al.* 2014). El metabolismo celular se reduce en condiciones de estrés, lo cual implica la disminución de los requerimientos metabólicos y podría estar relacionado con esta reducción observada en la expresión de esta y otras proteínas con actividad fosfatasa.

En contraste, la enzima Inorganic H pyrophosphatase family protein (H-PPasa) mostró sobreexpresión (Figura 20). Esta proteína es una bomba de protones electrogénica distribuída en la mayoría de plantas terrestres y en algunos otros organismos. Es capaz de realizar la hidrólisis de pirofosfato y transporte activo de protones (Maeshima 2000) y en diversos trabajos, se ha demostrado el aumento de sus niveles en respuesta a estrés. Por ejemplo, se ha observado incremento de PPasa en células de zanahoria con tratamientos de NaCl (Colombo y Cerana 1993). La actividad de esta enzima también se incrementa en arroz cultivado bajo condiciones de estrés por déficit de nutrientes como K, NO<sub>3</sub> y Ca (Kasai *et al.* 1998). Por otra parte, se ha observado incremento en la expresión de H-PPasa en plántulas de arroz sometidas a estrés por anoxia y frío (Carystinos *et al.* 1995). Los resultados, podrían indicar que la sobreexpresión de H-PPasa podría reemplazar la actividad de V-ATPasa. Esta bomba ATPasa mantiene la acidez de la vacuola con gasto de ATP; sin embargo, la disponibilidad de energía es reducida en condiciones de estrés, por lo cual su actividad podría ser realizada por la H-PPasa, sin gasto de energía, reduciendo los niveles de PPI y manteniendo los gradientes electroquímicos (Kajander *et al.* 2013). Por lo tanto, la sobreexpresión de estos cotransportadores protón/fosfato podría constituir un mecanismo de compensación en respuesta al estrés energético ocasionado por el déficit de P observado en estrés por sequía (Shenoy y Kalagudi 2005). En relación a su regulación, los cambios en la expresión y actividad de H-PPasa están regulados por los niveles de Ca o citoquininas (Kasai *et al.* 1998), lo cual será discutido en las secciones de Hormonas y Transducción de señal.

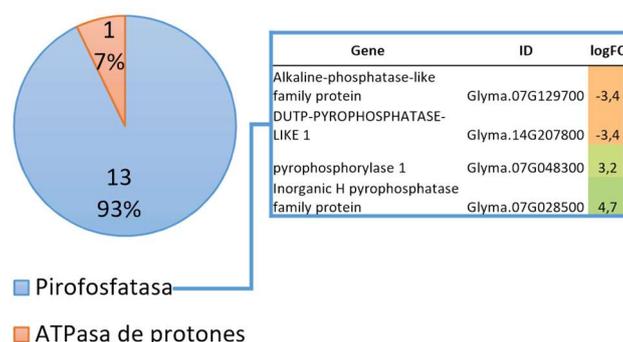


Figura 20. Genes regulatorios asociados a Hidrolasas Ácido Anhidrido en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### **b.3. Transducción de señal**

Las señales primarias del estrés son percibidas por receptores de función de señal, entre los que se encuentran los canales de membrana, bombas transportadoras o variaciones en la fluidez de membrana (Zhu 2016). Estas señales son transmitidas a nivel intracelular ocasionando estrés oxidativo, daño a los componentes celulares (lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos) y disfunción metabólica (Zhu 2016); sin embargo, algunos de los mecanismos activados en respuesta a estrés, modifican los patrones de expresión de genes de respuesta a estrés corriente abajo. Lo cual es especialmente importante en la adaptación a condiciones de estrés en genotipos tolerantes (Zhu 2002). El conjunto de mecanismos moleculares que conectan las vías de percepción a un factor de estrés con la respuesta celular al daño originado por este factor, se denomina transducción de señal (Huang *et al.* 2012). La transducción de señal en respuesta a estrés por sequía consiste en vías de señalización de homeostasis osmótica e iónica, vías de respuesta a detoxificación (por ejemplo, control y reparación del daño), vías para la regulación del crecimiento. Estas vías comprenden la producción de segundos mensajeros como Ca, derivados de fosfolípidos de membrana (IP<sub>3</sub>, PIP) y EROs, los cuales actúan a nivel intracelular sobre dianas específicas y actúan activando proteínas capaces de inducir la expresión génica corriente abajo (Zhu, 2002, Huang *et al.* 2012). Las enzimas relacionadas con la producción de estos segundos mensajeros y la transducción de señal, se encuentran expresadas de forma diferencial en tarwi sometido a sequía (Figura 21) y han sido agrupadas en kinasas (584 genes), fosfatasas (242 genes), calmodulinas (95 genes), proteínas G (17 genes) y calreticulinas (1 gen).

#### **b.3.1. Kinasas**

Las kinasas son enzimas que catalizan reacciones de fosforilación de proteínas diana. La fosforilación de proteínas es el tema central en la señalización intracelular y ha sido relacionada con la adaptación a estrés (Zhu 2002). Esto parece coincidir con los datos presentados en tarwi, puesto que los datos transcriptómicos muestran una gran cantidad de genes expresados de forma diferencial en condiciones de sequía (Figura 21). Se encontraron 584 transcritos de kinasas, de los cuales se observa sobreexpresión en 283 (48%) y represión en 301 (52%) (Anexo 15: Transducción de señal).

Entre las kinasas de proteínas reportadas en respuesta al estrés osmótico están las kinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), kinasas activadas por calcio, kinasas de proteínas serina-treonina, entre otros, las cuales actúan sobre residuos de histidina, serina/treonina y tirosina. Las cascadas de MAPK constituyen uno de los componentes de señalización celular más importantes en células eucariotas y se activan generalmente en respuesta a estrés hiperosmótico (Hirayama y Shinozaki 2010). Un número grande de MAPKs y MAPKKs y MAPKKKs han sido identificadas en diversas especies de plantas, las cuales funcionan en diversos procesos, generando redes complejas de interacción. Los niveles de transcriptos de muchas kinasas de proteínas, incluyendo miembros de la señalización MAPK se incrementan durante el estrés osmótico (Pandey 2015).

En el transcriptoma de tarwi en condiciones de sequía, se encontró expresión diferencial en las kinasas de proteínas similares a receptores con repeticiones ricas en leucina (leucine-rich repeat receptor-like protein kinase). Estas proteínas comprenden la familia más grande de kinasas receptoras en plantas, con más de 200 miembros en *Arabidopsis*. Se caracterizan por presentar tres dominios. El primero con un motivo extracelular de repeticiones rico en leucina (LRR). Este motivo está compuesto de secuencias ricas en leucina repetidas en tándem, que forma una lámina beta expuesta que media las interacciones proteína-proteína y determina la especificidad de la unión, por lo cual es capaz de percibir las señales (Xu *et al.* 2009). El segundo dominio es una región transmembrana que fija a la proteína en la membrana. Finalmente, el tercer dominio corresponde a un dominio kinasa citoplasmático capaz de autofosforilarse para activarse y que fosforila proteínas diana intracelulares que participan en diversos procesos (Shumayla *et al.* 2016). De esta manera, estas proteínas regulan una gran variedad de procesos de desarrollo y relacionados a la defensa, incluyendo proliferación celular, mantenimiento de células madre, percepción hormonal, respuesta de defensa específica de hospedero y no específica de hospedero, respuesta a heridas y simbiosis (Torii 2004). Dentro de este grupo, destaca la represión en el gen de Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, anotado como Glyma.01G118800 (LLRK; FC=-11.0) (Figura 21). Este gen codifica para una isomerasa de esteroides denominada 3-BETA-HYDROXYSTEROID-DELTA (8), DELTA (7)-ISOMERASE que realiza la unión de di-glucosas dentro del retículo endoplasmático. Esta reacción está comprendida dentro de la síntesis de esteroides, componentes esenciales de las membranas plasmáticas. Por lo cual, la disminución en la expresión de este gen podría estar relacionada con el daño a

nivel de membrana ocasionado por la acumulación de EROs (Kollist *et al.* 2019). Dentro de las LLRKs, también se observó otros transcriptos que mostraron represión, los cuales fueron anotados como Glyma.05G158800, Glyma.08G229100, Glyma.14G060400, Glyma.10G177300, Glyma.02G203600 (Figura 21). Dentro de estos, se puede destacar al gen Glyma.08G229100 del cromosoma 8 de soja. Este gen está comprendido en regiones genómicas asociadas a la tolerancia a salinidad en las bases de datos de Phytozome y Soybase, por lo que ha sido considerado como uno de los genes candidatos para proveer tolerancia a salinidad (Duc 2018). Por tanto, en tarwi, la represión de este gen ( $\log_{2}FC = -6,1$ ) puede estar relacionada con el incremento de toxicidad generado por la acumulación de iones que se presenta en estrés por sequía.

Otros transcriptos con expresión diferencial encontrados en tarwi sometido a sequía fueron los mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK; Figura 21). Estas proteínas pertenecen a la cascada de señalización de MAPK, conformada por más de 110 genes en *Arabidopsis* (Raja *et al.* 2017). Esta cascada comprende al menos tres kinasas de serina/tronina que actúan secuencialmente, una kinasa de kinasa de kinasas MAP, una kinasa de kinasas MAP y una kinasa MAP, cada una de las cuales fosforila y activa la siguiente kinasa en la cascada de señalización (Jagodzik *et al.* 2018). Una vez activas, las MAPKs fosforilan diversas proteínas efectoras en residuos de serina/treonina, activándolas en el citoplasma o núcleo. Entre las proteínas activadas incluyendo otras kinasas, enzimas, proteínas del citoesqueleto o factores de transcripción (Rodriguez *et al.* 2010). Es notoria la relación de esta cascada de señalización con las vías de señalización hormonal de auxinas, etileno, ácido salicílico, ácido jasmónico, brasinoesteroides y ABA. Dentro de este grupo, destaca la sobreexpresión de dos transcriptos de MAPKKK5: Glyma.01G184000 y Glyma.11G058300 ( $\log_{2}FC = 4,2$  y  $\log_{2}FC = 5,1$  respectivamente; Figura 21). Este gen ha sido reportado como un gen regulado a nivel transcripcional por ABA (Menges *et al.* 2008). En tanto que MAPKKK14, un gen reprimido ( $\log_{2}FC = -7,0$ ) ha sido reportado como un gen de señalización dependiente de ABA (Sah *et al.* 2016), relacionado con el eflujo de Ca, que aparece como un candidato para la característica de senescencia retrasada (stay-green) en maíz (Renaud, 2015). La expresión diferencial de estos genes de la cascada MAPK en tarwi sometido a sequía, parece estar relacionada con la variación transcripcional observada en los genes de la vía dependiente de ABA (Figura 21, Sección Hormonas).

Otras proteínas con función kinasa de receptores son las comprendidas dentro de las kinasas receptores serina/treonina (RSTK). Estas proteínas fosforilan residuos de serina y treonina, interactúan con otras proteínas para ejercer un amplio rango de procesos que incluyen la resistencia a enfermedades y la regulación del desarrollo, al reconocimiento de células propias (Afzal *et al.* 2008). Las kinasas de proteínas con receptores de lectina tipo G (G-LecRKs) son proteínas con un dominio extracelular similar al motivo de unión a manosa de la aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA). Este grupo comprende 32 miembros en *Arabidopsis*, 100 en arroz y 177 en trigo (Teikeira *et al.* 2018). Un miembro de este grupo ha sido encontrado en el transcriptoma de tarwi sometido a estrés por sequía presentado. Tal como se muestra en la Figura 21, el gen G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase tiene una sobreexpresión elevada en condiciones de sequía (logFC=8,8). Este hallazgo es importante dado el trabajo de Sun *et al.* (2013), quien sostiene que este gen es importante en la transducción de señal en respuesta a estrés. En soja, la proteína GsSRK, perteneciente al grupo de G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase ha demostrado ser un regulador positivo de la tolerancia a estrés por salinidad (Sun *et al.* 2013). El estudio de expresión en plántulas de soja sometidas a estrés por salinidad y sequía, demostró que los transcritos de GsSRK se incrementan en hojas y raíces luego del estrés. Lo cual indica que este gen puede estar involucrado en la transducción de señal por estrés osmótico, por salinidad y sequía. En tanto que la sobreexpresión de GsSRK en *Arabidopsis* resultó en un incremento en la tolerancia a estrés por salinidad en diferentes etapas de desarrollo, así como mayor rendimiento de semillas bajo condiciones de estrés salino. Lo cual proporciona evidencia de que este gen es una kinasa de proteínas putativa y cumple un rol importante en las respuestas vegetales a salinidad (Sun *et al.* 2013).

### **b.3.2. Fosfatasa**

La fosforilación es un mecanismo regulatorio que constituye la forma principal para controlar la función de una proteína, regulando la mayoría de los procesos biológicos y operando en todos los seres vivos. Este proceso es regulado por las enzimas que fosforilan (kinasas) y defosforilan (fosfatasas) las proteínas diana (Uhrig *et al.* 2013). En plantas, el estrés activa primero la vía de MAPK a través de la fosforilación de proteínas para la fase de adaptación, y luego, las proteínas fosforiladas son defosforiladas por fosfatasas de proteínas (PP) cuando el estímulo ha sido captado (Liu *et al.* 2009). Otra ruta para la activación de la vía de transducción relacionada con fosfatasas está relacionada con el

estrés oxidativo observado en condiciones de estrés por sequía. La peroxidación de lípidos de membrana puede llevar a la disminución de insaturación y fluidez de membrana (Sun *et al.* 2010), lo cual puede causar destrucción de la integridad celular, y activación de las fosfolipasas activadas por EROs (Wang *et al.* 1989). De cualquier forma, la acción de PPs está involucrada en la transducción de señal de ABA bajo sequía y estrés salino en *Arabidopsis*, arroz, tabaco y *Fagus sylvatica* (Li *et al.* 2008). La regulación de estos genes en condiciones de sequía es observada también en tarwi, al encontrarse 257 transcriptos expresados de forma diferencial (Figura 21). De estos, 112 (44%) mostraron sobreexpresión, en tanto que 145 mostraron expresión disminuída (Anexo 15: Transducción de señal)

La clasificación de estas enzimas en plantas superiores según la presencia de diferentes residuos de aminoácidos en sus centros activos, ha demostrado la presencia de dos grupos: fosfatasas de serina/treonina, y fosfatasas de tirosina. Otra clasificación basada en la especificidad de sustrato y la sensibilidad a inhibidores específicos, ha mostrado la presencia de cuatro grupos: PP1, PP2A, PP2B o PP2C (Luan 2003). Por último, según el pH óptimo necesario para su actividad catalítica, las fosfatasas son clasificadas como alcalinas o ácidas, las cuales hidrolizan grupos fosfatidil en ácidos grasos libres y fósforo soluble en las células vegetales (Barret-Lannard *et al.* 1982). A este último grupo pertenece el transcripto Inorganic H pyrophosphatase family protein, el cual fue sobreexpresado en condiciones de estrés por sequía en tarwi (logFC=4,7; Figura 21). Este gen actúa en condiciones de estrés salino y por sequía, al mantener un nivel de fosfato inorgánico que puede ser cotransportado con protones (H<sup>+</sup>) junto a una fuerza protón-motriz (Olmos y Hellin 1997). La actividad y expresión de fosfatasas ácidas se incrementa en condiciones de estrés por sequía y por salinidad, tal como se ha demostrado en células de tallos, hojas y raíces de *Medicago sativa*. Observándose diferencias entre la actividad de esta enzima en dos genotipos, lo cual sugiere que la actividad de fosfatasa ácida es genotipo-dependiente (Ehsanpour y Amini 2003). Otro estudio reveló el incremento de la actividad de fosfatasa ácida, permeabilidad de membrana y malondialdehído en *Chenopodium album* sometido a estrés por sequía; sin embargo, al someter las plantas a estrés por sequía severo, los sistemas metabólicos fueron afectados y la actividad de la enzima disminuyó, presumiblemente porque al ser una enzima contenida dentro de las membranas celulares, la fosfatasa ácida fue inactivada cuando las membranas celulares sufrieron más daño (Sun *et al.* 2010).

Otra de las familias de fosfatasa con relevancia por su rol durante el estrés es la familia PP2C. Al realizar la defosforilación, las fosfatasa PP2C revierten los cambios inducidos por las cascadas de kinasas de proteínas específicas (Yang *et al.* 2004). Esta acción se logra con la unión conjunta de PP2Cs con otras fosfatasa (PTPs, DSPTPs y PP2As) en la defosforilación e inactivación de componentes clave de las cascadas de transducción de señal, incluyendo RLKs, así como las cascadas MAPK (Schweighofer *et al.* 2004; Takezawa, 2003). Las proteínas PP2C también han sido involucradas en las rutas de señalización activadas por estrés, incluyendo sequía, salinidad, frío, y por hormonas vegetales, como ABA y ácido giberélico, así como sus interconexiones (Chen *et al.* 2017; Xiong *et al.* 2002). Las PP2C constituyen una de las cuatro fosfatasa de serina/treonina presente en procariotas y eucariotas. Pertenece a una familia de proteínas codificada por diferentes genes en especies vegetales (Kerk *et al.* 2002). Se han reportado 76 miembros de esta familia en *Arabidopsis* y 94 en *Medicago truncatula*, lo cual hace de este grupo, la familia de fosfatasa de proteínas más grande en plantas superiores (Schweighofer *et al.* 2004; Yang *et al.* 2018). En el análisis de expresión en tarwi, se encontró expresión diferencial en 29 genes (Anexo 15: Transducción de señal). Dentro de estos datos, destaca la fosfatasa Protein phosphatase 2C family protein anotada como (Glyma.20G238100), que mostró represión en tarwi sometido a sequía (FC=-7,8; Figura 21). Esta expresión diferencial parece ser relevante en la respuesta a estrés en tarwi, tal como se ha demostrado en otras especies. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la transducción de señal por ABA es regulada de forma negativa por PP2C, incluyendo ABI1, ABI2, HAB1, AtPP2CA y RAB18 (Kuhn *et al.* 2006). Además, la sobreexpresión de ZmPP2C aumentó los daños causados por estrés salino y por sequía, lo cual sugiere que ZmPP2C actúa como un regulador negativo en las vías de señalización de respuesta adaptativa inducida por sequía, para proteger a las plantas del daño (Liu *et al.* 2008). En tanto que en *Sporobolus stapfianus*, denominado gras de la resurrección, la expresión de PP2C fue downregulada bajo estrés por sequía severa (Neale *et al.* 2000). Por último, la downregulación del transcripto ZmPP2C se observó en las tres líneas de maíz tolerantes a sequía, mientras los niveles de transcriptos fueron upregulados en las dos líneas sensibles a estrés por sequía (Li *et al.* 2008). Estos hallazgos señalan que la represión de esta enzima podría estar relacionada con la tolerancia a sequía observada en esta accesión de tarwi; sin embargo, se debe tener en cuenta que la expresión diferencial de PP2C, depende los órganos y de la tolerancia a estrés presente en el material evaluado. Esto se ha visto en *Medicago*

*truncatula*, en la cual se ha encontrado diferentes patrones de expresión en los genes PP2C, en respuesta a estrés por sequía, frío y ABA (Yang *et al.* 2018).

Un miembro de la familia de fosfatasa de proteínas serina/treonina inducida en respuesta a estrés en tarwi es el gen serine/threonine-protein phosphatase 7 long form homolog (PP7) (XP\_019433587), el cual mostró sobreexpresión ( $\log_{2}FC=5,7$ ; Figura 21). Este gen pertenece a la subfamilia de proteínas fosfatasas PP7, la cual es única para plantas y el dominio difiere de los otros miembros de la familia PPP al carecer de dominios de mano de factor de elongación (EF), dominios de extensión en las regiones C y N terminales, y presentar regiones cargadas de longitud variable dentro del dominio catalítico (Uhrig *et al.* 2013; Andreeva y Kutuzov 2009). Al tener una señal de localización terminal C-terminal, presentan ubicación nuclear constitutiva (Andreeva y Kutuzov 2001). La actividad de esta enzima parece estar influenciada por los niveles de Ca, dado que la región de inserción catalítica ha mostrado ser capaz de unirse a la calmodulina *in vitro*, de una forma dependiente de Ca (Kutuzov y Andreeva, 2001). La subfamilia de fosfatasas PP7 ha sido implicada en diversas funciones sensoriales, en particular, la percepción de luz a través de la regulación del criptocromo y fitocromo (Miller *et al.* 2003). Además, esta percepción de luz parece estar relacionada con el control de la apertura de estomas mediante la señalización de luz azul por criptocromo y la defosforilación de una proteína con motivos dedos de zinc denominada HYPERSENSITIVE TO RED AND BLUE 1-HRB1 (Sun *et al.* 2012). Así mismo, la expresión de MAIL1, una proteína con dominio PP7, ha demostrado la importancia de estas fosfatasas en el crecimiento y diferenciación (Uhlken *et al.* 2014). Un mutante de *Arabidopsis* con pérdida de esta función desarrolló raíces primarias cortas, en las cuales las células meristemáticas acumularon rupturas de doble cadena en el ADN y sufrieron muerte celular masiva. Adicionalmente, los mutantes para este gen mostraron defectos en la diferenciación en tejidos de la raíz y los brotes, desarrollando estructuras similares a callos, desorganizadas (Uhlken *et al.* 2014). Por último, se ha demostrado que PP7 es capaz de interactuar con calmodulina (CaM) en la señalización de termotolerancia en plantas (Liu *et al.* 2007). Las líneas knockout de *Arabidopsis* para AtPP7 mostraron disminución en la termotolerancia. En tanto que las líneas con sobreexpresión de este gen, mostraron incrementada termotolerancia. Adicionalmente, se ha observado que AtPP7 puede interactuar con un factor de transcripción HSF, lo cual sugiere que AtPP7 regula la expresión de los genes HSP (Liu *et al.* 2007). Estos hallazgos son de importancia, puesto que sugieren una relación entre

la sobreexpresión de PP7 y las variaciones en la apertura estomática, en la transducción de señal y crecimiento reportadas en condiciones de sequía en todas las plantas (Aroca 2012).

La represión observada en Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) ( $\log_{2}FC = -4,7$ ; Figura 21) podría estar relacionada con la disminución de P observada en condiciones de sequía en la parte aérea de tarwi (Figura 9B). En arroz, se ha observado que las líneas que sobreexpresan este gen OsHAD1, una proteína con actividad fosfatasa y fitasa, defosforilan fósforo orgánico celular. De esta manera y en conjunto con la acción de kinasas, regulan el estado de fosforilación de dianas downstream, para lograr la homeostasis de Pi en condiciones de Pi limitante. Es decir, esta enzima está relacionada con la acumulación de fosfato en condiciones de estrés (Pandey *et al.* 2017).

Otro de los hallazgos destacables fue la expresión diferencial de ATPasa caseinolítica (ATPasa Clp; Figura 21). Esta proteína pertenece a una familia cuyos miembros forman grandes estructuras de anillo hexaméricas en un proceso dependiente de ATP (Snider *et al.* 2008). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de AAA+, con dos dominios AAA que actúan en el ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos (Frickey y Lupas, 2004). Además, las ATPasas Clps se consideran componentes de máquinas moleculares, trabajando en un número de procesos celulares diversos ligados su actividad fosfatasa (Hoskins *et al.* 2001). Estas proteínas pueden acoplar la energía producida en la degradación del ATP con el desplegamiento de proteínas, mediante reacciones que involucran desensamblaje de complejos y agregados proteicos (Hoskins *et al.* 2001). De esta forma, participan en la señalización para el control citosólico de proteínas dañadas, lo cual comprende su participación y probablemente actúan como punto de control de calidad de proteínas nuevamente importadas (Wu *et al.* 2019). Por otra parte, las ATPasa Clp han sido relacionadas con otros procesos como la replicación de ADN, la tolerancia a estrés por calor, el control de la expresión génica, la degradación de proteínas e incluso la herencia de factores similares a priones (Hoskins *et al.* 2001); sin embargo, en condiciones de estrés, su acción al desplegar y replegar proteínas parece ser más relevante al permitir su acción como chaperonas (Muthusamy *et al.* 2016; Hoskins *et al.* 2001). En condiciones de estrés, las ATPasas Clp minimizan la agregación de proteínas con su actividad chaperona (Snider *et al.* 2008). Además, su subunidad proteolítica ClpP tiene como dianas a proteínas dañadas a las cuales degrada (Shikanai 2001). Estos mecanismos

permiten mantener la calidad de las proteínas celulares, lo cual incrementa la tolerancia de las plantas durante condiciones de estrés (Muthusamy *et al.* 2016). De hecho, la expresión de muchos miembros de esta familia de proteínas varía en respuesta a diferentes factores de estrés. Por ejemplo, la proteína inducida por salinidad AtClpD, confiere tolerancia a sequía en *Arabidopsis* (Tran *et al.* 2004). Además, estudios de expresión en trigo han demostrado que los genes Clp clase I, se expresan de forma diferencial por diversos factores de estrés. De entre estos factores, el estrés por sequía induce la sobreexpresión de TaClpD1 (Muthusamy *et al.* 2016). Estos resultados parecen sustentar el hecho de que el transcripto de ATPasa Clp correspondiente a (Glyma.04G203300) haya mostrado una expresión diferencial elevada ( $\log_{2}FC=7,1$ ; Figura 21) en respuesta a condiciones de sequía en la accesión P03, tolerante a sequía.

### **b.3.3. Calmodulina**

El Ca es uno de los elementos más abundantes en la tierra; sin embargo, los altos niveles de Ca citosólico son tóxicos para las células, pues favorecen la formación de compuestos insolubles derivados de fosfatos y complejos con macromoléculas. Por esta razón la concentración de Ca fuera de la membrana es usualmente en un nivel milimolar. En contraste, la concentración de Ca en el citoplasma y el núcleo se mantienen bajas en condiciones basales (Zeng *et al.* 2015). A nivel de membrana, los gradientes de Ca están involucrados en los procesos de señalización celular y controlados por diversas proteínas, como canales de respuesta a estímulos de Ca, bombas de Ca, e intercambiadores de Ca/H (Kudla *et al.* 2010). A nivel intracelular, el Ca actúa en la transducción de señal de células eucariotas. Los estímulos externos son percibidos por sensores a nivel de membrana o citosólicos, que activan una cascada de señalización que libera en el citoplasma Ca proveniente del retículo endoplásmico liso, o del medio extracelular (Reddy *et al.* 2011; Tang *et al.* 2017). Luego, el Ca actúa como un segundo mensajero al unirse a sensores de unión al Ca e inducir cambios conformacionales, que promueven una interacción con efectores o modulan su propia actividad catalítica (Tang *et al.* 2017). En vegetales, se han identificado diversas proteínas de unión a Ca, entre los cuales se encuentran las calmodulinas (CaM). El análisis funcional de estas proteínas indica que cumplen roles importantes en el desarrollo vegetal y la respuesta a diversos factores abióticos, incluyendo salinidad, temperatura, luz y estrés osmótico (Reddy *et al.* 2011). De hecho, en el transcriptoma de tarwi sometido a sequía reportado, se observan 113 genes expresados diferencialmente (Figura 21). De este total, 60 genes (53%) se encuentran

sobreexpresados, mientras que 53 (47%) estuvieron reprimidos (Anexo 15: Transducción de señal), lo cual resalta la importancia de estas proteínas en condiciones de estrés por sequía.

Las proteínas calmodulina (CaM) y similares a calmodulina (CMLs) son un grupo de proteínas de unión al Ca, presente en todos los eucariotas. Se trata de proteínas pequeñas, ácidas, con dos dominios manos EF ubicados en los extremos N y C (Du *et al.* 2011). Las CaM y CMLs actúan como sensores de Ca al unirse a este metal. Una vez que están cargadas con Ca, interactúan y regulan un amplio espectro de proteínas diana, como canales, bombas y transportadores para diferentes iones, factores de transcripción, quinasas de proteínas, fosfatasa de proteínas, enzimas metabólicas y proteínas con funciones biológicas desconocidas (Zeng *et al.* 2015). En *Arabidopsis*, se encuentran 7 genes de CaM (CaM1/4; CaM2/3/5; CaM6; CaM7), los cuales se diferencian en 1-5 aminoácidos (McCormack *et al.* 2005). En *Arabidopsis*, arroz, *Solanum lycopersicum*, *Populus tremula*, entre otros, se ha encontrado que estas proteínas, así como sus elementos cis y expresión diferencial cumplen un rol en respuesta a estrés osmótico y por salinidad (Zeng *et al.* 2015; Tang *et al.* 2017).

En tarwi, el transcripto IQ-domain 26 mostró represión en respuesta a sequía (logFC=-7,9; Figura 21). Este transcripto codifica una proteína con un motivo isoleucina glutamina (IQ), que interactúa con calmodulina (Fischer *et al.* 2013). Los motivos IQ aparecen en repeticiones en tándem para unir múltiples moléculas de calmodulina con mayor afinidad en la ausencia de Ca (Li y Sacks 2003). Estas proteínas cumplen una gran variedad de funciones biológicas (Bahler y Rhoads 2002). Entre estas funciones se cuentan la unión a microtúbulos, la señalización de auxinas en el desarrollo y crecimiento (Burstenbinder *et al.* 2017); sin embargo, las funciones de los dominios IQ no han sido investigadas al detalle en plantas (Fischer *et al.* 2013).

Otro gen con un nivel de expresión diferencial saltante es calmodulin-like 38 (CML38). Los transcriptos de este gen fueron altamente sobreexpresados (logFC=7,7; Figura 21). Esta proteína es un sensor de Ca con dominios manos EF (Ogunrinde *et al.* 2017). Además, actúa como un regulador de silenciamiento génico de proteínas parecidas a calmodulina por interacción con nucleoproteínas ARN mensajeras (mRNPs). Su nivel de expresión se ha visto incrementado más de 300 veces en plántulas de *Arabidopsis*

sometidas a hipoxia (Lokdarshi *et al.* 2016). Además, se ha estudiado su rol en los procesos de desarrollo y vías de respuesta a estrés por salinidad, sequía y ABA en *Arabidopsis*. Observándose que el tratamiento con sequía incrementó la expresión de este transcrito en el ápice caulinar, hipocótilo y en la raíz. De manera notoria, este incremento se mantuvo elevado incluso a las 24 horas de tratamiento (Vanderbeld y Snedden 2007), lo cual señala que esta proteína participa de forma activa en las vías de señalización en respuesta a sequía severa en plantas.

### **b.3.4. Proteína G**

Las señales producidas por estrés abiótico son percibidas por sensores osmóticos o receptores asociados a proteínas G (GPCRs) presentes en la membrana celular. Lo cual lleva a la activación de la proteína G (disociación del dímero de G-alfa y G-beta) y regulando efectores corriente abajo (Tuteja y Sopory 2008). Existen dos tipos de proteínas G, monoméricas y heterotriméricas. Estas últimas están conformadas por 3 proteínas: G-alfa, G-beta y G-gama (Jones y Assmann, 2004), las cuales tras ser activadas por fosforilación/defosforilación del GTP, activan proteínas de respuesta, iniciando procesos de señalización intracelular (Trusov y Botella, 2016). En plantas, las proteínas G han sido involucradas en procesos como defensa, desarrollo morfológico, proliferación celular, regulación de canales iónicos, control de estomas, percepción de luz, desarrollo temprano y respuesta a fitohormonas incluyendo ABA (Tuteja y Sopory 2008; Trusov y Botella 2016). Los datos presentados en tarwi sostienen el hecho de que la transducción de señal por proteínas G es esencial. En esta especie (Figura 21), se encontró expresión diferencial en 26 genes relacionados con la señalización por proteínas G. De estos, hubo 10 genes reprimidos (38%) y 16 sobreexpresados (62%).

Entre los transcritos reportados, destaca la represión del gen de Transducin family protein / WD-40 repeat family protein se encontró reprimido ( $\log_{2}FC = -5,7$ ). Esta proteína parece estar involucrada en la interconexión entre vías de señalización por factores de transcripción y la disminución de la división celular en respuesta a estrés (Fu *et al.* 2014; Greb *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2014). La proteína codificada por WD-40 repeat family protein presenta dominios esenciales para la interacción proteína-proteína en dos genes relacionados a la señalización de estrés. El primero denominado RELATED TO ABI3/VP1 (RAV1), un factor de transcripción de la familia AP2/ERF que se sobreexpresa en respuesta a bajas temperaturas y son reguladores negativos del crecimiento y estrés

abiótico, sequía y salinidad (Fu *et al.* 2014). En tanto que el segundo es VERNALIZATION 5 (VRN5), una proteína involucrada en el silenciamiento génico en *Arabidopsis* durante vernalización (Greb *et al.* 2007). Además, se ha demostrado que un dominio WD40 en el gen STENOFOLIA (STF) de *Medicago truncatula* tiene un rol clave en crecimiento foliar y la proliferación celular en la unión axial-abaxial (Zhang *et al.* 2014). Las plantas con versiones mutantes de este gen, muestran una reducción dramática en el ancho de la hoja, debido a la reducción en la proliferación celular en dirección lateral (Nakata *et al.* 2012).

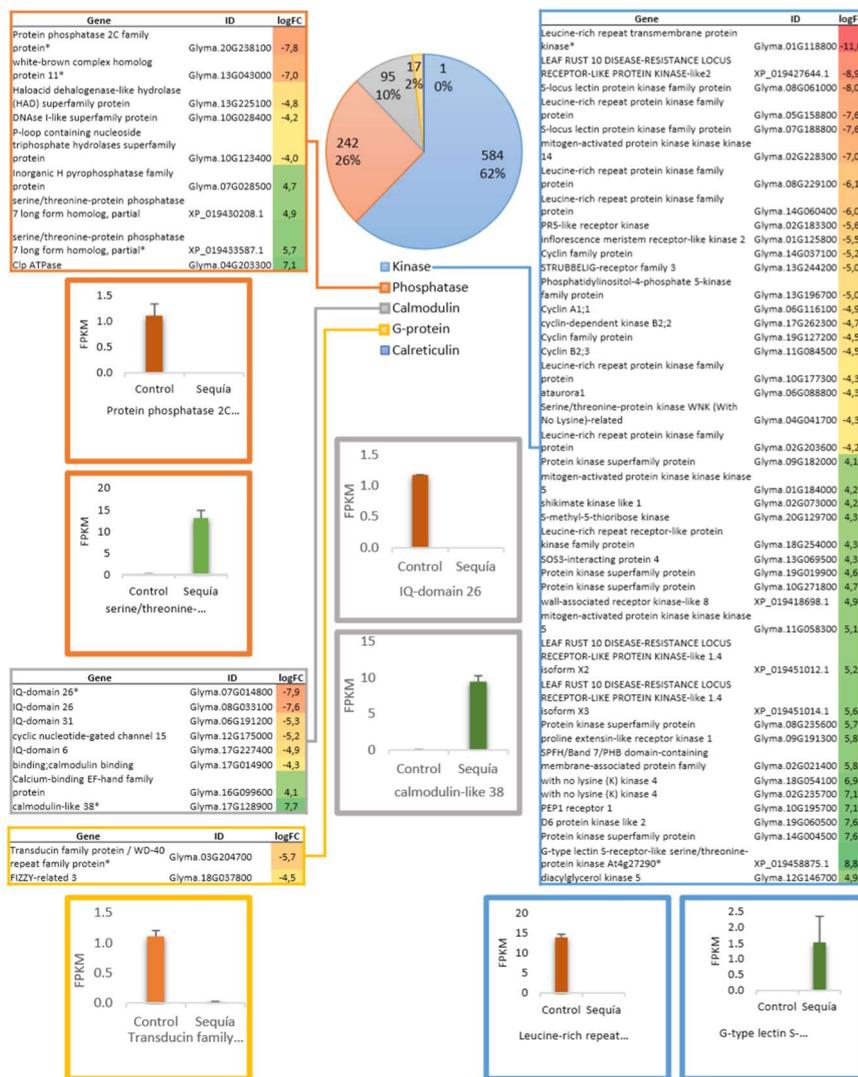


Figura 21. Genes regulatorios asociados a Transducción de Señal en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

#### **b.4. Factores de transcripción**

Los factores de transcripción actúan como reguladores maestros de procesos celulares, por lo cual, son excelentes candidatos para modificar características complejas en plantas cultivadas. De manera que las tecnologías basadas en factores de transcripción serán muy probablemente parte de la siguiente generación de cultivos biotecnológicos exitosos (Ambawat *et al.* 2013). Estos factores de transcripción se agrupan en diferentes familias, capaces de regular numerosos genes funcionales de respuesta a estrés. La clasificación de los transcritos correspondientes a factores de transcripción se detalla en la Figura 22. Los transcritos se agrupan en las siguientes familias: bHLH (39 transcritos), WRKY (37 transcritos), myb (28 transcritos), NAC (27 transcritos), ERF/AP2 (24 transcritos) y Otros (175 transcritos). El número elevado de factores de transcripción observado en tarwi sometido a estrés hídrico, coincide con lo reportado para otras especies, como *Arabidopsis* o soja. En estas especies, se ha observado variación en su expresión, lo cual sugiere su importancia en la regulación génica (Castilhos *et al.* 2014). A tal punto que han sido utilizados en transformación para generar líneas con tolerancia a estrés (Hussain *et al.* 2011, Ashraf 2010).

##### **b.4.1. Familia bHLH**

Las proteínas basic helix-loop-helix (bHLH) constituyen una gran familia de factores de transcripción conservados presentes en organismos eucariotas que están involucrados en una gran variedad de procesos regulatorios. Estas proteínas forman un grupo monofilético que constituye la familia génica más grande de factores de transcripción en plantas. En *Arabidopsis*, por ejemplo, esta familia incluye 225 genes, mientras en arroz, 211 genes (Ji *et al.* 2014). Estos factores de transcripción presentan dominios que facilitan la interacción entre proteínas, permitiendo la formación de complejos de homodímeros y heterodímeros (Carretero *et al.* 2010). Además, están involucrados en procesos de desarrollo, percepción de luz, homeostasis de hierro y fósforo y las vías de señalización de fitohormonas (Osorio *et al.* 2012). Además, han sido involucrados en la respuesta a estrés por sequía (Castilhos *et al.* 2014). En este sentido, los bHLH pueden activar genes de respuesta a Deseccación (RD). En *Arabidopsis*, los genes RD actúan en la vía de transducción de señalización a estrés al contener elementos ABRE y DRE, por lo cual están involucrados en la respuesta dependiente e independiente de ABA (Castilhos *et al.* 2014). Además, algunos miembros de la familia bHLHs son esenciales para la regulación

de la respuesta a ácido jasmónico JA (Fernandez-Calvo *et al.* 2011). En tanto, en tarwi, se han encontrado 39 transcritos correspondientes a esta familia (Figura 22) de los cuales 22 mostraron represión (56%), en tanto que se encontró 17 (44%) sobreexpresados (Anexo 16: Factores de transcripción).

De entre los transcritos observados, destaca la disminución en la expresión de 7 transcritos. Entre los cuales está bHLH63 ( $\log_{2}FC = -7.6$ ; Figura 22), que corresponde al homólogo de una proteína de respuesta a estrés por salinidad en arroz, o café (Haile y Kang, 2018). En maíz, un gen de la familia bHLH (PTF) se ha asociado con la síntesis de ABA, mientras que en tomate, se ha observado que las líneas que sobreexpresan bHLHs, pueden incrementar de forma significativa los niveles de ABA, mejorando la tolerancia al estrés por sequía y salinidad (Li *et al.* 2019; Chen *et al.* 2016; Waseem *et al.* 2019). Por lo tanto, la represión de estos genes podría indicar la disminución de la vía dependiente de ABA en esta accesión de tarwi. Estos hallazgos serán discutidos en la sección Hormonas.

#### **b.4.2. Familia WRKY**

Los factores de transcripción WRKY (tryptophan, W; arginine, R; lysine, K; tyrosine, Y) tienen motivos de dedos de Zinc, y son activos en la señalización hormonal (Melrose *et al.* 2015). Además, presentan funciones regulatorias clave en la defensa vegetal contra salinidad, daño mecánico, sequía, frío, plagas y enfermedades, así como en el desarrollo de semillas, tricomas y en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Melrose *et al.* 2015). El metaanálisis de los genes WRKY ha demostrado su rol esencial en las respuestas de las plantas a estrés por sequía (Guo *et al.* 2019). Por esta razón, estos factores de transcripción han sido empleados para el desarrollo de marcadores moleculares para escanear la diversidad genética para genes de resistencia a estrés en cacao (Borrone *et al.* 2004). Mientras, en soja, se han encontrado 188 miembros de esta familia activados en diversas condiciones de estrés (Yu *et al.* 2016). Por lo cual, la sobreexpresión de estos factores puede estar relacionada con la respuesta a estrés biótico o abiótico en las vías de señalización dependientes de ABA (Finatto *et al.* 2018). En el transcriptoma de tarwi presentado, se reportan 37 miembros de esta familia expresados de forma diferencial (Figura 22), de los cuales 35 genes (94%) mostraron sobreexpresión (Anexo 16: Factores de transcripción).

En particular, la sobreexpresión del transcripto anotado como Glyma.19G221700 sobreexpresado en condiciones de estrés por sequía en tarwi (Figura 22), es de importancia, puesto que el promotor de este factor de transcripción ha sido utilizado para evaluar la resistencia de soja a *Phytophthora sojae* (Stasko 2018). Este factor de transcripción también se ha encontrado sobreexpresado en soja inoculada con el mildiú de la soja *Peronospora manshurica* (Dong *et al.* 2018).

#### **b.4.3. Familia MYB**

Los factores de transcripción correspondientes a la familia MYB constituyen un gran y funcionalmente diverso grupo de proteínas presentes en todos los eucariotas que presentan repeticiones variables del dominio MYB (Myeloblastosis) (Ambawat *et al.* 2013). Estos dominios les permiten unirse al ADN y están relacionados con el control del ciclo celular, entre otros procesos (Baldoni *et al.* 2015). En plantas, la mayoría de proteínas MYB pertenecen a la subfamilia R2R3, cuyos miembros presentan 2 repeticiones, con más de 100 miembros descritos (Dubos *et al.* 2010). La expresión de muchos genes MYB está regulada por la sequía. Por ejemplo, en arroz se reportó que el 65% de los genes expresados en plántulas fueron expresados de forma diferencial bajo estrés por sequía. Mientras que en el estudio transcriptómico de *Arabidopsis*, el 51% de los genes MYB están sobreexpresados, en tanto que el 41% son reprimidos (Baldoni *et al.* 2015). En los datos de tarwi reportados en el presente análisis transcriptómico, se encontraron 28 genes de la familia MYB (Figura 22), entre los que se observó represión en 8 genes (29%), mientras que 20 genes (71%) mostraron sobreexpresión (Anexo 16: Factores de transcripción). Estos genes MYB podrían interactuar con la expresión génica inducida por ABA (Abe *et al.* 1997).

En el transcriptoma de tarwi presentado, la proteína MYB con mayor sobreexpresión fue myb domain protein 62 (Figura 22). Esta proteína está involucrada en la regulación de respuestas a estrés por déficit de fósforo y biosíntesis de ácido giberélico (Devaiah *et al.* 2009; Ballachanda *et al.* 2009), lo cual sustenta la disminución de P observada en la parte aérea cuando se sometió las plantas de tarwi a sequía (Figura 9B Contenido de elementos en la parte aérea). Por esta razón, su expresión puede estar influenciada por el déficit nutricional causado por el estrés hídrico. En efecto, tal como se discutió en la sección correspondiente a Sequía en etapa vegetativa-Contenido de elementos en la parte aérea, existe disminución de P en la evaluación de elementos en la parte aérea, en las plantas

sometidas a estrés por sequía. Esta disminución, afecta a las rutas bioenergéticas y elementos como los ácidos nucleicos y las membranas celulares (Palta 2000; Hu y Schmidhaller 2001), por lo cual, su disminución, es capaz de activar la expresión de rutas metabólicas que permiten a esta accesión de tarwi sobrellevar las condiciones de estrés impuestas.

Por otra parte, uno de los miembros MYB mostrados presentó disminución en su expresión diferencial. Tal es el caso del transcripto *myb domain protein 12* (Figura 22), que mostró represión en condiciones de sequía en tarwi. Los MYB12 han sido relacionados con la síntesis de flavonoles, una familia de compuestos fenólicos que incluyen pigmentos antocianinas, proantocianidinas y flobafenos, así como las familias de flavonol, flavonas e isoflavonas (Lepiniec *et al.* 2006). Los flavonoides actúan como pigmentos, moléculas señalizadoras, agentes protectores contra estrés biótico y abiótico y como reguladores de fertilidad y biosíntesis de auxinas (Santelia *et al.* 2008). En *Arabidopsis*, se ha estudiado la influencia de estos factores de transcripción MYB12 junto con MYB11 y MBY111 en la acumulación de derivados de flavonoles en hojas, tallos, inflorescencias y raíces (Strackle *et al.* 2010), lo cual podría tener implicancias en la tolerancia al estrés.

#### **b.4.4. Familia NAC**

Los factores de transcripción NAC se caracterizan por presentar un dominio NAC con dominios provenientes de tres proteínas (NAM de petunia, y ATAF1/2 y CUC2 de *Arabidopsis*), el cual es capaz de unirse al ADN y formar homodímeros y heterodímeros (Shao *et al.* 2015). Estos factores de transcripción tienen roles vitales en la regulación del crecimiento vegetal y procesos de desarrollo, que incluyen las respuestas a estrés biótico y abiótico (Nuruzzaman *et al.* 2013). Estos roles diversos son regulados por el gran número de proteínas NAC presentes en vegetales. Se han identificado 117 miembros de esta familia en *Arabidopsis* y 153 en soja (Le *et al.* 2011). El análisis de expresión de estos factores de transcripción ha demostrado su importancia en la regulación de la reprogramación transcripcional asociada con el estrés abiótico. Por esta razón, los factores de transcripción de respuesta a NAC han sido usados para mejorar la tolerancia a estrés en las plantas cultivadas por ingeniería genética (Shao *et al.* 2015). En el presente trabajo, se reportan 27 genes NAC expresados de forma diferencial en tarwi sometido a sequía (Figura 22). De estos, 20 genes (74%) mostraron sobreexpresión, lo cual señala que la

activación transcripcional de estos factores de transcripción en tarwi, podría estar relacionada con la tolerancia a sequía mostrada por la accesión evaluada.

Uno de los factores de transcripción con más elevada sobreexpresión a nivel transcriptómico fue NAC domain containing protein 25 (Figura 22). Este transcripto está involucrado en el desarrollo de fruto en *Pyrus pyrifolia* (Jiang *et al.* 2018). Además, se ha visto sobreexpresado en condiciones de sequía en soja, incrementando la resistencia a este factor de estrés durante la etapa reproductiva (Xu *et al.* 2018). Además, se han observado cambios epigenéticos en el locus NAC25 en un estudio de la evaluación de memoria epigenética por modificaciones de la cromatina (por cambios en H3K4me3 o H3K9ac) en maíz sometido a condiciones de sequía (Forestan *et al.* 2020).

Otros de los factores de transcripción sobreexpresado es NAC domain containing protein 100 (Figura 22), una proteína que está relacionada con estrés. La represión de este transcripto se ha observado en plántulas de tabaco sometidas a estrés por déficit de potasio (Lu *et al.* 2015). Por lo cual, su sobreexpresión podría estar asociada con el incremento de K observado en tarwi sometido a condiciones de sequía (Figura 9B Contenido de elementos en la parte aérea). Por otra parte, la sobreexpresión de NAC25 y NAC100 observada en tarwi, es comparable a lo reportado en *Manihot esculenta* por Fu *et al.* (2016). En ese trabajo, se sugirió que estas proteínas pueden tener un rol similar a RD26, un factor de transcripción NAC inducible por sequía, relacionado con la hipersensibilidad a ABA (Fu *et al.* 2016).

#### **b.4.5. Familia ERF/AP2**

Los factores de transcripción ERF/AP2 son específicos de plantas y se caracterizan por compartir un dominio de unión al ADN bastante conservado (Mizoi *et al.* 2012). Esta familia de factores de transcripción comprende cuatro subfamilias: AP2, RAV, ERF y DREB, que en conjunto comprenden 145 loci en *Arabidopsis*, los cuales se expresan diferencialmente en diversas condiciones de estrés (Sakuma *et al.* 2002). Entre estas, destacan por su importancia en la tolerancia a estrés, las proteínas de unión a DRE (DREBs), que activan la expresión de genes de expresión a respuesta abiótica por unión específica a los promotores del elemento cis DRE/CRT (Mizoi *et al.* 2012). En *Arabidopsis*, la expresión de genes de la familia ERF es regulada por la señalización hormonal de ácido jasmónico, ácido salicílico, y etileno, así como por infección con

patógenos (Guterson *et al.* 2004). En tanto, en tarwi sometido a sequía, se encontró expresión diferencial en 24 transcriptos correspondientes a esta familia. Con represión en 13 genes (54%) y sobreexpresión en 11 genes (46%; Anexo 16: Factores de transcripción).

Las proteínas del tipo Integrase-type DNA-binding superfamily protein reportadas en el presente trabajo (Figura 22) son miembros de la familia de factores de transcripción ERF con roles diversos. Estas proteínas pueden conferir formación de brotes independiente de citoquininas y su sobreexpresión en explantes de raíz de *Arabidopsis* causa defectos severos a nivel de meristemas (Matsuo *et al.* 2011). Además, está involucrada en el control de la embriogénesis y la formación de patrones a nivel del embrión por interacción con PHAVOLUTA (Chandler *et al.* 2009). Estudios transcriptómicos han identificado expresión alterada de genes involucrados en la respuesta a estímulos bióticos y abióticos (Thatcher *et al.* 2015). En particular, es notoria la represión del transcripto anotado como Glyma.01G074200. Este transcripto corresponde a un factor de transcripción de soja, que actúa como un activador transcripcional al unirse al elemento promotor relacionado a patogénesis caja-GCC. Además, se ha relacionado con la regulación de la expresión génica por factores de estrés y por componentes de las vías de transducción de señal en respuesta a estrés (Duarte *et al.* 2006; Ding *et al.* 2013). Por lo tanto, se esperaría un incremento de esta proteína en condiciones de sequía, tal como ocurrió con el transcripto anotado como Glyma.02G080200, el cual mostró una sobreexpresión bastante elevada. Este transcripto comparte similitud con factores de transcripción de respuesta a etileno ERF y ABR1 (E-value=0). Además, es mencionado en un estudio de factores de transcripción de soja en respuesta a estrés. En este estudio, un factor de transcripción similar (GmERF135), de ubicación nuclear, fue altamente sobreexpresado por tratamiento con etileno, sequía, salinidad y baja temperatura. En tanto que el análisis de los elementos promotores de acción cis de su secuencia sugirió que existen elementos cis de respuesta a estrés potenciales se distribuyen en la región promotora de GmERF135. Estos elementos incluyen elementos de respuesta a ABA, luz, etileno, ácido giberélico y metil jazmonato. Al ser incorporado en *Arabidopsis*, este factor de transcripción promovió el crecimiento de raíces bajo salinidad y ABA exógeno. En tanto que su sobreexpresión en esta planta, mejoró la tolerancia a condiciones de sequía y salinidad (Zhao *et al.* 2019). Tal como se muestra, su sobreexpresión, indica que este factor de

transcripción podría participar en las vías de señalización dependiente de ABA y etileno, para regular la respuesta a estrés.

Otro transcripto sobreexpresado es ethylene-responsive transcription factor ABR1-like isoform X2 (Figura 22). Esta proteína es un activador transcripcional que se une al elemento promotor relacionado a patogénesis caja-GCC. Por lo cual, ha sido relacionado con la regulación de la expresión génica por factores de estrés y por componentes de las vías de transducción de señal durante el estrés (Jenks *et al.* 2007). En particular, ABR1 es regulado de forma negativa por la vía de señalización de Ca dentro de las vías de transducción de señal (Kolukisaoglu *et al.* 2004). En *Arabidopsis*, la expresión del gen *abr1* se da en respuesta a ABA y condiciones de estrés, incluyendo frío, alta salinidad y sequía, y su función es disminuir los efectos del ABA durante la germinación de semillas y reprimir la expresión de genes de respuesta a ABA. Además, mutantes de *Arabidopsis* para el gen *abr1* muestran acumulación significativa de niveles elevados de ABA y transcriptos inducidos por estrés, siendo hipersensibles a condiciones de estrés osmótico, tales como alta salinidad y altas concentraciones de manitol (Pandey *et al.* 2005). En *tarwi*, la sobreexpresión de este gen podría estar relacionada con la activación de las rutas dependientes de ABA en respuesta a sequía, lo cual será discutido en Hormonas (Figura 22).

#### **b.4.6. Otras familias**

En plantas existen más de 72 familias de factores de transcripción, las cuales vienen siendo reportadas en bases de datos online para diversas especies (Mitsuda y Ohme-Takagi 2009). De estas, en el transcriptoma presentado de *tarwi*, se encontraron miembros de 45 familias con expresión diferencial, de las cuales se muestran los transcriptos correspondientes a las familias MADS, box, C2H2, GRAS, HB, HSF, bzip, GTF, Trihelix y WOX, que presentaron un mínimo de 4 genes expresados de forma diferencial (Figura 22).

Entre estas familias de factores de transcripción, se puede resaltar la expresión diferencial de WUSCHEL related homeobox 1 (WOX1) (Figura 22), el cual es parte de una familia de proteínas WOX perteneciente a plantas y algas verdes. Miembros de esta familia tienen roles importantes en la embriogénesis temprana y en la determinación de la diferenciación celular durante el desarrollo vegetal (Hedman *et al.* 2013). WOX1 ha sido expresada en

semillas (Zhou *et al.* 2018) y su sobreexpresión en *Arabidopsis* ocasiona defectos en el desarrollo del meristemo (Zhang *et al.* 2011). De esta manera, la disminución en su expresión podría deberse a la inactivación del desarrollo meristemático en condiciones de sequía.

Dentro de los genes que se pueden destacar, también se encuentra la proteína global transcription factor group B1 (Figura 22), el cual es un miembro de la familia SPTL6. Este gen actúa como un factor de elongación de la transcripción que mejora la elongación de la transcripción por la ARN polimerasa II. De esta manera, cumple un rol en el mantenimiento de la estructura de la cromatina al reprimir la iniciación de la transcripción de promotores críticos, de manera que promueve el reensamblaje de los nucleosomas en los promotores de genes reprimidos (Chen *et al.* 2019). Por lo tanto, la represión de este gen podría estar relacionada con la inactivación transcripcional.

Por otra parte, la proteína AGAMOUS-like 42 mostró incremento en su expresión (Figura 22). Esta proteína codifica factores de transcripción MADS-box, relacionados con SOC1, los cuales están involucrados en la transición floral. Promueve la floración en los brotes apicales y meristemas axilares, en la vía dependiente de giberelinas (Fornell *et al.* 2011). Por lo tanto, la inducción de este gen podría estar relacionada con la precocidad observada en esta accesión de tarwi, y especialmente, en la activación de la estrategia de escape en respuesta a sequía.

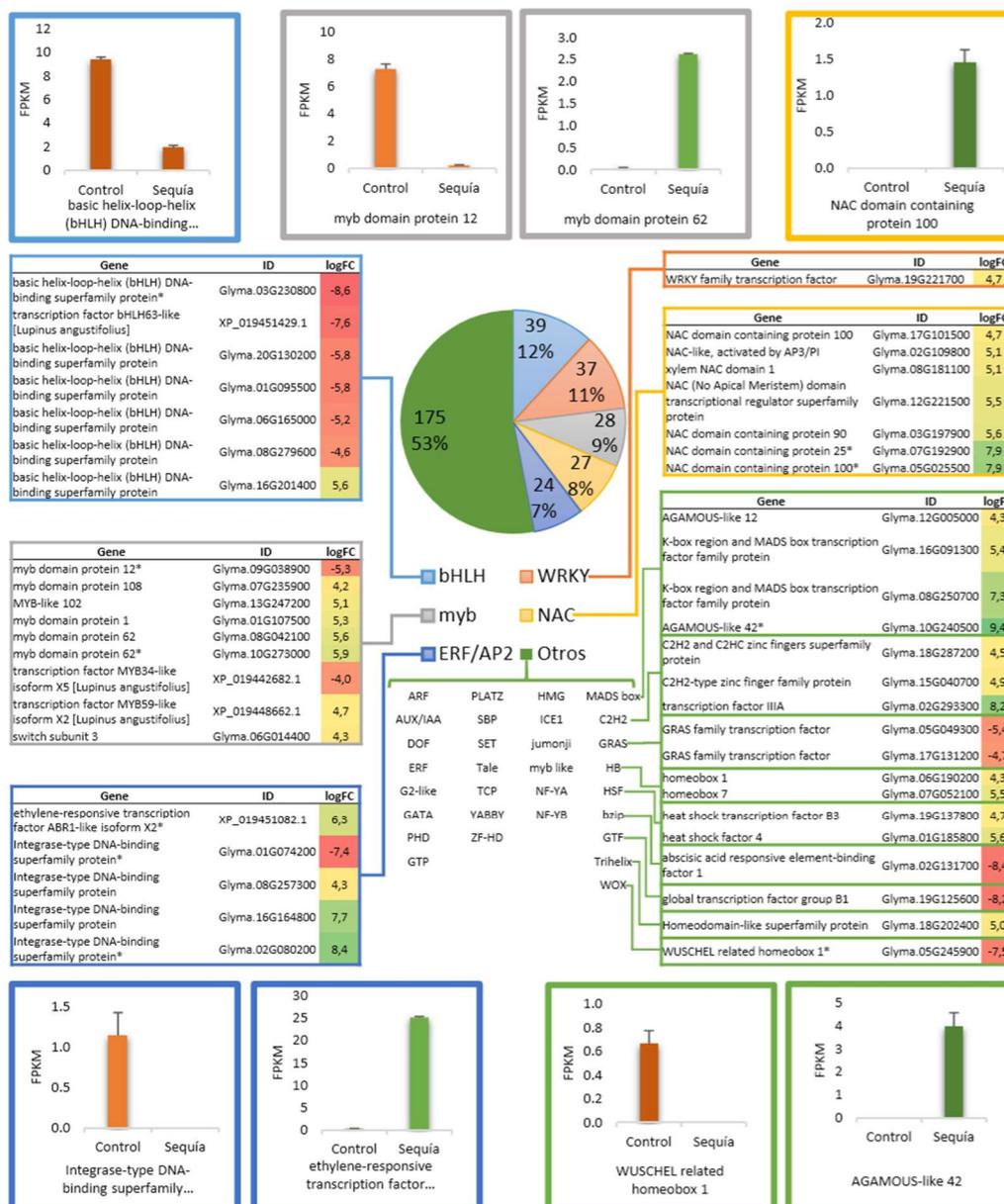


Figura 22. Genes regulatorios asociados a Factores de Transcripción en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### b.5. Hormonas

Un grupo bastante grande e importante por las funciones regulatorias que cumple es el de hormonas vegetales. En este grupo se anotaron 363 genes expresados de forma diferencial (Figura 23). De los cuales, 225 genes (62%) fueron upregulados y 138 genes fueron downregulados (38%) (Anexo 17: Hormonas) en las condiciones de estudio. Las hormonas vegetales o fitohormonas constituyen un grupo de moléculas de naturaleza

química diversa, capaces de regular el crecimiento y desarrollo vegetal (Sreenivasulu *et al.* 2012). Estos compuestos se categorizan en 5 grupos principales: ácido abscísico (ABA), etileno (Et), citoquininas (CK), auxinas (IAA), giberelinas (GA). Aunque también se ha encontrado funciones regulatorias en el ácido jasmónico (JA), brasinoesteroides (BR), ácido salicílico (SA), óxido nítrico (NO), y estrigolactonas (SL) (Pandey *et al.* 2017). Estos compuestos poseen control a corto y largo plazo sobre el crecimiento y desarrollo vegetal y estos efectos son mediados por la expresión de genes inducida por las hormonas (Sreenivasulu *et al.*, 2012). Dado que diferentes hormonas vegetales pueden regular procesos fisiológicos similares, sus vías de señalización presentan interconexión a nivel de la biosíntesis de hormonas, transducción de señal y expresión en órganos (Divi *et al.* 2010; Rahman, 2013). De esta manera, las hormonas vegetales regulan las respuestas mediante su interacción con otras vías de señalización hormonal con las cuales mantiene señalización cruzada (Divi *et al.* 2010; Rahman, 2013; Meyer 2008). Estas interacciones pueden ser sinérgicas o antagónicas (Koornneef y Pieterse, 2008), las cuales cumplen un rol esencial para permitir a las plantas sobreponerse a la adversidad ambiental (Koornneef y Pieterse, 2008). En respuesta a factores ambientales, como la sequía, la maquinaria de respuesta hormonal altera rápidamente la expresión génica al inducir, prevenir o controlar la degradación de reguladores como factores de transcripción a través de diversas vías de control de la expresión génica (Bhattacharjee y Saha 2014). Estas variaciones explican los cambios transcripcionales observados en las diferentes vías de señalización hormonal presentes en tarwi sometido a sequía (Figura 23). Los grupos de hormonas y el número de transcritos observados en el transcriptoma de tarwi fueron ácido abscísico (97), auxina (91), ácido jasmónico (69), ácido salicílico (31), ácido giberélico (27), citoquininas (21), brasinoesteroides (18) y etileno (9) (Figura 23), los cuales se desarrollan a continuación.

### **b.5.1. ABA**

El ácido abscísico (ABA) es una hormona de estrés vegetal natural y controla las respuestas a estrés, crecimiento y reproducción en las plantas cultivadas (Yamaguchi *et al.* 2006). Cuando las plantas no están sometidas a estrés, las concentraciones de ABA son bajas (Khan *et al.* 2018); sin embargo, bajo condiciones de estrés osmótico se induce la síntesis de ABA (Yamaguchi *et al.* 2006). Esta síntesis se da luego de que la señal de estrés es percibida por receptores en la membrana plasmática. La síntesis de ABA se inicia en los plástidos y finaliza a nivel de citosol con la transformación de xantoxina a ABA

mediante reacciones presentadas en la Figura 6. Esta hormona es generalmente sintetizada en la raíz y transportada a las partes aéreas a través de los tejidos vasculares (Seo *et al.* 2002). En los órganos diana, la unidad de ciclohexenona del ABA interactúa con su receptor y permite la activación de las vías de señalización intracelular. De esta manera, se inicia la ruta de señalización dependiente de ABA (Frackenpohl *et al.* 2018). Esta vía permite regular la expresión y actividad de dianas intracelulares que permiten mantener el balance hídrico y la tolerancia a estrés osmótico, además de influenciar en el crecimiento y desarrollo (Farooq *et al.* 2009). De hecho, la importancia del ABA en la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés es tal, que las rutas de señalización han sido divididas en dependientes e independientes de ABA (Harb *et al.* 2010; Zhu, 2002). Los genes regulados por ABA constituyen un porcentaje mucho más alto que para otras hormonas, alcanzando casi el 10% en *Arabidopsis* (Fujita *et al.* 2011), lo cual se observa también en tarwi. En el análisis transcriptómico de esta especie sometida a sequía, se observa que los genes de respuesta a ABA constituyen el grupo más grande dentro de hormonas, con 97 genes expresados de forma diferencial (Figura 23). De estos, 33 (34%) fueron downregulados. Mientras que 64 (66%) fueron upregulados.

El ABA es una hormona importante que regula el desarrollo vegetal y el estrés a través de la modulación de la expresión de una cascada de genes a nivel genético y el control del cierre de estomas a nivel fisiológico (Finkelstein *et al.* 2002). Esta acción se logra mediante la activación de factores de las vías de señalización dependientes de ABA. Una de las primeras modificaciones es dada por las kinasas SnRK2. Estas enzimas, activadas por ABA, fosforilan a los factores de unión al elemento de respuesta a ABA (ABFs), para inducir sobrerregulación de la expresión génica de respuesta a ABA (Hubbard *et al.* 2010). Las proteínas ABF son una familia de factores de transcripción bZIP dependientes de ABA, que interactúan con la secuencia conservada de acción cis ABRE (PyACGTGG/TC), una secuencia regulatoria encontrada en las regiones 5' de muchos genes de respuesta a ABA en plantas (Yoshida *et al.* 2010). En *Arabidopsis*, se encuentran 4 familias de genes ABF, las cuales son ABF1, ABF2, ABF3 y ABF4 (Yoshida *et al.* 2015). En particular, ABF1 es necesario para el establecimiento de las plántulas de *Arabidopsis* durante el invierno. Además, está involucrado en regular la dormancia y germinación de la semilla (Sharma *et al.* 2010). El análisis de la actividad transcripcional del promotor de ABF1 revela que ABF1 se expresa específicamente en tricomas de hojas jóvenes y constitutivamente en cotiledones, raíces, hojas viejas y flores (Sharma *et al.* 2010); sin

embargo, también se encuentra expresión de estas proteínas en tejidos vegetativos expuestos a condiciones de estrés (Yoshida *et al.* 2015), siendo principalmente upreguladas en respuesta a ABA, frío y calor (Sharma *et al.* 2010). En particular, se ha demostrado que en *Arabidopsis* la expresión de ABF1 se induce significativamente por frío, pero no por estrés osmótico (Fujita *et al.* 2011). En tanto, la expresión de los otros 3 genes ABF (ABF2, ABF3, y ABF4) se induce por estrés por ABA y deshidratación, como la sequía y alta salinidad (Fujita *et al.* 2011). Estos resultados contrastan con lo encontrado en el transcriptoma de tarwi reportado. En esta planta, el gen de abscisic acid responsive element-binding factor 1 (ABF) (Glyma.02G131700) fue reprimido (logFC=-8,4) (Figura 23) en respuesta a estrés. Esta variación podría ser explicada por la expresión diferencial de familias ABF observada según el tiempo de exposición (Fujita *et al.* 2011; Feng *et al.* 2019). En un trabajo en *Manihot esculenta*, se estudiaron los niveles de expresión de MeABF1, MeABF2 y MeABF3 a nivel foliar en respuesta a estrés salino (Feng *et al.* 2019), observándose que el incremento significativo ocurre solamente a las 12h. mientras que posteriormente, los niveles para MeABF1, MeABF2, MeABF3, MeABF4 y MeABF7 se reducen significativamente. Esto indica que este grupo de genes podría tener un rol importante durante las primeras etapas de adaptación a la sequía (Feng *et al.* 2019).

Las proteínas dedos de Zinc (ZFP) constituyen otro grupo importante de proteínas de respuesta a ABA. Estas proteínas actúan como factores de transcripción al tener un motivo dedos de zinc conservado, el cual se propone para ser un dominio de unión al ADN doblado independientemente, el cual puede reconocer secuencias específicas de ADN (Gan *et al.* 2007). ZFP se une con el ión Zn a través de su cisteína (Cys) e histidina (His) usando el dedo de Zinc. El dedo de Zn se une a un ión Zn para estabilizar su estructura tridimensional que consiste de hojas  $\beta$  y  $\alpha$ -hélice de doble hebra, el cual es muy importante al tener muchos roles biológicos de ZPF (Li *et al.* 2013). La importancia de los ZFPs es resaltada por el gran número de representantes de esta familia. Habiéndose demostrado la presencia de 176 ZFPs en *Arabidopsis thaliana* y 126 ZFPs en trigo (Zang *et al.* 2016). En diversas especies, se ha demostrado que los ZFPs son capaces de interactuar con ADN, cromatina, ARN y otras proteínas (Elrod-Erickson *et al.* 1996; Iuchi 2001; Yang *et al.* 2006; Gamsjaeger *et al.* 2007). Estos factores de transcripción cumplen varias funciones biológicas, como el crecimiento y desarrollo vegetal (de flores, tallo, semilla, pistilo y hoja), la respuesta a las hormonas y las respuestas a estrés biótico y

abiótico (Li *et al.* 2013). Miembros como ZFP8 son proteínas que participan en procesos fisiológicos, al ser requeridos para la iniciación de los tricomas de inflorescencia en respuesta a giberelina y citoquinina (Gan *et al.* 2007); sin embargo, la asociación de esta familia con el estrés abiótico se ha encontrado al estudiar ZFP3, la cual actúa como un regulador negativo de la señalización de ABA durante la germinación y desarrollo temprano de plántulas (Joseph *et al.* 2014). Esto parece sustentar los datos observados en el transcriptoma de tarwi (Figura 23). En los datos reportados, se observa la presencia de un miembro de esta familia, denominado zinc finger protein 8 (ZFP8) (Glyma.03G147200), el cual mostró represión ( $\log_{2}FC = -5,7$ ) en condiciones de sequía. Aunque se debe mencionar que se deben realizar más estudios para clarificar los roles que diversos miembros de esta familia pueden tener ante condiciones de estrés, puesto que algunos estudios parecen diferir de los hallazgos en tarwi (Zang *et al.* 2016; Luo *et al.* 2012; Jin *et al.* 2018). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la expresión de AtRZFP se indujo significativamente por estrés osmótico y salino, demostrándose que AtRZFP media positivamente la tolerancia a estrés osmótico y salino al regular aumento de actividad superóxido dismutasa y peroxidasa, incremento en los contenidos de azúcares solubles y prolina, pérdida reducida de K, disminución de acumulación del Na, de la apertura de estomas y de la tasa de pérdida de agua (Zang *et al.* 2016). Además, en *Glycine soja* se ha estudiado el rol de GsZFP1, una nueva proteína dedos de Zn del tipo C2H2. Esta proteína es un regulador positivo de la tolerancia a estrés por sequía y frío, encontrándose que plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan GsZFP1 tienen mayor tolerancia a estrés por frío y sequía (Luo *et al.* 2012). Por último, plantas de arroz transgénico que sobreexpresan OsCTZFP8 muestran fenotipos tolerantes al frío con mayor fertilidad del polen y establecimiento de semillas más elevada. Adicionalmente, el rendimiento por planta en las líneas que expresan OsCTZFP8 fue significativamente mayor que la de las plantas control no transgénicas bajo tratamiento con frío (Jin *et al.* 2018).

### **b.5.2. Auxina**

La auxina es una hormona sintetizada en forma de ácido indol 3-acético (AIA), en los tejidos superiores como los ápices caulinares y hojas jóvenes en un proceso dependiente de la regulación de los genes de síntesis YUC (Peret *et al.* 2012; Blakeslee y Murphy, 2005). Luego de ser sintetizada, esta hormona se distribuye direccionalmente a través de la planta. Los patrones de distribución de auxina son asimétricos dentro de los tejidos (Tanaka *et al.* 2006) y los niveles de esta hormona dependen de la actividad y cantidad

de diversas proteínas, como los transportadores de influjo de auxinas las familias de proteínas AUX1/LAX y los transportadores de eflujo de auxinas, incluyendo PIN, y las proteínas de la familia ABCB/ PGP (Peret *et al.* 2012; Blakeslee y Murphy, 2005). Los patrones de distribución de esta hormona también varían dinámicamente a través de las diferentes etapas de desarrollo (Tanaka *et al.* 2006). Es así que se ha demostrado el rol de las auxinas en el crecimiento y desarrollo vegetal, incluyendo embriogénesis, organogénesis, establecimiento de patrones de tejidos, tropismo y respuestas de crecimiento a estímulos ambientales (Jagodzik *et al.* 2018). El rol de esta hormona en esta multiplicidad de procesos biológicos resulta de su regulación de la división, expansión y diferenciación celular (Chen y Baluska, 2013), lo cual depende de un proceso de señalización que ha sido dividido en 3 etapas que contribuyen a su complejidad: el patrón espacio temporal de su biosíntesis, su transporte direccional y respuestas específicas de tejido o células (Zhao, 2010; Pandey *et al.* 2017). El rol de esta hormona durante el estrés viene siendo estudiado, habiéndose demostrado su participación en la respuesta a estrés por salinidad, calor, frío y particularmente sequía (Blakeslee *et al.* 2019; Wang *et al.* 2010; Pandey *et al.* 2017). Por ejemplo, se ha observado que proteínas involucradas con la respuesta a AIA como el factor de respuesta a auxinas (ARF), Gretchen Hagen3 (GH3), small auxin-up RNAs, y lateral organ boundaries (LBD), están involucrados en las respuestas de desarrollo-crecimiento y defensa/estrés en *Arabidopsis* y arroz (Wang *et al.* 2010; Pandey *et al.* 2017). Además, el estudio ARN-seq en *Arabidopsis*, durante respuestas a estrés por sequía y calor ha demostrado diferencias específicas de tejidos en los genes de biosíntesis de auxinas TAA/YUC (Blakeslee *et al.* 2019). En particular, con respecto al estrés por sequía, se ha observado la upregulación de la expresión de YUC9 en el tejido foliar después del estrés, y la downregulación de los niveles de transcripción de ambos, TAA1 y TAR2 en hojas luego del estrés por sequía (Blakeslee *et al.* 2019). En tabaco sometido a estrés osmótico se ha demostrado que la auxina es capaz de inducir la formación de raíces laterales por incremento del transporte polar de auxinas de tallos a raíces. Este cambio es mediado por la sobreexpresión de los genes YUC y PIN en las plantas tratadas con PEG (Wang *et al.* 2017). Aunque se debe tener en cuenta que en términos globales, se observa una reducción significativa en los niveles de AIA luego del estrés por sequía. En tanto que el estrés por calor y frío es capaz de incrementar los niveles de AIA (Pandey *et al.* 2017). Experimentos adicionales muestran que la auxina puede mejorar la tolerancia a sequía al modular la arquitectura de la raíz, la expresión de genes de respuesta a ABA y el metabolismo de EROs (Schopfer *et al.* 2002). En tarwi, la vía de

señalización de auxina parece ser muy importante en respuesta a sequía. Los genes dependientes de auxina constituyen el segundo grupo más grande de genes relacionados a hormonas (Figura 23), encontrándose expresión diferencial en 91 transcriptos. De estos, se encontró sobreexpresión en 45 transcriptos (49%), en tanto que 46 genes (51%) mostraron represión (Anexo 17: Hormonas).

Luego de sintetizarse en las zonas apicales, las auxinas deben ser transportadas a los diferentes órganos. Este transporte se realiza de manera polar y está mediado por diversos transportadores (Swarup y Bhosale, 2019). Los transportadores involucrados en el transporte polar de AIA incluye los transportadores de influjo y eflujo (Damodaran y Strader, 2019). Dentro de los transportadores de eflujo, se encuentran los miembros de la familia Pin-Formed (PIN) y algunos miembros de la familia P-Glycoprotein/ ATP-Binding Cassette B4 (PGP/ABCB). En tanto que los transportadores de influjo de auxinas comprenden la familia Auxin1/Like-Aux1 (AUX1/LAX) (Swarup y Bhosale, 2019). Los transportadores AUX1/ LAX son proteínas con múltiples dominios transmembrana que comparten similitud con transportadores de aminoácidos aromáticos como el triptófano (Swarup y Bhosale, 2019; Damodaran y Strader, 2019; Péret *et al.* 2012). Estas proteínas permiten el influjo del AIA hacia el interior de las membranas (Damodaran y Strader, 2019). Los genes AUX1/LAX son estimulados por gravedad, lo cual es crucial para la distribución asimétrica de auxina en los ápices de raíz y en distintos órganos (Singh *et al.* 2018). En *Arabidopsis*, la familia AUX1/LAX de transportadores de auxinas representan los transportadores de influjo más importantes (Swarup y Bhosale, 2019). En esta especie, esta familia de genes comprende cuatro miembros: AUX1, LAX1, LAX2, y LAX3, que comparten similitud de 75–80% al nivel de proteínas (Swarup y Bhosale, 2019). Estos transportadores de auxina AUX1/ LAX han sido implicados en la regulación del desarrollo vegetal en *Arabidopsis*. En esta especie son esenciales en diversos procesos biológicos desde la germinación de semillas hasta el desarrollo de raíces, tallo y flores y embriogénesis (Swarup y Bhosale, 2019). Recientemente, AUX1 también ha sido involucrado en la regulación de respuestas vegetales a estrés abióticos (Swarup y Bhosale, 2019). En particular su rol parece estar ligado a la tolerancia a Cadmio (Cd) y a la producción de raíces laterales con bajos niveles de P (Zhu *et al.* 2013; Yu *et al.* 2015; Giri *et al.* 2018). En arroz, OsAUX1 ha sido implicado en la respuesta a estrés por Cd, el cual induce la producción de EROs, ocasionando la muerte celular en plantas (Zhu *et al.* 2013). Los genes OsAUX1/LAX (OsAUX1-5) son inducidos por estrés por Cd y los mutantes

defectuosos en *osaux1* no fueron alteradas, muestran mayor estrés oxidativo y sensibilidad incrementada al estrés por Cd. Lo cual indica que OsAUX1 cumple un rol importante en las respuestas al estrés por Cd (Yu *et al.* 2015). Por otra parte, se ha demostrado que OsAUX1 también regula la elongación de pelos radicales en condiciones de déficit de P. El bajo nivel de P ocasiona la acumulación incrementada de auxina en los ápices de las raíces de una forma dependiente de OsAUX1 (Giri *et al.* 2018). Estos hallazgos se relacionan con la sobreexpresión ( $\log_{2}FC=5,3$ ) de *like AUX1 3* (Glyma.04G252300) observada en tarwi sometido a condiciones de sequía (Figura 23). En esta leguminosa, se ha reportado una disminución de P en condiciones de sequía en la etapa vegetativa (Figura 9B- Contenido de elementos en la parte aérea). Además, al estar sometida a condiciones de sequía, en esta especie existiría un incremento de EROs (Farooq *et al.* 2009), que estaría relacionado con la sobreexpresión de este transportador en la parte aérea. Por último, al inducir el influjo de auxinas la upregulación de este gen podría estar relacionado con el incremento del pH del apoplasto por vía simporte de protones con AIA a través de AUX1. Esto ha sido relacionado con la regulación de la actividad de H<sup>+</sup>ATPasa, una bomba capaz de enviar los protones de vuelta al exterior (Singh *et al.* 2018) y que también ha sido sobreexpresada en tarwi (Inorganic H pyrophosphatase family protein;  $\log_{2}FC=4,7$ ; Sección Hidrolasas ácido-anhidrido)

Sghaier *et al.* 2018 afirman que la acción de las auxinas es mediada por 3 familias grandes de genes de respuesta a auxinas: Aux/IAA, GH3 y small auxin up-regulated RNA (SAUR). Esta última, es una de las familias más notorias, es la familia de genes que al estar presentes en todas las plantas con flores e incluso en musgos (Stortenbeker y Bemer, 2018). Con 60-140 miembros en la mayoría de especies vegetales (Stortenbeker y Bemer, 2018) la familia SAUR es la más grande de genes de respuesta temprana a auxina (Xu *et al.* 2018). Los genes pertenecientes a esta familia actúan mediante la modificación de las vías de transducción de señal (Ren y Gray, 2015; Sghaier *et al.* 2018) inhibiendo a las fosfatasas PP2C, para activar a las H<sup>+</sup>-ATPasas de membrana plasmática, promoviendo la expansión celular (Ren y Gray, 2015). Además, las proteínas SAUR se unen a CaM alterando el desarrollo apical y regulando de forma negativa la síntesis y el transporte de auxinas (Sghaier *et al.* 2018). De esta manera, los genes SAUR pueden regular un amplio rango de procesos celulares, fisiológicos y de desarrollo (Sghaier *et al.* 2018), entre los que se encuentran la promoción de la expansión foliar y la respuesta a estrés (Spartz *et al.* 2012). Los genes SAUR son regulados a nivel transcripcional por auxina y factores

ambientales, siendo considerados como herramientas clave en la adaptación del crecimiento y desarrollo (Stortenbeker y Bemer, 2019). De hecho, se consideran SAUR son reguladas por estrés abiótico y tienen múltiples funciones en las plantas (Xu *et al.* 2018). De manera general, se ha observado un patrón general de upregulación de los genes SAUR en respuesta a hormonas y condiciones que inducen el crecimiento, como auxinas, brasinoesteroides, giberelinas y ratios rojo:infrarrojo disminuídos. Sin embargo, se produce downregulación de genes SAUR en respuesta a ABA, JA y condiciones de estrés, como sequía, frío, y salinidad (Stortenbeker y Bemer, 2018). Por supuesto, los cambios transcripcionales de esta proteína dependen de tejido y la ubicación subcelular, además del tipo de estrés (Guo *et al.* 2017; Guo *et al.* 2019; Spartz *et al.* 2012). Por ejemplo, en raíces de Citrus Ziyang se ha encontrado downregulación en 3 de 9 genes SAUR a las 24 horas de exposición a estrés por salinidad (Xie *et al.* 2017). En raíces de trigo sometidas a estrés por salinidad, se ha encontrado represión a nivel de núcleo y citoplasma en TaSAUR75. En tanto que la sobreexpresión de TaSAUR75 en *Arabidopsis* es capaz de incrementar la tolerancia a sequía y salinidad. Por esta razón, el gen TaSAUR75 ha sido considerado un candidato para mejoramiento de tolerancia a estrés en plantas cultivadas (Guo *et al.* 2017). El estudio de TaSAUR78 en trigo demostró que la sobreexpresión de esta proteína es capaz de mejorar la tolerancia a estrés por salinidad, sequía y congelamiento en *Arabidopsis* transgénicas. Lo cual se logra al reducir la acumulación de ROS bajo estrés salino (Guo *et al.* 2019). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de AtSAUR19 mejoró la pérdida de agua en hojas y retardó el cierre de estomas (Spartz *et al.* 2012). En tomate, la mayoría de genes SISAUR fueron downregulados de forma significativa bajo estrés abiótico por frío, salinidad y sequía. Aunque se ha encontrado que SISAUR58 un gen SAUR rico en histidina fue upregulado luego del tratamiento por salinidad, lo cual indica que puede tener un rol específico en las rutas de transducción de señal (Wu *et al.* 2012). Mientras en álamo, los niveles de expresión de diferentes tipos de genes SAUR tienen expresión diferencial en respuesta a sequía. Esta expresión depende del tiempo, encontrándose sobreexpresión en 3 genes PtSAUR8, PtSAUR20 y PtSAUR91 a las 6 horas, mientras que PtSAUR67 mantienen altos niveles de expresión a 1 hora y 24 de tratamiento. Sin embargo, los patrones de expresión son variables al encontrarse sobreexpresión de 7 genes SAUR a 1 hora de tratamiento, pero downregulación en los mismos genes a las 24 horas de tratamiento (Hu *et al.* 2018). La expresión observada para los genes SAUR demuestra que su sobreexpresión está relacionada con la tolerancia a estrés, lo que también fue observado

en tarwi. En el análisis transcriptómico de la accesión P03, tolerante a sequía, se observó sobreexpresión ( $\log_{2}FC=7,3$ ) en el transcripto SAUR-like auxin-responsive protein family (Glyma.07G051700) (Figura 23), lo cual constituye un patrón similar al observado en Citrus, Triticum, *Arabidopsis* y Populus (Xie *et al.* 2017; Guo *et al.* 2017; Spartz *et al.* 2012; Hu *et al.* 2018). Además, esta proteína sería capaz de interactuar con la señalización por fosfatasa al regular la actividad de la bomba de  $H^{+}$ -ATPase y de PP2C-D1 (Spartz *et al.* 2012, 2014), dos proteínas cuya expresión también ha sido diferencial en tarwi sometido a estrés por sequía (Figura 20 y Figura 21).

### **b.5.3. Ácido jasmónico**

El tercer grupo con más genes diferencialmente expresado fue el correspondiente a la señalización de ácido jasmónico (AJ), con 69 genes expresados de forma diferencial (Figura 23). El AJ es una hormona vegetal derivada del ácido alfa-linolénico por acción de la enzima lipooxigenasa. Sus derivados activos se denominan jazmonatos (Ullah *et al.* 2018). La síntesis de jasmonatos se produce en los plástidos, peroxisomas y citosol principalmente a nivel de flores en condiciones normales (Wasternack, 2007). Su rol sobre diversos procesos fisiológicos ha sido ampliamente demostrado, de manera que el AJ se asocia con el crecimiento radicular, mayor producción de polen y la maduración adecuada de fruto (Khan *et al.* 2018). En condiciones de estrés biótico y abiótico, la síntesis de AJ se induce en diferentes tejidos, como una respuesta de defensa, lo cual señala su rol esencial (Wasternack, 2007). A nivel molecular, este cambio se debe a que, en condiciones de estrés, el AJ y sus derivados, promueven la degradación de las proteínas JAZ, lo cual resulta en factores de transcripción activos como MYC2, que actúan promoviendo la expresión de genes involucrados en respuestas a estrés (Ullah *et al.* 2018; Chini, 2007). En particular, en respuesta a sequía, se ha demostrado que el AJ induce tolerancia de diversas formas. La aplicación exógena de AJ y jazmonatos mejoran la respuesta de las plantas a estrés por sequía (Ullah *et al.* 2018). Esto se logra al mejorar el desarrollo radicular, regular la dinámica de estomas, induciendo su cierre ante el déficit hídrico (Riemann *et al.* 2015) e incrementar la actividad antioxidante de las plantas durante el estrés por sequía. De hecho, la aplicación exógena de AJ mejora la actividad de glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa, dehidroascorbato reductasa y monodehidroascorbato reductasa en condiciones de sequía en plántulas de trigo (Shan *et al.* 2015). Estos cambios se deben a la sobreexpresión de los genes relacionados a la síntesis de AJ (Ullah *et al.* 2018) y son similares a los efectos inducidos por ABA en

respuesta a sequía (Riemann *et al.* 2015). De hecho, la señalización por jazmonatos actúa de forma similar a la señalización por ABA, al formar un núcleo, en el cual diversos procesos se inician para responder apropiadamente al estrés por sequía (Ullah *et al.* 2018). En *Arabidopsis* el tratamiento con AJ reduce de forma significativa los transcritos de genes de respuesta a estrés por sequía y frío dependientes de ABA, lo cual parece indicar que existe una interacción antagonica entre las vías de señalización de ABA y AJ (Jung *et al.* 2007). Sin embargo, en soja se ha encontrado que el ABA y el AJ con mayor eficiencia, pueden disminuir los efectos adversos de la sequía (Hassaneim *et al.* 2009). Esto indica que el rol de AJ es controversial con respecto a la tolerancia a sequía. En algunos casos, el AJ mejora la tolerancia a sequía, mientras en otros casos, es nocivo, causando reducción del crecimiento y rendimiento (Sarwat y Tuteja, 2017). En el transcriptoma de tarwi sometido a condiciones de sequía que se presenta, se observó una clara tendencia a la sobreexpresión, con 57 genes upregulados (83%) y 12 transcritos downregulados (17%) (Anexo 17: Hormonas). Lo cual indica su importancia en esta especie. De hecho, en *Lupinus luteus* otra especie del mismo género, se ha demostrado la acción de la aplicación de jazmonatos en el proceso de germinación y la composición química de semillas. En esta planta, los jazmonatos actúan inhibiendo la tasa de degradación de galactosidos y retrasando el proceso de germinación (Zalewski *et al.* 2010). Además, se ha observado que en *Lupinus albus*, la aplicación de jazmonatos y luz es capaz de inducir la acumulación de isoflavonas a nivel de cotiledones, presumiblemente por regulación de enzimas clave de la ruta de flavonoides (Katagiri *et al.* 2001). Aunque el rol del AJ no se conoce bien en *Lupinus* sometido a condiciones de sequía, se debe tener en cuenta que su acción depende de diversos factores, como el tipo de planta y tejido estudiado, la etapa de desarrollo de la planta, la intensidad de la duración del estrés por sequía y de ser el caso, la dosis de del AJ utilizado (Sarwat y Tuteja, 2017).

El AJ puede ser convertido en metil-jazmonato (MJ) por la enzima jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT) (Browse y Howe, 2008). El MJ parece ser una forma activa de AJ en condiciones específicas, estando involucrado en la defensa vegetal, el desarrollo y la producción de semillas, además de inducir tolerancia a estrés biótico (Yang *et al.* 2011). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de JMT induce la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de AJ y la resistencia a *Botrytis cinerea* (Seo *et al.* 2001). En tanto que en *Nicotiana attenuata*, la sobreexpresión de JMT no ocasiona variación en los genes de biosíntesis de AJ (Stitz *et al.* 2011). Por otra parte, en arroz, la sobreexpresión de este gen

incrementa los niveles de MJ y ABA, lo cual ocasiona que aparezcan fenotipos inducidos por estrés por sequía y pérdida del rendimiento de grano (Kim *et al.* 2009). El gen JMT también es encontrado en tarwi. En esta leguminosa sometida a condiciones de sequía, se ha encontrado sobreexpresión ( $\log_{2}FC=5,0$ ) del gen jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT) (Glyma.03G042300) (Figura 23), lo cual podría estar relacionado con la producción de MJ, una molécula que por su volatilidad es capaz de actuar como un regulador intracelular, un transductor de señal de fácil difusión o una molécula señal que permite la comunicación aérea (Delker *et al.* 2006) y con capacidad para autoamplificarse, estimular o regular su propia expresión y propagar las respuestas de MJ a nivel de toda la planta (Seo *et al.* 2001). Aunque la literatura indica que el efecto de la expresión de JMT sobre las respuestas de las plantas a estrés hídrico dependen de la especie. Los hallazgos encontrados en tarwi indican que la producción de JMT podría estar relacionada con la defensa de la planta ante sequía (Qi *et al.* 2016). El AJ y MJ actúan a nivel intracelular activando la regulación de factores de transcripción de diversas familias, como NAC, MYB, MYC, ERF, WRKY (Ruan *et al.* 2019). Se ha demostrado que la señalización de AJ puede actuar a través de la modulación de múltiples factores de transcripción NAC, que regulan la comunicación entre las vías activadas por diferentes hormonas, en respuesta a (Yang *et al.* 2019). De hecho, tal como se describió en la sección Factores de Transcripción-NAC, la mayor parte de estos genes están sobreexpresados en el transcriptoma de tarwi sometido a condiciones de estrés hídrico (Figura 22), lo cual concuerda con la inducción de los genes relacionados a AJ descritos en el párrafo previo. En particular, se ha encontrado sobreexpresión ( $\log_{2}FC=5,5$ ) en el gen NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein (Glyma.12G221500), uno de los genes de respuesta a AJ que actuaría regulando la expresión de otros genes corriente abajo. Entre estos genes regulados por la señalización de AJ destaca la sobreexpresión de lipooxigenasa, una enzima esencial para la síntesis de 12-ODPA, un precursor del AJ (Yang *et al.* 2019). Los datos observados en la Figura 23 muestran upregulación en 4 genes de lipoxigenase 1 (Glyma.03G237300; Glyma.08G189200; Glyma.08G189600; Glyma.13G347500) ( $\log_{2}FC=5,8$ ;  $\log_{2}FC=5,8$ ;  $\log_{2}FC=5,3$ ;  $\log_{2}FC=4,7$ ). La lipoxigenasa es una enzima de respuesta a estrés mecánico y su inducción ha sido relacionada con el aumento de expresión de NAC y AJ en *Arabidopsis* (Bu *et al.* 2008). La expresión de este gen tarwi, podría indicar que cumple un rol en la respuesta al estrés por sequía en esta especie.

Uno de los cambios inducidos por el AJ está relacionado a la modificación de la composición de la pared celular. Se ha demostrado que el tratamiento con AJ es capaz de inducir cambios significativos en el crecimiento de las plantas, afectando de forma negativa la composición de las paredes celulares (Napoleão *et al.* 2017). La celulosa, el componente estructural de las paredes celulares es sintetizado por un complejo enzimático denominado sintasa de celulosa A (CESA), una proteína compleja formada por 18 subunidades CESA organizadas en estructuras con forma de roseta (Olins *et al.* 2018). Esta enzima comprende subunidades catalíticas que constituyen una familia multigénica en plantas terrestres (Yin *et al.* 2009). En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 10 genes CESA, de los cuales 1,2,3,5,6 y 9 están involucrados en el desarrollo de la pared celular primaria, mientras que CesaA4, CesaA7 y CesaA8 son requeridos para el ensamblaje de complejos proteicos necesarios para la biosíntesis de pared celular secundaria (Taylor *et al.* 2003). En tanto, en *Populus*, CesaA4, CesaA7 y CesaA8 actúan de manera coordinada en la diferenciación del xilema (Takata *et al.* 2014). Mientras tanto, en *Brachypodium distachyon*, los genes de sintasa de celulosa (CES) CESA4 y CESA7 han sido caracterizados funcionalmente como sintasas de celulosa clave en la formación de la pared celular secundaria (Handakumbura *et al.* 2013). En este trabajo, se ha encontrado que existe downregulación marcada ( $\log_{2}FC = -8,2$ ) en el gen cellulose synthase A4 (CESA4) en tarwi sometido a condiciones de estrés hídrico (Figura 23). La represión de este gen podría estar relacionado con la reducción de la síntesis de la pared celular en tarwi. Lo cual podría constituir un mecanismo de adaptación para utilizar los monosacáridos en la producción de energía para procesos energéticos vitales en estas condiciones de estrés (Fang y Xiong 2015); sin embargo, se ha encontrado que en *B. distachyon* el mismo gen CESA4 es reprimido en respuesta al tratamiento con metil-jazmonato. Aunque esta variación no estuvo acompañada de variaciones en la expresión de CESA7, y, por el contrario, fue seguida de reducción de lignina y un aumento del contenido de celulosa (Napoleão *et al.* 2017). Estos resultados señalan que los cambios inducidos por estrés ambiental sobre la arquitectura de la pared celular dependen de la especie, del genotipo, estado de desarrollo, tiempo e intensidad del estrés (Gall *et al.* 2015).

#### **b.5.4. Ácido salicílico**

El ácido salicílico (AS) pertenece a una variedad de compuestos fenólicos que contienen un grupo hidroxilo o sus derivados (Vlot *et al.* 2009). Su síntesis se produce a partir del

ácido benzoico, de fenilalanina o en el cloroplasto, a partir del ácido shikímico, convirtiendo los precursores de carbohidratos derivados de la glucólisis y vía de las pentosas fosfato (Wildermuth *et al.* 2001; Wildermuth 2006). El ácido salicílico es un compuesto hormonal que tiene un rol importante en la tasa de fotosíntesis, la conductancia de estomas y la transpiración (Khan *et al.* 2003). Además, el AS está involucrado en la regulación de procesos fisiológicos importantes, como el metabolismo del nitrógeno, metabolismo de prolina, producción de glicina betaína, sistema de defensa antioxidante, y modificación de las relaciones vegetales en condiciones de estrés, por lo cual, proporcionan protección contra estrés abiótico (Khan *et al.* 2015). De hecho, se ha demostrado que el AS mejora la tolerancia vegetal a los factores de estrés más importantes, como metal, salinidad, osmótico y estrés por calor y por sequía (Horváth *et al.* 2007). El AS incrementa la protección antioxidante e inhibiendo la acumulación de Na y Cl a nivel del citosol (Gunes *et al.* 2007). En *Arabidopsis*, trigo y maíz se ha encontrado sobreexpresión de los genes de síntesis de AS en condiciones de estrés hídrico, lo cual incrementa el contenido de AS en tejidos vegetativos (Khan *et al.* 2015; Miura y Tada, 2014). Mientras en tarwi, se encontró expresión diferencial en 31 genes correspondientes a la señalización de ácido salicílico (Figura 23). La mayor parte de estos genes están sobreexpresados, con 21 transcriptos (68%), en tanto, hubo solamente 10 genes (32%) downregulados (Anexo 17: Hormonas). Esta regulación diferencial podría estar relacionada con las variaciones observadas en otras hormonas descritas en esta sección. De hecho, se ha demostrado que el AS altera la síntesis y señalización de otras hormonas vegetales, incluyendo el AJ, el etileno y las auxinas (Vlot *et al.* 2009). En particular, la sobreexpresión observada en tarwi sometido a sequía con respecto a los genes de la vía de AS, puede estar relacionada con el incremento de expresión observado en los genes de la ruta dependiente de ABA (Sección Hormonas-ABA). El incremento de AS ha sido relacionado con el incremento de ABA en hojas de cebada (Bandurska y Stroinski, 2005). Con respecto a la relación del AS con la señalización del AJ en las respuestas de defensa de plantas a estrés, se ha observado una relación de antagonismo dado que el MJ es capaz de inhibir las respuestas dependientes de AS en *Arabidopsis* (Vlot *et al.* 2009; Forcat *et al.* 2008; Khan *et al.* 2015). Sin embargo, en tarwi, ambas vías hormonales se encuentran upreguladas en condiciones de sequía, lo que sugiere una relación directa (Figura 23).

Uno de los genes relacionados con AS es el gen 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (Glyma.12G173200). Este tuvo una notable represión ( $\log FC = -9,5$ ) en tarwi sometido a estrés hídrico (Figura 23). La enzima codificada por este gen, cataliza un paso clave en la vía del fosfato de metileritritol, que sintetiza isopentenil difosfato, un compuesto importante en la biosíntesis de isoprenoides (Cheng *et al.* 2017), los cuales constituyen una familia de esteroides que regulan la fluidez y la permeabilidad de la membrana, actúan como transportadores de carbohidratos y forman la cadena de prenilos de las quinonas que son parte de la cadena transportadora de electrones (Seemann *et al.* 2006) y están involucrados en la señalización de moléculas como ABA, brasinoesteroides, giberelinas y estrigolactonas (Tarkowská y Strnad, 2018). En *Tripterygium wilfordii*, los niveles de esta enzima se incrementan y disminuyen de forma secuencial, generando concentraciones elevadas y bajas de manera periódica en respuesta al tratamiento con MJ. Esta variación en forma de pulsos podría estar relacionada con la presencia de elicitores (Cheng *et al.* 2017). De hecho, en *Cucumis sativa* se encuentra sobreexpresión de este gen ante la infección por *Pseudoperonospora cubensis* (Zhang *et al.* 2019). Su expresión se encuentra relacionada a respuesta a estrés por sequía en *Cassia angustifolia* (Mehta *et al.* 2016). Incluso, se ha observado upregulación en la enzima relacionada 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase ante el estrés por deshidratación en *Hordeum vulgare* (Liang *et al.* 2017); sin embargo, se requieren más estudios para verificar el rol de esta enzima en la respuesta al estrés por sequía en tarwi.

#### **b.5.5. Ácido giberélico**

El ácido giberélico (AG) y las giberelinas bioactivas son un grupo de compuestos tetracíclicos diterpenos. Estos compuestos se sintetizan los tejidos en crecimiento, en una serie de reacciones complejas que se dan a nivel de protoplastidos, microsoma y citoplasma (Olszewski *et al.* 2002). El AG influencia grandemente los procesos de germinación de semilla, expansión foliar, elongación del tallo, iniciación floral, iniciación de tricomas e iniciación y desarrollo de fruto (Yamaguchi 2008). Cuando las plantas son expuestas a factores de estrés biótico y abiótico, el AG se acumula de forma rápida (Fahad *et al.* 2015). En estas condiciones de estrés abiótico, la concentración de AG puede ser benéfica para adaptar la fisiología y el metabolismo de muchas plantas, dado que regula los procesos metabólicos, como la señalización de azúcares y la actividad de enzimas antioxidantes (Iqbal *et al.* 2011). De hecho, en diversas plantas, el rol del AG ha sido bastante estudiado en salinidad, factor al cual puede proporcionar tolerancia (Fahad *et al.*

2014). En tarwi sometido a condiciones de sequía, se han registrado 27 genes con expresión diferencial relacionados al ácido giberélico (Figura 23). 14 genes mostraron sobreexpresión (52%). En tanto que 13 genes (48%) fueron downregulados (Anexo 17: Hormonas).

Entre los transcriptos observados están dos variantes del gen de Gibberellin-regulated family protein (Glyma.13G069900 y Glyma.18G132100), los cuales mostraron downregulación y upregulación, respectivamente ( $\log_{2}FC = -5,3$  y  $\log_{2}FC = 4,0$ ) (Figura 23). Este transcripto codifica una proteína que contiene un dominio GASA que regula los incrementos de crecimiento vegetal a través de la transducción de señal dependiente de DELLA y AG, que puede incrementar la resistencia al estrés abiótico al reducir la acumulación de EROs (Sun *et al.* 2013). Las proteínas DELLA forman parte de la vía del AG, y en *Arabidopsis*, son reguladas por XERICO, una proteína asociada con la tolerancia a sequía y la biosíntesis de ABA (Golldack *et al.* 2014). Además, en esta misma especie, la expresión de la proteína DELLA es inducida por AJ (Wild *et al.* 2012). Estos hallazgos explican el hecho de que en plantas estresadas por salinidad se observa incremento de ABA y disminución de AG y citoquininas (Fahad *et al.* 2015). Además, en soja, Gibberellin-regulated family protein es regulada por GmBZL3, un gen de respuesta a brasinoesteroides (BR), capaz de unirse a una región promotora de genes JAZ1, lo cual puede indicar una relación negativa entre BR y AJ (Song *et al.* 2019). El propio GmBZL3 parece actuar como un factor intermediario para conectar las vías hormonales, al tener como diana a algunos genes relacionados a la señalización de auxinas, entre los que se encuentran las proteínas YUCCA3 y SAUR (Song *et al.* 2019), estas últimas se han encontrado expresadas de forma diferencial en el transcriptoma de tarwi sometido a estrés por sequía (Sección Hormonas-Auxina). Todos estos hallazgos señalan la presencia de una serie de interacciones que comprenden las vías hormonales de AG, ABA, AJ y auxinas, las cuales intervienen en las respuestas vegetales a sequía (Golldack *et al.* 2014) y pueden observarse en tarwi.

#### **b.5.6. Citoquininas**

Las citoquininas son compuestos con una estructura nucleotídica, que se asemeja a la adenina. Usualmente están ligadas una cadena isopentenilo que les proporciona especificidad y actividad (Le Bris 2017; Srivastava 2002). El paso principal de la ruta de biosíntesis de citoquininas es la transferencia del grupo isopentenilo del difosfato de

dimetilalilo (DMAPP), a ATP, ADP o AMP, catalizada por Isopentenil transferasas (IPT) (Bielach *et al.* 2017; Le Bris 2017). Las concentraciones de citoquininas son altas en las regiones meristemáticas y en áreas de crecimiento continuo, como la raíz de la zona subapical, hojas jóvenes y frutos y semillas en desarrollo, donde promueven la división celular (Srivastava 2002). El transporte de las citoquininas se realiza de manera diferencial. Diferentes especies de citoquininas son translocadas entre diferentes órganos vegetales. Las citoquininas del tipo de zeatina son transportados a través del xilema, de las raíces a los tallos. Mientras que los del tipo isopentenilos, son transportados por el floema sistemáticamente o de los brotes a las raíces (Zürcher y Müller 2016). Como parte del sistema hormonal, las citoquininas cumplen un rol central en el desarrollo vegetal. Estas hormonas afectan la embriogénesis, actividad de los meristemos de raíz y tallo, desarrollo de órganos y vascularización, formación de nódulos, dominancia apical y respuesta a estímulos ambientales (Durán-Medina *et al.* 2017). A nivel molecular, los cambios en las concentraciones de citoquininas son capaces de originar variaciones en las concentraciones de EROs. Las plantas tratadas con citoquininas o las mutantes con producción o degradación de citoquinina alterados, muestran desbalance en la homeostasis de EROs, lo cual puede tener un efecto en la actividad de las enzimas de degradación de EROs, la peroxidación lipídica y la expresión de genes involucrados en la fotosíntesis y las respuestas a estrés abiótico (Bielach *et al.* 2017). En *Arabidopsis*, grass, soja, tabaco y girasol sometidas a estrés hídrico, se ha observado reducción de los niveles de citoquininas, principalmente a través de la modulación de su metabolismo y la regulación de la expresión de sus receptores (Pavlu *et al.* 2018). En tanto, en tarwi sometido a estrés hídrico, se observa expresión diferencial en 21 genes relacionados con citoquinina (Figura 23). La mayor parte de estos transcriptos fueron upregulados, con 13 genes (62%) mostrando sobreexpresión y ocho genes con represión (38%) (Anexo 17: Hormonas). Los genes sobreexpresados en esta leguminosa, parecen estar relacionados con la disminución de los niveles de citoquininas inducida de manera natural ante el estrés hídrico. En efecto, estos genes corresponden a enzimas que catalizan pasos necesarios para la reducción de las concentraciones de estas hormonas (Ding *et al.* 2015).

La disminución de los niveles de citoquininas se produce principalmente por inactivación irreversible de estos compuestos a través de dos reacciones diferentes. La primera es la formación de N-conjugados con glucosa, ribosa o alanina. La segunda es el clivaje oxidativo de la cadena de isopentenilo por las oxidasas/deshidrogenadas de citoquininas

(CKXs) (Le Bris 2017). Las oxidasas de citoquininas son flavoproteínas que contienen un dinucleótido de adenina flavina (FAD<sup>++</sup>) unido de forma covalente (Bilyeu *et al.* 2001). Estas enzimas actúan removiendo de forma oxidativa a las cadenas laterales de las citoquininas. Esta reacción produce adenina y el aldehído isopentenilo correspondiente. Debido a su actividad, estas enzimas cumplen un rol fundamental en la regulación de los niveles de citoquininas en las plantas (Jones y Schreiber 1997). En el transcriptoma de tarwi sometido a sequía que se presenta, se observaron tres transcritos correspondientes a estas enzimas (Figura 23). Dos de ellos correspondientes a cytokinin oxidase 3 (CKX3) (Glyma.17G054500 y Glyma.13G104600), los cuales mostraron sobreexpresión aumentada (logFC=4,0 y logFC=7,2) (Figura 23). Mientras que el tercer transcripto, corresponde a cytokinin oxidase 4 (CKX4) (Glyma.17G054600), el cual también fue sobreexpresado (logFC=5,0). Las CKXs han sido relacionadas con la disminución de niveles de citoquininas a diferentes niveles, lo cual, constituye una respuesta normal ante el estrés abiótico (Bilyeu *et al.* 2001). Estos resultados concuerdan con lo observado en *Brassica napus*, cuyo análisis de expresión ha demostrado que las CKXs cumplen un rol importante al regular las respuestas a estrés biótico y abiótico y estar relacionadas con el incremento de ABA (Liu *et al.* 2018). De hecho, las plantas de maíz que sobreexpresan CKXs muestran incremento en la tolerancia a salinidad y sequía, así como una mayor tolerancia al calor (Macková y Vanková 2013). Además, su actividad parece ser una ruta de conjunción de diferentes vías hormonales, al ser inducidas por diferentes hormonas, como ABA y CKs (Brugière *et al.* 2003). Esto puede deberse a que las CKXs presentan en su estructura génica, elementos de respuesta a auxinas, AG, AJ, AS y a etileno (Liu *et al.* 2018).

#### **b.5.7. Etileno**

De manera sorprendente, la sequía terminal en tarwi no indujo variaciones considerables en la vía de etileno. Se observaron solamente 9 transcritos expresados de forma diferencial (Figura 23). De estos, hubo represión en 3 genes (33%), y upregulación en 6 genes (67%) (Anexo 17: Hormonas). El etileno es una hormona volátil que contiene dos átomos de carbono y es sintetizado a partir de la metionina y el aminoácido no proteico ACC ácido 1-ácido carboxílico 1-aminociclopropano (Bleecker y Kende 2000). La metionina ingresa al ciclo de Yang, en el cual el precursor S-adenosilmetionina es sintetizado a partir de ATP y metionina por la S-adenosilmetionina sintetasa (Arraes *et al.* 2015). En tanto que ACC es sintetizado por la enzima Sintasa de ACC (ACS), cuyo

cofactor es el fosfato de piridoxal (PLP). La ACS es una enzima clave al limitar la síntesis de etileno y su actividad y regulación es importante en la respuesta a estrés (Bleecker y Kende 2000). En *Arabidopsis*, se han encontrado 8 enzimas ACS que codifican para una ACS activa, además de un gen para una enzima inactiva catalíticamente (AtACS1) (Yamagami *et al.* 2003). En tarwi sometido a sequía, se encontró downregulación ( $\log_{2}FC = -4,6$ ) en esta enzima 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12 (ACCS) (Glyma.09G152700) (Figura 23), lo cual señala una síntesis disminuida de esta hormona. Estos resultados podrían estar relacionados a la degradación mediada por Proteasoma 26S activada por las proteínas ligasas de ubiquitinas E3 (Wang *et al.* 2004). Este grupo de enzimas han sido upregulados en respuesta a sequía (Figura 23; Complejos ligasa de ubiquitina-Complejo ubiquitina-ligasa Cul4-RING E3 (WD40)). Además, la regulación de ACS también está relacionada a la activación de la señalización por kinasas de proteínas MAPK, las cuales participan en la estabilización de ACSs. En particular, las proteínas MAPK3 fosforilan el C terminal de esta enzima, lo cual evita la degradación de ACSs, favoreciendo la síntesis de etileno, e induciendo otras vías de señalización dependientes de etileno (Hanhn y Harter 2009). Tal como se mencionó en la sección Transducción de señal-Kinasas, las proteínas MAPK han sido expresadas de forma diferencial (Figura 23), lo cual podría estar relacionado con la regulación de los genes relacionados a etileno. Por último, los genes de esta vía hormonal, son afectados en diferente medida por auxinas, ABA, AS y estrés oxidativo, entre otros (Bleecker y Kende 2000; Khan *et al.* 2015; Larkindale y Knight 2002).



Figura 23. Genes regulatorios asociados a Hormonas en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### b.5.8. Epigenética

La regulación epigenética, modifica la arquitectura de la cromatina para regular la expresión génica en un loci específico del genoma (Han y Wagner 2014). Esta regulación se ha reportado en la memoria al estrés en plantas, permitiendo que las plantas preexpuestas a estrés toleren futuras exposiciones de un factor de estrés similar (Barnejee *et al.* 2017).

### **b.5.8.1. Complejos histonas**

Las histonas son proteínas básicas que interactúan con el ADN y permiten su empaquetamiento. Los componentes del núcleo de histonas en un nucleosoma son H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas tienen un alto contenido de aminoácidos básicos como lisina y arginina. Estos residuos básicos presentes en posiciones específicas son modificados por metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, etc. (Banerjee y Roychoudhury 2017). La modificación de estas proteínas está relacionada con el grado de condensación de la cromatina. De manera que el grado de acetilación y metilación de histonas afecta de manera positiva, la activación transcripcional (Ueda y Seki 2020). Los datos de expresión correspondientes a estas proteínas son presentados en el transcriptoma de tarwi (Figura 24). Su agrupación se realizó en 3 grupos: modificación de histonas H3-K9 (88 transcritos), metilación de histonas (14 transcritos) y otros (13 transcritos correspondientes a los procesos de Acetilación de histonas, Desacetilación de histonas, Isomerización prolil-peptidil de histonas y Modificación de histonas).

#### **b.5.8.1.1. Modificación de histonas H3-K9 (88)**

Dentro de las histonas que tuvieron más transcritos con expresión diferencial, se encontró a las histonas H3-K9. La modificación de estas histonas ha sido asociada con la activación transcripcional de diversos genes. La acetilación de estas histonas está ligada a la activación transcripcional (Peterson y Lanier 2004). Esto se ha observado en regiones codificantes de genes de respuesta a estrés tras el tratamiento con estrés por sequía (Kim *et al.* 2008), así como en los promotores de 14 genes de respuesta a sequía y salinidad, seleccionados al azar en *Arabidopsis*, *Brachypodium* y arroz (Ueda y Seki 2020). Por otra parte, la metilación de H3K9 se ha asociado con la represión de la expresión en diversos loci y la conformación de heterocromatina (Zentner y Henikoff 2013). Además, la metilación de H3K9 por HDA6 y metiltransferasas de histonas SUVH4/5/6 ha sido relacionada con el silenciamiento de transposones (Yu *et al.* 2017). Dentro de estos procesos, destaca la disminución en la expresión de Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein en condiciones de sequía en tarwi. Esta proteína se ha relacionado con respuestas a estrés osmótico y sensibilidad al ABA en respuesta a estrés osmótico (Rosado *et al.* 2006) y esta reducción puede estar relacionada a la disminución en la vía de respuesta a ABA discutida en la sección Hormonas. Por otra parte, se observa expresión diferencial en ciclina A1 en el transcriptoma de tarwi sometido a sequía. Esta

es una de las proteínas esenciales para la progresión del ciclo celular, su sobreexpresión se ha observado en respuesta a tratamiento con Cd para reparar los ápices radiculares que mostraron altas tasas de estrés oxidativo (Sebastian y Prasad 2015). Esto podría indicar que la represión de este gen observada en tarwi sometido a sequía, está relacionada con la detención del ciclo celular en respuesta a estrés oxidativo severo.

Un grupo de proteínas de especial importancia son las MCM2-3-5, también denominadas MCM6. Estas proteínas de expresión controlada únicamente al final de la mitosis, han sido postuladas como un factor de licenciamiento entre las fases M y S que permite a las células realizar una división mitótica por cada ciclo celular normal (Tye 1994). El complejo MCM comprende 6 subunidades diferentes (MCM2-MCM7) que interactúan para formar un heterohexámero con forma de anillo con un canal central que permite rodear el ADN, y tiene funciones de helicasa y ATPasa e interactúa con las proteínas ORC para prevenir la replicación (Shultz *et al.* 2009). En *Arabidopsis*, un miembro de este grupo denominado PROLIFERA, ha sido identificado como un componente esencial para el desarrollo del embrión y del gametofito y otros tejidos en proliferación (Springer *et al.* 1995). En tanto, la sobreexpresión constitutiva de MCM6 de *Pisum sativum*, se induce en respuesta a estrés por salinidad y frío, sin afectar el rendimiento, sugiriendo su rol en la tolerancia a estos factores de estrés (Dang *et al.* 2011). En plantas de tabaco sometidas a sequía, se ha observado represión de los genes de minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein (Chen *et al.* 2017). En este trabajo, se ha encontrado que el transcrito correspondiente a minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein mostró una represión significativa ( $\log_{2}FC = -9.1$ ; Figura 24), lo cual podría estar relacionado la detención del crecimiento en condiciones de sequía.

#### **b.5.8.1.2. Metilación de histonas**

La regulación epigenética también involucra fenómenos como la metilación y desmetilación del ADN. Especialmente en las regiones promotoras de los genes. Los patrones de metilación han sido identificados en todos los organismos. En condiciones normales, 20-30% de citosinas en plantas, permanecen metiladas, dando 5-metilcitosina. Estas metilaciones ocurren en las islas CpG, CpNpG y CpHpH y también son responsables por los polimorfismos entre diferentes genotipos de plantas (Banerjee y Roychoudhury 2017). Las metiltransferasas y cromometilasas catalizan la metilación de cromatina al transferir el grupo metilo de la S-adenosilmetionina a residuos de citosina

(Banerjee y Roychoudhury 2017). Según los datos observados, la proteína SU(VAR)3-9, mostró disminución en la expresión en tarwi. Esta proteína y sus homólogos, están involucradas en la monometilación y dimetilación de la heterocromatina pericentromérica H3K9 y, por lo tanto, están involucradas en la modificación de la expresión génica (Manavella *et al.* 2013). En particular, se han encontrado 10 homólogos de Su(var)3-9 en *Arabidopsis*, estas proteínas han sido divididas en 4 subgrupos: SUVH1, SUVH2, SUVH4 y SUVH5. Aunque los miembros de la familia Su(var)3-9 han sido asociados con el silenciamiento de H3K9 por metilación, recientemente, se ha encontrado que cumplen roles antisilenciamiento (Li *et al.* 2016). Al actuar sobre la expresión de H3K9, afectan de forma significativa la respuesta a estrés (Asensi-Fabado *et al.* 2017).

Otro de los transcritos observados corresponde a la familia de factores de transcripción basic helix-loop-helix (bHLH). Este gen, anotado como Glyma.06G165000 (Figura 24) corresponde a Glycine max inducer of CBF expression 4 (ICE4) y muestra expresión disminuída en condiciones de estrés por sequía en tarwi. La expresión de este gen es inducida en respuesta a salinidad, estrés por frío y tratamiento con ABA (Agarwal *et al.* 2017). En particular, la respuesta al estrés por frío ocurre mediante la regulación de la transcripción de los genes CBF/DREB1, al unirse específicamente a la región promotora de los genes de respuesta a estrés CBF3/DREB1A (Miura *et al.* 2007). En plantas silvestres de *Arabidopsis*, la expresión de ICE1, un homólogo de esta proteína, reprimió la expresión de CBF3/DREB1A, incrementando la sensibilidad al frío (Miura *et al.* 2007). Teniendo en cuenta que las vías de señalización en respuesta a sequía son similares a las activadas con estrés por frío (Zandalinas *et al.* 2019). Este hallazgo sugiere que la represión observada en tarwi podría estar relacionada con la tolerancia a estrés por sequía.

#### **b.5.8.1.3. Otros**

Dentro de otros, se incluyeron procesos como la isomerización prolil-peptidil, acetilación y desacetilación de histonas. Estos procesos cumplen roles igual de importantes al regular el acceso del aparato de transcripción a regiones codificantes o regulatorias dentro del genoma (Ueda y Seki 2020). En particular, la acetilación de histonas en residuos conservados de lisina neutraliza las cargas positivas, lo cual disminuye su afinidad por el ADN cargado negativamente. Esto promueve la accesibilidad de los factores de transcripción dedicados, a la cromatina, lo cual resulta en un aumento en la transcripción (Banerjee y Roychoudhury 2017). La deacetilación, el proceso inverso, es regulado por

las enzimas deacetilasas de histonas (HDACs), las cuales juegan un rol esencial en la represión génica. Estos tipos de enzimas han mostrado expresión diferencial en el transcriptoma de tarwi (Anexo 18: Complejos histonas). Esto, permite inducir que estos procesos están involucrados en la regulación de la expresión génica en tarwi, así como ocurre con la respuesta de diversas especies vegetales a factores de estrés abiótico (Luo *et al.* 2017).

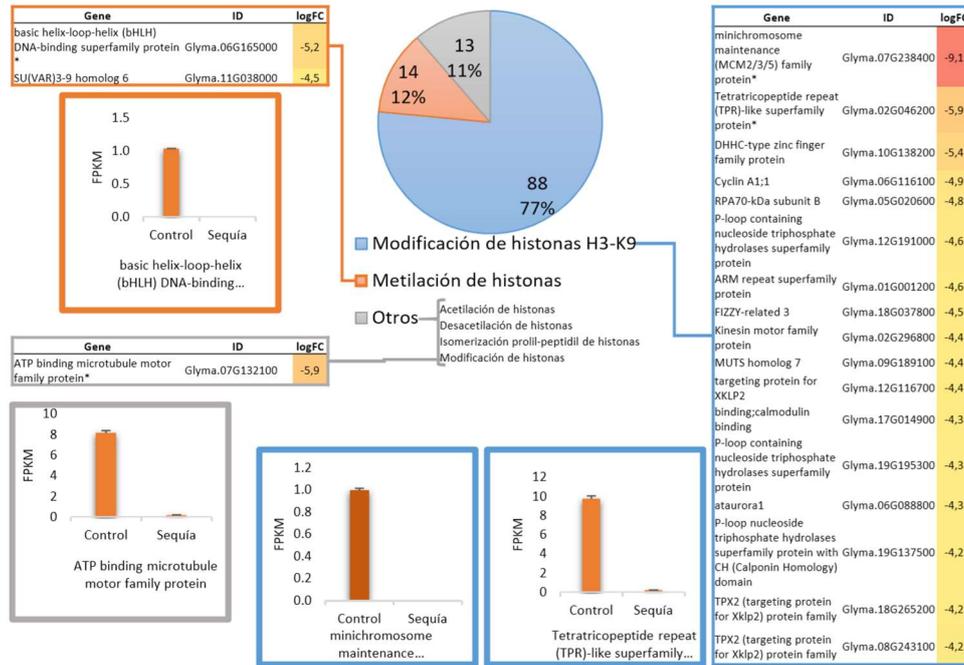


Figura 24. Genes regulatorios asociados a Complejos Histonas en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

### b.5.8.2. Cromatina

La regulación de la cromatina es esencial para regular actividades génicas y genómicas. En plantas, esto ocurre mediante la alteración de la modificación de histonas y la metilación del ADN. Dichas alteraciones son coordinadas con cambios en la expresión de los genes de respuesta a estrés para adaptarse a cambios ambientales (Kim *et al.* 2015). Por lo tanto, la variación observada en los transcritos relacionados con cromatina en tarwi sometido a sequía, es un resultado esperado. Estos transcritos fueron agrupados en cromatina (107), nucleosoma (20), cromatina nuclear (18) y heterocromatina (9), los que son presentados en la Figura 25.

#### **b.5.8.2.1. Cromatina y cromatina nuclear**

El remodelamiento de la cromatina regula la expresión génica constitutiva y en respuesta a cambios ambientales, como la sequía. Por esta razón, durante el estrés, se observan cambios transcripcionales y cambios dinámicos en esta estructura (Probst y Scheid 2015). Lo cual sustenta los resultados observados con relación a los procesos metabólicos cromatina y cromatina nuclear (Figura 25). Algunos de estos cambios son la disminución observada en la expresión del transcripto correspondiente a Factor de Transcripción Global Grupo B1 (GTF-B1). Este transcripto está relacionado a la proteína Spt6, la cual funciona como un complejo proteico en la iniciación de transcripción y también tiene un rol en el ensamblaje y la estructura de la cromatina (Fischbeck *et al.* 2002; Gavin *et al.* 2002). Por lo tanto, su represión podría indicar una desorganización de esta estructura. Además, esta proteína contiene repeticiones WG/GW, estando involucrada en la regulación de la polaridad basal-apical del embrión. Además, las plantas con versiones alteradas de esta proteína mostraron hipocotilos y raíz cortos, probablemente debido a la reducción de proliferación celular (Gu *et al.* 2012). De esta manera, la disminución observada en la expresión de GTF en estrés hídrico en tarwi podría explicar los fenómenos de disminución en la expresión génica y de la tasa de mitosis, son ampliamente documentados en diversas plantas sometidas a condiciones de estrés (Farooq *et al.* 2009).

Remodelado de la cromatina 24 (CR24) y exorribonucleasa 4 (XRN4) son genes con expresión diferencial relacionados con la reparación del daño que sufre la cromatina en condiciones de estrés (Figura 25). La disminución en la expresión de CR24 ( $\log_{FC}=4,0$ ) es otro hecho notorio. Esta proteína es una helicasa de ADN que actúa como un componente esencial del punto de control del ensamblaje del huso mitótico y que probablemente regula la recombinación homóloga y no homóloga (Johnson *et al.* 2011). Mutantes de *Arabidopsis* con esta proteína alterada han mostrado su función como proteína reparadora de la excisión y unión a la reparación de transcripción del ADN (Shaked *et al.* 2006). Por esta razón, su disminución, podría indicar una falla en los mecanismos de reparación del ADN en tarwi sometido a 10 días de sequía.

La sobreexpresión de XRN4 ( $\log_{FC}=4,5$ ; Figura 25) parece estar relacionada con las vías de etileno y el control post transcripcional de la expresión génica, en respuesta a estrés en la accesión de tarwi evaluada. Al producirse la transcripción, se producen moléculas de ARNm, que en eucariotas son modificados con la adición de 7-metilguanósina y

adenosina, para proteger los transcriptos. Algunos de estos transcriptos no son poliadenilados y deben ser removidos por la acción de XRN4. Esta enzima degrada el ARN 5' monofosforilado, lo cual constituye un proceso de regulación importante (Nagarajan *et al.* 2013). De hecho, las plantas de *Arabidopsis* carentes de XRN4, presentan elevación de transcriptos deadenilados sin degradar (Nagarajan *et al.* 2019). Esto parece ser de importancia en la degradación de ARNm asociados con las respuestas hormonales y al estrés (Potuschak *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2015; Nagarajan *et al.* 2019). Por ejemplo, se ha observado que los mutantes de *Arabidopsis* defectuosos en *xrn4* son insensibles al etileno como consecuencia de la sobreexpresión de proteínas ligadas a las rutas de esta hormona (Potuschak *et al.* 2006). Estudios de expresión genómica en *Arabidopsis* han demostrado que versiones mutantes defectuosas de *xrn4* ocasionan incremento en la tasa de sobrevivencia en plantas sometidas a estrés severo por altas temperaturas de corta duración (Nguyen *et al.* 2015). Otro de los efectos causados por la pérdida de XRN4 son la sensibilidad incrementada a oscuridad prolongada y las respuestas anormales de las raíces laterales durante la resuplementación con N (Nagarajan *et al.* 2019). Por último, XRN4 es un componente regulatorio en la respuesta a auxinas, al regular la cantidad de transcriptos de receptores de auxinas TIR1/AFB2 (Windels y Bucher 2018).

Con respecto a Cromatina Nuclear, se reporta la disminución a nivel transcripcional en la expresión de Mantenimiento de Minicromosoma (MCM2/3/5; Figura 25). La proteína codificada por este transcripto pertenece a una familia de proteínas que son esenciales puesto que aseguran que el genoma eucariota se replique tan solamente una vez por cada ciclo de división celular (Cho *et al.* 2008). Al final de la etapa G1, tiene lugar el licenciamiento celular, para lo cual se forma el complejo prerreplicativo. El complejo prerreplicativo está compuesto de cell división 6 (CDC6), el complejo de reconocimiento de origen, transcripto 1 dependiente de 10 de ciclos de división celular (Cdt1) y las proteínas de mantenimiento de minicromosomas 2-7 (MCM2-7). Luego, las kinasas dependientes de ciclinas específicas de la fase S fosforilan al complejo MCM, lo cual da inicio a la activación de los puntos de origen de replicación (Jung *et al.* 2019). Los MCMs eucariotas existen como dímeros, trímeros, tetrámeros y heterohexámeros y dímeros de heterotrímeros y monómeros. Entre estas, la clasificación más relevante se ha hecho entre subunidades núcleo catalíticas MCM4/6/7, y subunidades regulatorias MCM2/3/5 (Rizvi *et al.* 2016), grupo al cual pertenece el transcripto mencionado. Las proteínas MCM

presentan expresión más baja en hojas y tejidos en crecimiento (Cho *et al.* 2008). En tanto que la disminución en su expresión ocasiona hipersensibilidad al estrés por replicación de ADN en células humanas, las cuales acumulan lesiones en el ADN y eventualmente activan un punto de control que evita la división mitótica (Ibarra *et al.* 2008). En organismos vegetales, el rol de los MCMs en la replicación del ADN es igual de relevante al encontrarse sobreexpresado en tejidos en división celular activa, como los ápices de tallos o raíces o embriones en desarrollo (Tuteja *et al.* 2011). La disrupción del gen de MCM conlleva a letalidad durante el desarrollo del embrión, mientras que su sobreexpresión inhibe la endoreduplicación (Ni *et al.* 2009). En particular, trabajos realizados en arroz, demuestran que la proteína OsMCM2 disminuyó su expresión cuando los nutrientes fueron limitados. Lo cual señala que la expresión de MCM2, y por lo tanto, la progresión del ciclo celular, requieren una nutrición adecuada (Cho *et al.* 2008). Estos hallazgos, claramente contrastan con lo reportado en la sección correspondiente a Sequía en Etapa Vegetativa (Figura 9B- Contenido de elementos en la parte aérea). En dicha sección, se constata que la sequía en tarwi ocasiona disminución en los niveles de P, en la parte aérea. El P es de vital importancia al regular procesos energéticos, formación de ácidos nucleicos y progresión del ciclo celular (Mitra 2015). Por lo cual su déficit podría estar relacionado con la represión de esta proteína MCMC y la consecuente disminución del crecimiento observada en la Figura 9A (Progresión del desarrollo en condiciones de sequía). Sin embargo, para validar esta afirmación, se tendría que evaluar si la restricción de P en tarwi, es capaz de afectar la expresión de MCM en forma significativa.

#### **b.5.8.2.2. Nucleosoma**

Los nucleosomas son estructuras formadas por un octámero de proteínas histonas unidas al ADN. Su formación depende de la interacción de diversas proteínas, entre las cuales destaca la proteína nucleosome assembly protein 1 (NAP-1), la cual presenta 4 grupos (NAP1;1; NAP1;2; NAP1;3 Y NAP1;4) (Liu *et al.* 2009). De entre estas, el gen de la isoforma nucleosome assembly protein 1;3 (NAP1) presentó sobreexpresión en el transcriptoma de tarwi sometido a sequía (Figura 25). Esta proteína constituye la mayor isoforma a nivel de plántulas (Liu *et al.* 2009) y es un componente integral en el establecimiento, mantenimiento y dinámica de la cromatina en eucariotas (Park y Luger 2006). Su función es actuar como chaperona al transportar las histonas hacia el núcleo, ensamblar a los nucleosomas y promover la fluidez de la cromatina, afectando la transcripción de muchos genes (Tripathi *et al.* 2015). Además, otros estudios han

encontrado roles en la regulación específica de tejido, apoptosis, inactivación de histonas y regulación del ciclo celular (Park y Luger 2006).

Estudios con esta proteína han demostrado que plantas de *Arabidopsis* que expresan la proteína NAP defectuosa presentan un fenotipo con baja sensibilidad a ABA. En estas plantas, se observa alteración en la expresión de genes de respuesta a ABA, incluyendo protein quinasas, y reguladores de la transcripción, por lo cual desarrollan hipersensibilidad a estrés (Liu *et al.* 2009). Además, la expresión de algunos de los genes de esta familia se relaciona con tolerancia a estrés. Por ejemplo, en arroz, se ha observado correlación positiva entre la expresión de NAPL6 y la adaptación a múltiples factores de estrés abiótico. Las plantas que sobreexpresan OsNAPL6 mantienen el crecimiento y senescencia reducida incluso bajo condiciones de estrés por salinidad y sequía (Tripathi *et al.* 2016). Esta sobreexpresión se observa en la accesión de tarwi sometida a condiciones de sequía (logFC=4,3; Figura 25), indicando que esta proteína es importante en la respuesta a estrés por sequía.

#### **b.5.8.2.3. Heterocromatina**

La heterocromatina constitutiva, es una región de la cromatina que se encuentra en estado condensado, en la cual no hay expresión génica. Su importancia es estructural, puesto que comprende las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas, incluyendo ADN marcado por niveles altos de metilación asociado a histonas modificadas por marcas de represión (Tittel-Elmer *et al.* 2010). Las modificaciones de ADN e histonas en estas regiones, cumplen un rol clave en la expresión génica y el desarrollo vegetal durante el estrés (Chinnusamy y Zhu 2009). La mayor parte de estas modificaciones inducidas por estrés se devuelven al estado basal cuando el estrés se libera, mientras algunas de las modificaciones pueden ser estables, es decir, pueden ser transmitidas como una memoria de estrés y pueden ser heredadas por divisiones celulares mitóticas e incluso meióticas, asegurando la herencia estable de este estado de inercia (Chinnusamy y Zhu 2009; Tittel-Elmer *et al.* 2010). Ello explica el hecho de que se haya encontrado expresión diferencial en 9 genes de este grupo (Figura 25). De estos, se observó sobreexpresión en 4 genes (44%; Anexo 19: Cromatina), mientras que hubo represión en 5 transcritos (56%, Anexo 19: Cromatina).

En particular, la sobreexpresión del transcrito correspondiente al componente del Mantenimiento del Telómero Conservado 1 (CTC1) observada en tarwi ( $\log_{2}FC=5,6$ ; Figura 25), parece ser vital en condiciones de sequía. Este gen codifica una proteína que participa en la estabilización las regiones teloméricas en organismos eucariotas. En estas regiones, las proteínas CTC1(CDC13)/STN1/TEN1 forman un complejo CST (Jung *et al.* 2016). Este complejo trimérico es requerido para el mantenimiento del telómero al interactuar con los extremos teloméricos a través de la proteína CDC13, promoviendo y coordinando la replicación del ADN del telómero (Balestrazzi, 2015). La replicación y protección de los telómeros en *Arabidopsis* se da por la interacción de las proteínas AtCTC1 y AtSTN1 con la telomerasa activa (Leehy *et al.* 2013). De modo que plantas mutantes knock out de *Arabidopsis* para CTC1, muestran un fenotipo de desprotección dramática de los telómeros, con aparición rápida de defectos de desarrollo y esterilidad, e inestabilidad genómica severa (Surovtseva *et al.* 2009). Otro estudio desarrollado en *Arabidopsis*, encontró un pico en la expresión del complejo CST durante las primeras etapas de la germinación. Este cambio estuvo asociado con activación de genes de reparación del ADN, lo que conllevaría a preservar la integridad del genoma y asegurar la germinación exitosa. De esta manera, se ha demostrado que la formación del complejo CST asegura la activación de genes de reparación de ADN y de remodelación de la cromatina (Balestrazzi 2015). En condiciones de estrés, existe daño oxidativo a nivel de la parte aérea, lo cual activa la maquinaria de reparación celular (Nisa *et al.* 2019), por lo cual, la expresión de CTC1 podría estabilizar las regiones distales de la cromatina, evitando daños a regiones codificantes.

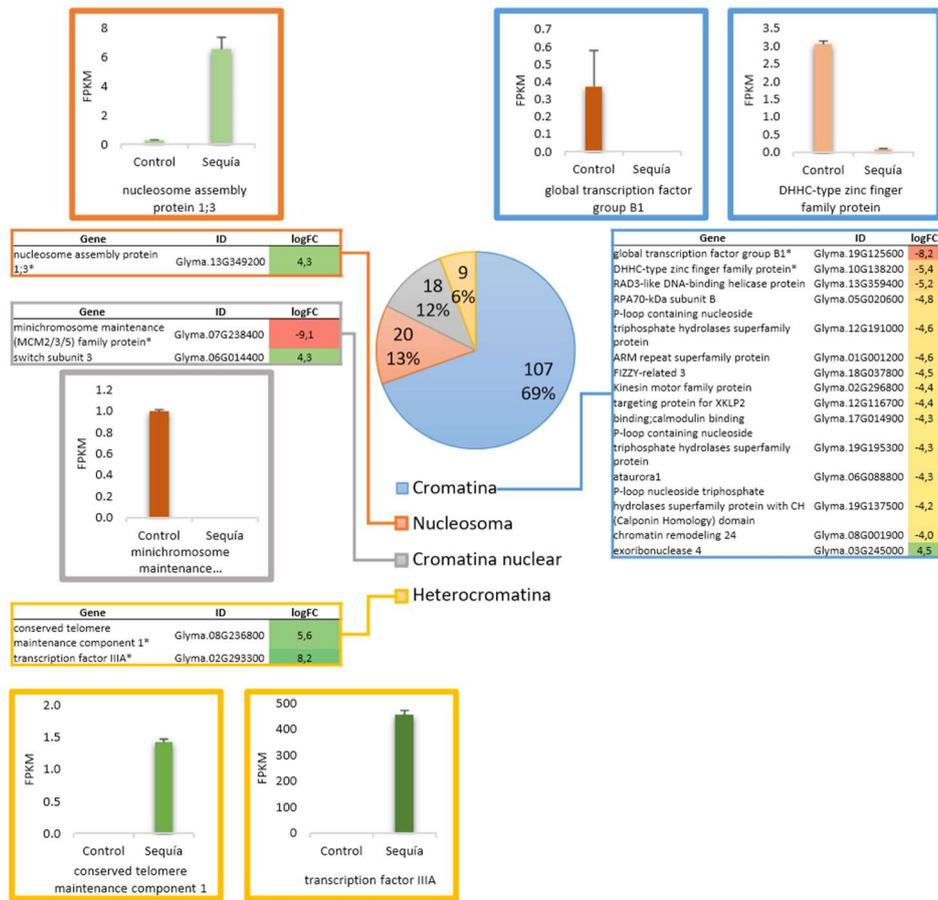


Figura 25. Genes regulatorios asociados a Cromatina en el transcriptoma de *L. mutabilis*.

## V. CONCLUSIONES

- La accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet), muestra tolerancia a sequía severa (1.51% [H<sub>2</sub>O]), siendo promisorio al poseer precocidad, mayor peso de semilla, mayor sobrevivencia a sequía, mayor peso seco de la parte aérea tras sequía y menor contenido de alcaloides.
- La respuesta a sequía en la accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet) incluye cambios fisiológicos y bioquímicos como la modificación del contenido de elementos en la parte aérea, y el incremento de niveles de prolina, principalmente en el periodo reproductivo.
- En la accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet), la respuesta a sequía está regulada por mecanismos genéticos basados en la expresión de genes funcionales pertenecientes a las rutas de detoxificación (431 genes), fosfolípidos (317 genes), canales y transportadores (452 genes), proteasas (200 genes), fotosíntesis (189 genes) y osmolitos (178 genes).
- La regulación de estas rutas afectadas por sequía en la accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet), se logra mediante la expresión de genes de regulación correspondientes a las vías de: transducción de señal (939 genes), hormonas (363 genes), factores de transcripción (330 genes), epigenética (267 genes), cromatina (154 genes) e histonas (113 genes).
- Las rutas principales que regulan la expresión de genes corriente abajo en la accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet) sometido a 10 días de sequía son las rutas de hormonas vegetales y factores de transcripción.
- A los 10 días de sequía, la accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet) presenta cambios transcriptómicos a nivel hormonal entre los cuales destaca el antagonismo entre las citoquininas y el ácido abscísico (ABA), y la inducción de la vía de auxinas.

- En la accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet), los genes relacionados con la tolerancia a sequía que tienen mayor relevancia incluyen a los factores de transcripción NAC, C2H2, MYB, ERF/AP2, MADS box, HSF y HB.
  
- La sobreexpresión de factores de transcripción dedos de Zinc IIIA/Glyma.02g29330; los factores de transcripción NAC Glyma.17g101500, Glyma.02g109800, Glyma.08g181100, Glyma.12g221500, Glyma.03g197900, Glyma.07g192900 y Glyma.05g025500; los miembros del grupo integrase-type DNA-binding superfamily protein con sus homólogos Glyma.08g257300, Glyma.16g164800 y Glyma.02g080200; están relacionados con tolerancia a estrés por sequía en la accesión P03 de tarwi (*L. mutabilis* Sweet), lo cual los hace candidatos para el mejoramiento de los cultivos.

## VI. RECOMENDACIONES

- La información presentada en este trabajo permitirá desarrollar marcadores moleculares de sequía basados en PCR, desarrollar variantes mediante transformación genética, y realizar análisis de metilación orientados a conocer la respuesta a sequía a nivel epigenético.
- Continuar con los estudios de los genes con mayor expresión diferencial, de manera que se pueda realizar su validación funcional y generar estrategias de mejoramiento biotecnológicas que permitan evaluar y aplicar la acción de estos genes en la tolerancia a estrés.
- Los datos generados mediante el análisis transcriptómico permitirán complementar la información en DroughtDB.
- Este trabajo proporciona las bases para realizar estudios de expresión heteróloga en *Arabidopsis*.
- Se hace necesario contar con un genoma de referencia de *L. mutabilis* para complementar este trabajo y fortalecer los programas de mejoramiento de este cultivo en Perú.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe H., Yamaguchi K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D., Shinozaki K. 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* 9 (10): 1859-1868.

Afzal A., Wood A., Lightfoot D. 2008. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(5):507-17.

Agarwal P., Gupta K., Lopato S., Agarwal P. 2017. Dehydration responsive element binding transcription factors and their applications for the engineering of stress tolerance. *J Exp Bot.* 68(9): 2135-2148.

Aharon R., Shahak Y., Wininger S., Bendov R., Kapulnik Y., Galili G. 2003. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15(1): 439-447.

Ahmad P., Prasad M. (eds). 2012. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Ed. Springer New York. 515 pp.

Ahmed I., Dai H., Zheng W., Cao F., Zhang G., Sun D., Wu F. 2013. Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiol Biochem.* 63(1): 49-60.

Ajum S., Xie X., Wang L., Saleem M., Man C., Lei W. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research.* 6(9): 2026-2032.

Akinci Ş. (ed). 2013. *Responses of organisms to water stress*. Ed. InTech Janeza Trdine. 190 pp.

- Ambawat S., Sharma P., Yadav N., Yadav R. 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19(3): 307-321.
- Amudha J., Balasubramani G. 2011. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 6(2): 31-58.
- Andreeva A., Kutuzov M. 2001. Nuclear localization of the plant protein Ser/Thr phosphatase PP7. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 4(1): 345–352.
- Andreeva A., Kutuzov M. 2009. PPEF/PP7 protein Ser/Thr phosphatases. *Cell. Mol. Life Sci.* 66(1): 3103–3110.
- Annicchiarico P., Romani M., Pecetti L. 2018. White lupin (*Lupinus albus*) variation for adaptation to severe drought stress. *Plant Breeding.* 136(5):782-789.
- Aroca R. 2012. *Plant Responses to Drought Stress* (en línea). Aroca, R (ed.). Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141(1): 391-396.
- Ashraf M. 2010. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances* 28(1): 169-183.
- Ashraf M., and Foolad M. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216.
- Ashraf M., Ozturk M. and Athar H (eds.). 2009. *Salinity and Water Stress Improving Crop Efficiency*. Ed. Springer Science & Business Media. 244 pp.
- Aslam M., Zamir M., Afzal I., Yaseen M., Mubeen M., Shoaib A. 2012. Drought stress, its effect on maize production and development of drought tolerance through potassium application. *Cercetări Agronomice În Moldova* 46(2): 99-144.
- Autoridad Nacional del Agua (ANA). 2010. *Plan de Prevención ante la presencia de fenómenos naturales por inundaciones, deslizamientos, huaycos y sequías*. Ministerio de Agricultura. Lima, Perú.

- Bahieldin A., Mahfouz H., Eissa H., Saleh O., Ramadan A., Ahmed I., Dyer W., El-Itriby H., Madkour M. 2005. Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 123(4): 421-427.
- Bähler M., and Rhoads A. 2001. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Letters* 513(1): 107-113.
- Baldoni E., Genga A., Cominelli E. 2015. Plant MYB transcription factors: Their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 16(7): 15811-15851.
- Balestrazzi A., Donà M., Macovei A., Sabatini M. E., Pagano A., Carbonera D. 2015. DNA repair and telomere maintenance during seed imbibition: correlation of transcriptional patterns. *Telomere Telomerase* 2(1): 1-4.
- Balta R., Rodríguez A., Guerrero R., Cachique D., Alva E., Arévalo L., Loli O. 2015. Absorción y concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en suelos ácidos, San Martín, Perú. *Folia Amazónica* 24(2): 123-130.
- Bandurska H., Stroiski A. 2005. The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol Plant* 27(1): 379–386.
- Banerjee A., Roychoudhury A. 2017. Epigenetic regulation during salinity and drought stress in plants: Histone modifications and DNA methylation *Plant Gene*. 11(1): 199-204.
- Banerjee A., Roychoudhury A. 2017. Epigenetic regulation during salinity and drought stress in plants: Histone modifications and DNA methylation. *Plant Gene* 11(1): 199–204.
- Banerjee A., Roychoudhury A. 2017. Epigenetic regulation during salinity and drought stress in plants: Histone modifications and DNA methylation. *Plant Gene*. 11: 199–204.
- Barbosa E., Leite J., Marin S., Marinho J., Carvalho J., Fuganti-Pagliarini R. 2013. Overexpression of the ABA-dependent AREB1 transcription factor from *Arabidopsis thaliana* improves soybean tolerance to water deficit. *Plant Mol. Biol.* 31(1): 719-730.
- Barret-Lennard E., Robson A., Greenway H. 1982. Effect of phosphorus deficiency and water deification phosphatase activity from wheat leaves. *J. Exp. Bot.* 33(1): 682-693.

- Bates L., Waldren R. and Teare I. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39(1): 205-207.
- Bellati J., Champeyroux C., Hem S., Rofidal V., Krouk G., Maurel C., Santoni V. 2016. Novel Aquaporin Regulatory Mechanisms Revealed by Interactomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 15(11): 3473-3487.
- Béziat C., Kleine-Vehn J. 2018. The road to auxin-dependent growth repression and promotion in apical hooks. *Current Biology* 28(8): 519-525.
- Bhattacharjee S., Saha A. 2014. Plant Water-Stress Response Mechanisms. In: Gaur R., Sharma P. (eds) *Approaches to Plant Stress and their Management*. Ed. Springer New Delhi. pp 149-172
- Bielach A., Hrtyan M., Tognetti V. 2017. Plants under Stress: Involvement of Auxin and Cytokinin. *Int J Mol Sci.* 18(7): 1427.
- Bilyeu K., Cole J., Laskey J., Riekhof W., Esparza T., Kramer M., Morris R. 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* 125(1): 378-86.
- Blakeslee J., Peer W., Murphy A. 2005. Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* 8(1): 494-500.
- Blakeslee J., Spatola T., Kriechbaumer V. 2019. Auxin biosynthesis: spatial regulation and adaptation to stress. *Journal of Experimental Botany* 70(19): 5041–5049.
- Bolaños J., Edmeades G. 1990. La importancia del intervalo de la floración en el mejoramiento para la resistencia a sequía en maíz tropical. *Agronomía Mesoamericana* 1(1): 45-50.
- 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(1): 248-254.
- Bray E. 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell Environ* 25(1): 153-161.

Browse J., Howe G. 2008. New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol* 146(1): 832-838.

Brugière N., Jiao S., Hantke S., Zinselmeier C., Roessler J., Niu X., Jones R., Habben J. 2003. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiol* 132(3): 1228-1240.

Bu Q., Jiang H., Li C., Zhai Q., Zhang J., Wu X., Sun J., Xie Q., Li C. 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res.* 18(7): 756-67.

Bürstenbinder K., Mitra D., Quegwer J. 2017. Functions of IQD proteins as hubs in cellular calcium and auxin signaling: A toolbox for shape formation and tissue-specification in plants? *Plant Signal Behav* 12(6): 1-4.

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.

Carretero-Paulet L., Galstyan A., Roig-Villanova I., Martínez-García J., Bilbao-Castro J., Robertson D. 2010. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol.* 153(3): 1398-412.

Carvalho I. 2005. Effects of Water Stress on the Proximate Composition and Mineral Contents of Seeds of two Lupins (*Lupinus albus* and *Lupinus mutabilis*). *Journal of Food Quality* 28(4): 325-332.

Carvalho I., Cândido R., Chaves M. 2004. Quality and Distribution of Assimilates within the Whole Plant of Lupines (*L. albus* and *L. mutabilis*) Influenced by Water Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 190(3): 205-210.

Carystinos G., MacDonald H., Monroy A., Dhindsa R., Poole R. 1995. *Plant Physiol.* 108(2): 641-649.

Casida J., Quistad G. 2005. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions* 157–158(1): 277-283.

Castilhos G., Lazzarotto F., Spagnolo-Fonini L., Bodanese-Zanettini M., Margis-Pinheiro M. 2014. Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. *Plant Science* 223(1): 1-7.

CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2013. *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2014*. IICA. Costa Rica. 230 p.

Chandler J., Cole M., Flier A., Werr W. 2009. BIM1, a bHLH protein involved in brassinosteroid signalling, controls Arabidopsis embryonic patterning via interaction with DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE. *Plant Mol Biol.* 69(1-2): 57-68.

Chaves M., Maroco J., Pereira J. 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30(1): 239-264.

Chen C., Shu J., Li C., Thapa R., Nguyen V., Yu K., Yuan Z., Kohalmi S., Liu J., Marsolais F., Huang S., Cui Y. 2019. RNA polymerase II-independent recruitment of SPT6L at transcription start sites in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 47(13): 6714-6725.

Chen C., Yu Y., Ding X., Liu B., Duanmu H., Zhu D., Zhu Y. 2017. Genome-wide analysis and expression profiling of PP2C clade D under saline and alkali stresses in wild soybean and Arabidopsis. *Protoplasma*, 255(2): 643–654.

Chen Q., Li M., Zhang Z., Tie W., Chen X., Jin L., Zhai N., Zheng Q., Zhang J., Wang R., Xu G., Zhang H., Liu P., Zhou H. 2017. Integrated mRNA and microRNA analysis identifies genes and small miRNA molecules associated with transcriptional and post-transcriptional-level responses to both drought stress and re-watering treatment in tobacco. *BMC Genomics*. 18(1):62.

Chen R., Baluska F. 2013. Polar auxin transport. *Series: Signaling and Communication in Plants*. Ed. Springer-Verlag. 330 pp.

- Chen W., Yao Q., Patil G., Agarwal G., Deshmukh R., Lin L., Wang B., Wang Y., Prince S., Song L., Xu D., An Y., Valliyodan B., Varshney R., Nguyen H. 2016. Identification and comparative analysis of differential gene expression in soybean leaf tissue under drought and flooding stress revealed by RNA-Seq. *Frontiers in Plant Science* 7(1): 1-19.
- Cheng Q., Tong Y., Wang Z., Su P., Gao W., Huang L. 2017. Molecular cloning and functional identification of a cDNA encoding 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase from *Tripterygium wilfordii*. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7(2): 208-214.
- Chini A. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448(1): 666-671.
- Chinnusamy V., Zhu J. 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12(2): 133-139.
- Cho J., Kim H., Kim H., Choi S. 2008. Identification and characterization of a rice MCM2 homologue required for DNA replication. *BMB Rep.* 41(8): 581-6.
- Chun S., Paramasivan M., Chandrasekaran M. 2018. Proline Accumulation Influenced by Osmotic Stress in Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic Plants. *Front. Microbiol.* 9 (1):2525.
- Ciríaco E., Almeida M., Custódio R., Bandeira M. 2011. Drought Stress and Plant Nutrition. *Plant Stress* 5(1): 32-41.
- Clements J., Sweetingham M., Smith L., Francis G., Thomas G., Sipsas S. 2008. Crop Improvement in *Lupinus mutabilis* for Australian Agriculture – Progress and Prospects. IN J.A. Palta and J.B. Berger (eds). 2008. ‘Lupins for Health and Wealth’ Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association.
- Cohen J. 2010. Beyond Population: Everyone Counts in Development. CGD Working Paper 220. Washington, D.C.: Center for Global Development.
- Collins J., O’Grady K., Chen S., Gurley W. 2019. The C-terminal WD40 repeats on the TOPLESS co-repressor function as a protein–protein interaction surface. *Plant Mol Biol* 100(1): 47-58.

Comino M., De Felipe M., Fernández M., Martín M. 1997. Effect of drought stress on carbohydrate metabolism in nodules of *Lupinus angustifolius*. Chapter 38 in *Eukaryotism and Symbiosis Intertaxonic combination versus Symbiotic adaptation*. Edited by Schenk H., Herrmann R., Jeon G., Müller N., Schwemmler W. 1997. Springer Berlin Heidelberg. 530 pp.

Coraspe H., Takashi M.; Vinicus I., Contreras F., Ocheuze P. 2009. Absorción de Macronutrientes por plantas de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en La Producción de Tubérculo-Semilla. *Agronomía Tropical*, 59 (1): 45-58.

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.

Damodaran S., Strader L. 2019. Indole 3-Butyric Acid Metabolism and Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 10(1): 851.

Dang H., Tran N., Gill S., Tuteja R., Tuteja N. 2011. A single subunit MCM6 from pea promotes salinity stress tolerance without affecting yield. *Plant Mol Biol* 76(1): 19-34.

De La Cruz J., Moreno L., Magniskiy S. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*. 27(2): 179-191.

Delker C., Stenzel I., Hause B., Miersch O., Feussner I., Wasternack C. 2006. Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*-enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)*. 8(3): 297-306.

Desclaux D., Roumet P. 1996. Impact of drought stress on the phenology of two soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars. *Field Crops Research*. 46(1): 61-70.

Devaiah B., Madhuvanathi R., Karthikeyan A., Raghothama K. 2009. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*. *Mol Plant*. 2(1): 43-58.

Dhakarey R., Raorane M.L., Treumann A., Peethambaran P.K., Schendel R.R., Sahi V.P., Hause B., Bunzel M., Henry A., Kohli A., Riemann M. 2017. Physiological and Proteomic Analysis of the Rice Mutant *cpm2* Suggests a Negative Regulatory Role of Jasmonic Acid in Drought Tolerance. *Front Plant Sci.* 10;8: 1903.

- Dible W., Truog E., Berger K. 1954. Boron determination in soils and plants: Simplified curcumin procedure. *Analytical Chemistry*. 26(2): 418-421.
- Dindas J., Scherzer S., Roelfsema M. et al. 2018. AUX1-mediated root hair auxin influx governs SCFTIR1/AFB-type Ca<sup>2+</sup> signaling. *Nat Commun* 9(1): 1174.
- Ding Y., Liu N., Virilouvet L., Riethoven J., Fromm M., Avramova Z. 2013. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 13(1): 229.
- Ding, L., Yan, S., Jiang, L., Zhao, W., Ning, K., Zhao, J., Liu, X., Zhang, J., Wang, Q., & Zhang, X. 2015. HANABA TARANU (HAN) Bridges Meristem and Organ Primordia Boundaries through PINHEAD, JAGGED, BLADE-ON-PETIOLE2 and CYTOKININ OXIDASE 3 during Flower Development in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 11(9), e1005479.
- Divi U., Rahman T., Krishna P. 2010. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol.* 10(1):151.
- Dong H, Tan J, Li M, Yu Y, Jia S, Zhang C, Wu Y, Liu Y. 2019. Transcriptome analysis of soybean WRKY TFs in response to *Peronospora manshurica* infection. *Genomics*. 111(6):1412-1422.
- Dorca-Fornell C., Gregis V., Grandi V., Coupland G., Colombo L., Kater M. 2011. The *Arabidopsis* SOC1-like genes AGL42, AGL71 and AGL72 promote flowering in the shoot apical and axillary meristems. *Plant J.* 67(6): 1006-1017.
- Douce R., Bourguignon J., Neuburger M., Rébeillé F. 2001. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci.* 6(4): 167-176.
- Du H., Liu H. and Xiong L. 2013. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.* 4(1): 397.
- Du L., Yang T., Puthanveetil S., Poovaiah B., Luan S. 2011. Decoding of calcium signal through calmodulin: calmodulin-binding proteins in plants coding and decoding of

calcium signals in plants in *Coding and Decoding of Calcium Signals in Plants*, ed. S. Luan (Berlin: Springer), 177-233.

Duarte J., Cui L., Wall P., Zhang Q., Zhang X., Leebens-Mack J., Ma H., Altman N., dePamphilis C. 2006. Expression pattern shifts following duplication indicative of subfunctionalization and neofunctionalization in regulatory genes of *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol.* 23(2):469-478.

Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 15(1): 573–581.

Durán-Medina Y., Díaz-Ramírez D., Marsch-Martínez N. 2017. Cytokinins on the Move. *Front. Plant Sci.* 8(1): 146.

Eapen D., Barroso M., Ponce G., Campos M., Cassab. 2005. Hydrotropism, root growth responses to water. *Trends. Plants Sci.* 10(1): 44-50.

Eastwood R., Drummond C., Schifino M. and Hughes C. 2008. Diversity and evolutionary history of Lupins – Insights from new Phylogenies. IN J.A. Palta and J.B. Berger (eds). 2008. ‘Lupins for Health and Wealth’ Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.

Eastwood R., Hughes C. 2008. Origins of domestication of *Lupinus mutabilis* in the Andes. IN J.A. Palta and J.B. Berger (eds). 2008 ‘Lupins for Health and Wealth’ Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.

Ehsanpour A., Amini F. 2003. Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under in vitro culture. *African Journal of Biotechnology.* 2(5): 133-135.

Elbehri A., Genest A., Burfisher M. 2011. Global Action on Climate Change in Agriculture: Linkages to Food Security, Markets and Trade Policies in Developing Countries. Trade and Markets Division Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2011. 96 pp.

Elewa T., Sadak M., Saad A. 2018. Proline treatment improves physiological responses in quinoa plants under drought stress. *Bioscience Research*. 14(1): 21-33.

Elrod-Erickson M., Rould M., Nekludova L., Pabo C. 1996. Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure*. 4(1): 1171-1180

Fahad S., Hussain S., Matloob A., Khan F., Khaliq A., Saud S., Huang J. 2014. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*. 75(2): 391–404.

Fahad S., Nie L., Chen Y., Wu C., Xiong D., Saud S., Huang J. 2015. Crop Plant Hormones and Environmental Stress. *Sustainable Agriculture Reviews*. 15(1): 371-400.

Fang Y., Xiong L. 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72(4): 673-689.

FAO (Food and Agriculture Organization, United Nations). 2003. Unlocking the water potential of agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 73 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization, United Nations). 2009. Cómo alimentar al mundo en 2050. Foro de expertos de alto nivel. Roma. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 28 pp.

Farooq M., Gogoi N., Barthakur S., Baroowa B., Bharadwaj N., Alghamdi S. 2017. Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *J. Agron. Crop Sci*. 203(1): 81-102.

Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29(1): 185-212.

Fayez K., Bazaid S. 2014. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *J. Saudi Soc. Agri. Sci*. 13(1): 45-55.

Feng R., Ren M., Lu L., Peng M., Guan X., Zhou D., Zhang M., Qi D., Li K., Tang W., Yun T., Chen Y., Wang F., Zhang D., Shen Q., Liang P., Zhang Y., Xie J. 2019.

Involvement of abscisic acid-responsive element-binding factors in cassava (*Manihot esculenta*) dehydration stress response. *Sci Rep.* 9(1): 12661.

Fernández-Calvo P., Chini A., Fernández-Barbero G., Chico J., Gimenez-Ibanez S., Geerinck J., Eeckhout D., Schweizer F., Godoy M., Franco-Zorrilla J., Pauwels L., Witters E., Puga M., Paz-Ares J., Goossens A., Reymond P., De Jaeger G., Solano R. 2011. The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell.* 23(2):701-15.

Finatto T., Viana V., Woyann L., Busanello C., da Maia L., de Oliveira A. 2018. Can WRKY transcription factors help plants to overcome environmental challenges? *Genetics and Molecular Biology.* 41(3): 533-544.

Finkelstein R., Gampala S., Rock C. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell.* 14(1): S15-S45.

Fischbeck J., Kraemer S., Stargell L. 2002. SPN1, a conserved yeast gene identified by suppression of a post-recruitment defective yeast TATA-binding protein mutant. *Genetics.* 162(1): 1605-1616.

Fischer C., Kugler A., Hoth S., Dietrich P. 2013. An IQ domain mediates the interaction with calmodulin in a plant cyclic nucleotide-gated channel. *Plant Cell Physiol.* 54(4): 573-584.

Flowers T. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany.* 55(396): 307-319.

Forcat S., Bennett M., Mansfield J., Grant, M. 2008. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods.* 4(1): 16.

Forestan C., Farinati S., Zambelli F., Pavesi G., Rossi V., Varotto S. 2020. Epigenetic signatures of stress adaptation and flowering regulation in response to extended drought and recovery in *Zea mays*. *Plant Cell Environ.* 43(1): 55-75.

Foyer C., Parry M., Noctor G. 2003. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot.* 54(1): 585-93.

Frackenpohl J., Bojack G., Baltz R., Bickers U., Busch M., Dittgen J., Wunschel C. 2018. Potent Analogues of Abscisic Acid - Identifying Cyano-Cyclopropyl Moieties as Promising Replacements for the Cyclohexenone Headgroup. *European Journal of Organic Chemistry.* 12(1): 1416-1425.

Franks S., Sim S., Weis A. 2007. Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proceedings of the National Academy of Sciences.* 104(4): 1278-1282.

Fu L., Ding Z., Han B., Hu W., Li Y., Zhang J. 2016. Physiological Investigation and Transcriptome Analysis of Polyethylene Glycol (PEG)-Induced Dehydration Stress in Cassava. *Int J Mol Sci.* 17(3):283.

Fu M., Kang H., Son S., Kim S., Nam K. 2014. A subset of Arabidopsis RAV transcription factors modulates drought and salt stress responses independent of ABA. *Plant Cell Physiol.* 55(11):1892-1904.

Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124(1): 509-525.

Galau G., Hughes D., Dure L. 1986. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol Biol.* 7(1): 155-170.

Gamsjaeger R., Liew C., Loughlin F., Crossley M., Mackay J. 2007. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci.* 32(1): 63-70.

Gan Y., Liu C., Yu H., Broun P. 2007. Integration of cytokinin and gibberellin signalling by Arabidopsis transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Development* 134(1): 2073-2081.

- García S., Trejo-Téllez L., Gómez F., Caldana C., Espinosa-Victoria D., Herrera B. 2012. Growth, photosynthetic activity, and potassium and sodium concentration in rice plants under salt stress. *Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá* 34(3): 317-324.
- Gavin A., Bosche M., Krause R., et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415(1):141-146.
- Gerloff S. 1977. Plant efficiencies in use of N, P and K. In: Wright MJ, editor. *Plant adaptation to mineral stress in problem soils*. New York Cornell Univ Press. 161-174.
- Giri J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6(11): 1746-1751.
- Giri J., Bhosale R., Huang, G. 2018. Rice auxin influx carrier OsAUX1 facilitates root hair elongation in response to low external phosphate. *Nat. Commun.* 9(1): 1408.
- Golldack D., Li C., Mohan H., Probst N. 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.* 5(1): 151.
- Goossens J., Fernández-Calvo P., Schweizer F., Goossens A. 2016. Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses. *Plant Molecular Biology* 91(6): 673-689.
- Grabarová S., Martinková M. 2001. Changes in mineral nutrition of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) under the impact of drought. *Ekologia-Bratislava* 20(1): 46-60.
- Greb T., Mylne J., Crevillen P., Geraldo N., An H., Gendall A., Dean C. 2007. The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis* FLC. *Curr Biol.* 17(1):73-78.
- Gu X., Wang H., Huang H., Cui X. 2012. SPT6L Encoding a Putative WG/GW-Repeat Protein Regulates Apical–Basal Polarity of Embryo in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 5(1): 249-259.
- Gulisano A., Alves S., Martins J., Trindade L. 2019. Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: An Emerging Protein Crop. *Frontiers in Plant Science* 10(1): 1385-1398.

Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci E., Cicek N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. Plant Physiol.* 164(1): 728-736.

Guo Q., Zhang J., Gao Q., Xing S., Li F., Wang W. 2008. Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* 165(1): 1745-1755.

Guo Q., Zou Q., Wang W. 2004. Physiological function of plant ubiquitin/26s proteasome pathway and its molecular biology. *Plant Physiol Commun* 40(1): 533-549.

Guo W., Chen S., Hussain N. 2015. Magnesium stress signaling in plant: Just a beginning. *Plant Signaling & Behavior* 10(3):e992287.

Guo W., David T. 2008. An Abscisic Acid-Induced Protein, HVA22, Inhibits Gibberellin-Mediated Programmed Cell Death in Cereal Aleurone Cells. *Plant Physiology* 147(4): 1710-1722.

Guo Y., Jiang Q., Hu Z., Sun X. 2018. Function of the auxin-responsive gene TaSAUR75 under salt and drought stress. *Crop Journal* 6(1): 181-190.

Guo Y., Ping W., Chen J., Zhu L., Zhao Y., Guo J., Huang Y. 2019. Meta-analysis of the effects of overexpression of WRKY transcription factors on plant responses to drought stress. *BMC Genetics* 20(1): 1-14.

Guo Y., Xu C., Sun X., Zheng H. 2019. TaSAUR78 enhances multiple abiotic stress tolerance by regulating the interacting gene TaVDAC1. *Journal of Integrative Agriculture* 18(12): 2682-2690.

Guo Y., Xu C., Sun X.. 2019. TaSAUR78 enhances multiple plant abiotic stress responses by regulating the interacting gene TaVDAC1. *Journal of Integrative Agriculture* 18(0): 2-10.

Gutiérrez-Luna F., Hernández-Domínguez E., Valencia-Turcotte L., Rodríguez-Sotres R. 2018. Review: "Pyrophosphate and pyrophosphatases in plants, their involvement in

stress responses and their possible relationship to secondary metabolism.” *Plant Science* 267(1): 11–19.

Gutterson N., Reuber, T. 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7(4): 465-471.

Haile M., Kang W. 2018. Transcriptome profiling of the coffee (*C. arabica* L.) seedlings under salt stress condition. *J Plant Biotechnol.* 45: 45-54.

Han S., Wagner D. 2014. Role of chromatin in water stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 65(10): 2785-2799.

Handakumbura P., Matos D., Osmont K., Harrington M., Heo K., Kafle K., Kim S., Baskin T., Hazen S. 2013. Perturbation of *Brachypodium distachyon* CELLULOSE SYNTHASE A4 or 7 results in abnormal cell walls. *BMC Plant Biol.* 11(13):131.

Hane J., Ming Y., Kamphuis L., Nelson M., Garg G., Atkins C., Bayer P., Bravo A., Bringans S., Cannon S., Edwards D., Foley R., Gao L., Harrison M., Huang W., Hurgobin B., Li S., Liu C., McGrath A., Morahan G., Murray J., Weller J., Jian J., Singh K. 2017. A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant-microbe interactions and legume evolution. 2017. A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant-microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnology Journal* 15(3): 318-330.

Harb A., Krishnan A., Ambavaram M., Pereira A. 2010. Molecular and physiological analysis of drought Stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154(1): 1254-1271.

Hayashi F., Ichino T., Osanai M., Wada K. 2000. Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and Cell Physiology* 41(10): 1096-1101.

He M. and Dijkstra F. 2014. Drought effect on plant nitrogen and phosphorus: a metaanalysis. *New Phytologist* 204(1): 924-931.

- Hedman H., Zhu T., von Arnold S., Sohlberg J. 2013. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. *BMC Plant Biol* 13(1): 89.
- Hickman R., Mendes M., Van Verk M., Van Dijken A., Di Sora J., Denby K., Pieterse C., Van Wees S. 2019. Transcriptional Dynamics of the Salicylic Acid Response and its Interplay with the Jasmonic Acid Pathway. *Frontiers in Plant Science* 5(1): 1-49.
- Hoang X., Nhi D., Thu N., Thao N., Tran L. 2017. Transcription Factors and Their Roles in Signal Transduction in Plants under Abiotic Stresses. *Curr Genomics*. 18(6): 483-497.
- Horváth E., Szalai G. Janda T. 2007. Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *J Plant Growth Regul* 26(1): 290-300.
- Hoskins J., Sharma S., Sathyanarayana B., Wickner S. 2001. Clp ATPases and their role in protein unfolding and degradation. *Advances in Protein Chemistry* 59(1): 413–429.
- Hsing Y., Chen Z., Shih M., Hsieh J., Chow T. 1995. Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. *Plant Molecular Biology* 29(4): 863-868.
- Hu W., Yan H., Luo S., Pan F., Wang Y., Xiang Y. 2018. Genome-wide analysis of poplar SAUR gene family and expression profiles under cold, polyethylene glycol and indole-3-acetic acid treatments. *Plant Physiology and Biochemistry* 128(1): 50-65.
- Hu Y., Schmidhalter U. 2001. Effects of salinity and macronutrient levels on micronutrients in wheat. *J Plant Nutr* 24(1): 273-281.
- Huang G., Ma S., Bai L., Zhang L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M., Guo Z. 2012. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports* 39(2): 969-987.
- Hubbard K., Nishimura N., Hitomi K., Getzoff E., Schroeder J. 2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes. Dev.* 24(16): 1695-1708.

Hughes C., Eastwood R. 2006. Island radiation on a continental scale: exceptional rates of species diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(1): 10334-10339.

Hussain S., Kayani M., Amjad M. 2011. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnology Progress* 27(2): 297-306.

Ibarra A., Schwob E., Méndez J. 2008. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(26): 8956-8961.

Iqbal N., Nazar R., Iqbal M., Masood A., Nafees A. 2011. Role of gibberellins in regulation of source sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Curr Sci* 100(1): 998-1007.

Iuchi S. 2001. Three classes of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci*. 58(1): 625-635.

Jacobsen S., Mujica A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Editores: Moraes M., Øllgaard B., Kvist L., Borchsenius F. & Balslev H. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz: 458-482.

Jagodzik P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. 2018. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front. Plant Sci*. 9(1): 1387.

Jenks M., Hasegawa P., Jain S. 2007. *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Jenks, MA; Hasegawa, PM; Jain, SM (eds.). Dordrecht, Springer Netherlands. 587-602.

Jia Q., Kong D., Li Q., Sun S., Song J., Zhu Y., Liang K., Ke Q., Lin W., Huang J. 2019. The Function of Inositol Phosphatases in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *Int J Mol Sci*. 20(16): 3999.

- Jin J., Zhang H., Kong L., Gao G., Luo J. 2014. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors, *Nucleic Acids Res.* 42(2014): D1182–D1187.
- Jodral-Segado A., Navarro-Alarcón M., De La Serrana H., López-Martínez D. 2006. Calcium and magnesium levels in agricultural soil and sewage sludge in an industrial area from Southeastern Spain: Relationship with plant (*Saccharum officinarum*) disposition. *Soil and Sediment Contamination* 15(1): 367-377.
- Johnson R., Hellens R., Love D. 2011. A transient assay for recombination demonstrates that *Arabidopsis* SNM1 and XRCC3 enhance non-homologous recombination. *Genet. Mol. Res.* 10(1): 2104-2132.
- Jones A., Assmann S. 2004. Plants: The latest model system for G protein research. *EMBO report* 5(1):572-588.
- Jones J. 1991. Kjeldahl method for nitrogen (N) determination. Micro Macro Publishing. Athens GA.
- Jones R., Schreiber B. 1997. Role and function of cytokinin oxidase in plants. *Plant Growth Regulation* 23(1): 123–134.
- Jongrunklang N., Toomsan B., Vorasoot N. 2011. Rooting traits of peanut genotypes with different yield responses to pre-flowering drought stress. *Field Crops Res* 120(1): 262–270.
- Joseph M., Papdi C., Kozma-Bognar L., Nagy I., Lopez-Carbonell M., Rigo G., Koncz C., Szabados L. 2014. The *Arabidopsis* ZINC FINGER PROTEIN3 interferes with abscisic acid and light signaling in seed germination and plant development. *Plant Physiol.* 165:1203-1220.
- Jung C., Lyou S., Yeu S., Kim M., Rhee S., Kim M. 2007. Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reproduction.* 26:1053–63.

- Jung I., Ahn J., Jung, S. Eun J. 2019. Overexpression of rice jacalin-related mannose-binding lectin (OsJAC1) enhances resistance to ionizing radiation in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.*19(1): 561.
- Kajander T., Kellosalo J., Goldman A. 2013. Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms. *FEBS Letters*, 587(13): 1863–1869.
- Kanaoka M., Pillitteri L., Fujii H., Yoshida Y., Bogenschutz N., Takabayashi J., Zhu J., Torii K. 2008. SCREAM/ICE1 and SCREAM2 Specify Three Cell-State Transitional Steps Leading to Arabidopsis Stomatal Differentiation. *The Plant Cell*. 20: 1775–1785.
- Kasai M., Nakamura T., Kudo N., Sato H., Maeshima M. and Sawada S. 1998. The activity of the root vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in ryce plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. *Plant Cell Physiol*. 39: 890-894.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1999. *Nat. Biotechnol.* 17: 287–291.
- Katagiri Y., Hashidoko Y., Ibrahim R., Tahara S. 2001. Activation of Isoflavone Biosynthesis in Excised Cotyledons of Lupinus Seedlings by Jasmonoids and Excess Light. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 56(11-12), 1038–1046.
- Kerk D., Bulgrien J., Smith D., Barsam B., Veretnik S., Gribskov M. 2002. The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* 129: 908–925
- Khan M., Fatma M., Per T., Anjum N., Khan N. 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 462.
- Khan W., Prithiviraj B., Smith D. 2003. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J. Plant Physiol*. 160: 485–492.
- Khosravifar S., Yarnia M., Benam M., Moghbeli A. 2008. Effect of potassium on drought tolerance in potato cv. Agria. *Journal of Food Agriculture and Environment* 6: 236-241.
- Kim E., Kim Y., Park S., Koo Y., Do Choi Y., Chung Y., Lee I., Kim J. 2009. Methyl jasmonate reduces grain yield by mediating stress signals to alter spikelet development in rice. *Plant Physiol* 149: 1751–176.

Kim J., To T., Ishida J., Morosawa T., Kawashima M., Matsui A., Toyoda T., Kimura H., Shinozaki K., Seki M. 2008. Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 49: 1580–1588.

Kishor P., Sangam S., Amrutha R., Laxmi P. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress. *Current science* 88(3): 424-438.

Kollist H., Zandalinas S., Sengupta S., Nuhkat M., Kangasjärvi J., Mittler R. 2019. Rapid Responses to Abiotic Stress: Priming the Landscape for the Signal Transduction Network. *Trends in Plant Science* 24(1): 25-37.

Kolukisaoglu U., Weinl S., Blazevic D., Batistic O., Kudla J. 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* 134: 43–58.

Kudla J., Batistic O., Hashimoto K. 2010. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22(1): 541–563.

Kuhn J., Boisson-Dernier A., Dizon M., Maktabi M., Schroeder J. 2006. The protein phosphatase *AtPP2CA* negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on *AtPP2CA* mRNA. *Plant Physiol.* 140:127–39.

Kuromori T., Mizoi J., Umezawa T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2014. *Drought Stress Signaling Network*. New York, NY, Springer New York. 383-409.

Kutuzov M., Andreeva A. 2001. Noncompetitive inhibition of plant protein Ser/Thr phosphatase PP7 by phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283(1): 93–96.

Laporte M., Shen B., Tarczynski M. 2002. Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *Journal of Experimental Botany* 53(369): 699-705.

Larcher W. 2006. *Physiological Plant Ecology* (4rd Edn), Rima, São Carlos, 550 pp.

- Lata C., Muthamilarasan M., Prasad M. 2015. Drought Stress Responses and Signal Transduction in Plants. In: Pandey G. (eds) Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants. Springer, New York, NY. 195–225.
- Le Bris M. 2017. Hormones in Growth and Development. Reference Module in Life Sciences. Elsevier Reference Collection. 10598.
- Le D., Nishiyama R., Watanabe Y., Mochida K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2011. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res.* 18, 263–276.
- Le Gall H., Philippe F., Domon J., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. 2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants* 4(1):12–166.
- Lee J., Xie X., Yang K., Zhang J., Lee S., Shippen D. 2016. Dynamic Interactions of Arabidopsis TEN1: Stabilizing Telomeres in Response to Heat Stress. *Plant Cell.* 28(9):2212-2224.
- Leehy K., Lee J., Song X., Renfrew K., Shippen D. 2013. MERISTEM DISORGANIZATION1 encodes TEN1, an essential telomere protein that modulates telomerase processivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 1343–1354.
- Lehmann S., Funck D., Szabados L., Rentsch D. 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39(4): 949-962.
- Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 405–430.
- Li F., Fu F., Sha L. 2009. Differential Expression of Serine/Threonine Protein Phosphatase Type-2C Under Drought Stress in Maize. *Plant Mol Biol Rep* 27: 29.
- Li F., Fu F., Sha L., He L., Li W. 2008. Differential Expression of Serine/Threonine Protein Phosphatase Type-2C Under Drought Stress in Maize. *Plant Molecular Biology Reporter* 27(1), 29–37.

Li Z., Liu C., Zhang Y., Wang B., Ran Q., Zhang J., Sunkar R. 2019. The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany* 70(19):5471-5486.

Liang J., Chen X., Deng G., Pan Z., Zhang H. 2017. Dehydration induced transcriptomic responses in two Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*) accessions distinguished by drought tolerance. *BMC Genomics* 18(1): 775.

Lira Salvador, Ricardo. 2007. *Fisiología Vegetal*. Editorial Trillas. 2da Edición. México. 116-120.

Liu F., Andersen M., Jensen C. 2003. Loss of pod set caused by drought stress is associated with water status and ABA content of reproductive structures in soybean. *Funct Plant Biol.* 30(3): 271-280.

Liu H., Li G., Chang H., Sun D., Zhou R., Li B. 2007. Calmodulin-binding protein phosphatase PP7 is involved in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 30(2):156-64.

Liu J., O'Rourke J., Bucciarelli B., Gronwald J., Vance C., Tu Z., Rydeen A., Yang S., Allan D., Uhde-Stone C., Miller S., Bozsoki Z. 2012. An RNA-Seq Transcriptome Analysis of Orthophosphate-Deficient White Lupin Reveals Novel Insights into Phosphorus Acclimation in Plants. *Plant Physiology* 161(2): 705-724.

Liu L., Hu X., Song J., Zong X., Li D., Li D. 2009. Over-expression of a *Zea mays* L. protein phosphatase 2C gene (ZmPP2C) in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt and drought. *Journal of Plant Physiology.* 166(5): 531–542.

Liu P., Zhang C., Ma J., Zhang L., Yang B., Tang X., Huang L., Zhou X., Lu K., Li J. 2018. Genome-Wide Identification and Expression Profiling of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase (CKX) Genes Reveal Likely Roles in Pod Development and Stress Responses in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Genes (Basel).* 9(3):168.

Liu Z., Gao J., Dong A., Shen W. 2009. A truncated *Arabidopsis* NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1, AtNAP1;3T, alters plant growth responses to abscisic acid and salt in the *Atnap1;3-2* mutant. *Mol Plant.* 2: 688-699.

- Liu Z., Zhu Y., Gao J., Yu F., Dong A., Shen W. 2009. Molecular and reverse genetic characterization of NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1 (NAP1) genes unravels their function in transcription and nucleotide excision repair in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 59: 27-38.
- Lokdarshi A., Conner W., McClintock C., Li T., Roberts D. 2016. *Arabidopsis* CML38, a Calcium Sensor That Localizes to Ribonucleoprotein Complexes under Hypoxia Stress. *Plant Physiol.* 170(2): 1046-1059.
- Lu L., Chen Y., Lu L., Lu Y., Li L. 2015. Transcriptome analysis reveals dynamic changes in the gene expression of tobacco seedlings under low potassium stress. *Journal of Genetics.* 94(3): 397–406.
- Luan S. 2003. Protein Phosphatases in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 63–92
- Luo X., Bai X., Zhu D., Li Y., Ji W., Cai H., Zhu, Y. 2011. GsZFP1, a new Cys2/His2-type zinc-finger protein, is a positive regulator of plant tolerance to cold and drought stress. *Planta.* 235(6): 1141–1155.
- Macková H., Vanková R. 2013. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *J. Exp. Bot.* 64: 2805.
- Madhava K., Raghavendra A. and Janardhan K. (eds.). 2006. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer. Netherlands. 15-39.
- Maeshima M. 2000. Vacuolar H(+)-pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta.* 1465(1-2): 37-51.
- Marchin R., Ossola A., Leishman M., Ellsworth D. 2020. A Simple Method for Simulating Drought Effects on Plants. *Front. Plant Sci.* 10:1715.
- Marschner P. 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd edition. Edited by Marschner P. Amsterdam, Netherlands: Elsevier/Academic Press (2011). 684.
- Matsuo N., Makino M., Banno H. 2011. *Arabidopsis* ENHANCER OF SHOOT REGENERATION (ESR)1 and ESR2 regulate in vitro shoot regeneration and their expressions are differentially regulated. *Plant Sci.* 181(1): 39-46.

- Mattioli R., Costantino P., Trovato M. 2009. Proline accumulation in plants. *Plant Signaling & Behavior* 4(11): 1016-1018.
- Matysik J., Alia B., Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* 82(5): 525-532.
- McCormack E., Tsai Y., Braam J. 2005. Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci.* 10: 383–389.
- Mehta R., Ponnuchamy M., Kumar J. 2017. Exploring drought stress-regulated genes in senna (*Cassia angustifolia* Vahl.): a transcriptomic approach. *Funct Integr Genomics* 17: 1–25.
- Melrose J., Perroy R., Careas S. 2015. *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*. 1st Ed. Springer, Dordrecht. 612.
- Mengel K., Kirkby E. 2001. *Principles of Plant Nutrition*. 5th ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Menges M., Doczi R., Okresz L., Morandini P., Mizzi L., Soloviev M. 2008. Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *New Phytol.* 179: 643–662.
- Merewitz E., Xu Y., Huang B. 2016. Differentially Expressed Genes Associated with Improved Drought Tolerance in Creeping Bentgrass Overexpressing a Gene for Cytokinin Biosynthesis. *PLoS ONE* 11(11): e0166676.
- Meyer A. 2008. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* 165(13):1390-1403.
- Meyre D., Leonardi A., Brisson G., Vartanian N. 2001. Drought-adaptive mechanisms involved in the escape/tolerance strategies of Arabidopsis Landsberg erecta and Columbia ecotypes and their F1 reciprocal progeny. *J Plant Physiol* 158:1145–1152.
- Mimura T. 1995. Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol* 36: 1–7.
- Mitra G. 2015. *Regulation of Nutrient Uptake by Plants*. New Delhi, Springer India.

- Mitsuda N., Ohme-Takagi M. 2009. Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. *Plant & cell physiology*. 50(7), 1232–1248.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10): 490-498.
- Miura K., Jin J., Lee J., Yoo C., Stirm V., Miura T., Ashworth E., Bressan R., Yun D., Hasegawa P. 2007. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19(4):1403-1414.
- Miura K., Tada Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front Plant Sci*. 5: 4.
- Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 1819(2): 86–96.
- Møller S., Kim Y., Kunkel T., Chua N. 2003. PP7 is a positive regulator of blue light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 15(5): 1111-9.
- Moreno Liz. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 27(2): 179-191.
- Murphy J., Riley J. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27: 31-36.
- Muthusamy S., Dalal M., Chinnusamy V., Bansal K. 2016. Differential Regulation of Genes Coding for Organelle and Cytosolic ClpATPases under Biotic and Abiotic Stresses in Wheat. *Front. Plant Sci*. 7:929.
- Nagarajan V., Jones C., Newbury S., Green P. 2013. XRN 5 →3 exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1829: 590–603.
- Nakata M., Matsumoto N., Tsugeki R., Rikirsch E., Laux T., Okada K. 2012. Roles of the middle domain-specific WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN genes in early development of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 519–535.

Napoleão T., Soares G., Vital C., Bastos C., Castro R., Loureiro M., Giordano A. 2017. Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Science*, 263: 46–54.

Napoleão T., Soares G., Vital C., Bastos C., Castro R., Loureiro M., Giordano A. 2017. Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Science*, 263: 46–54.

Narusaka Y., Nakashima K., Shinwari Z., Sakuma Y., Furihata T., Abe H., Narusaka M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* 34, 137-148.

Neale A., Biomstedt C., Brorson P., Le T., Guthridge K., Evans J. 2000. The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during severe drought stress. *Plant Cell Environ.* 23:265–77

Neil O., Tai-ping S., Frank G.. 2002. Gibberellin Signaling. *The Plant Cell.* 14 (1) S61-S80.

Nelson D., Sommers L. 1980. Total nitrogen analysis of soil and plant tissues. *Journal of Association of Official Analytical Chemists.* 63(4), 770-778.

Nguyen A., Matsui A., Tanaka M., Mizunashi K., Nakaminami K., Hayashi M., Iida K., Toyoda T., Nguyen D., Seki M. 2015. Loss of *Arabidopsis* 5'-3' Exoribonuclease AtXRN4 Function Enhances Heat Stress Tolerance of Plants Subjected to Severe Heat Stress. *Plant Cell Physiol.* 56(9):1762-72.

Ni D., Sozzani R., Blanchet S., Domenichini S., Reuzeau C., Cella R., Bergounioux C., Raynaud C. 2009. The *Arabidopsis* MCM2 gene is essential to embryo development and its over-expression alters root meristem function. *New Phytol.* 184:311–322.

Niazi H., Zaman B., Salim M., Mohammad A. 2007. Growth response, water relations and K/Na ratio in wheat under sodium and calcium interactions. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 11(1): 47-50.

Nisa M., Huang Y., Benhamed M., Raynaud C. 2019. The Plant DNA Damage Response: Signaling Pathways Leading to Growth Inhibition and Putative Role in Response to Stress Conditions. *Front. Plant Sci.* 10:653.

Novakova M., Dobrev P., Motyka V., Gaudinova A., Malbeck J., Pospisilova J. 2007. Cytokinin Function in Drought Stress Response and Subsequent Recovery. In: Xu Z., Li J., Xue Y., Yang W. (eds) *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Springer, Dordrecht.

Nuruzzaman M., Sharoni A., Kikuchi S. 2013. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* 4(9):1-16.

Ogunrinde A., Munro K., Davidson A., Ubaid M., Snedden W. 2017. Arabidopsis Calmodulin-Like Proteins, CML15 and CML16 Possess Biochemical Properties Distinct from Calmodulin and Show Non-overlapping Tissue Expression Patterns. *Front. Plant Sci.* 8: 2175.

Oh S., Song S., Kim Y., Jang H., Kim S., Kim M. 2005. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.* 138: 341–351.

Olins J., Lin L., Lee S., Trabucco G., MacKinnon K., Hazen S. 2018. Secondary Wall Regulating NACs Differentially Bind at the Promoter at a CELLULOSE SYNTHASE A4 Cis-eQTL. *Front. Plant Sci.* 9:1895.

Olmos E., Hellin E. 1997. Cytochemical localization of ATPase plasma membrane and acid phosphatase by cerium based in a salt-adapted cell line of *Pisum sativum*. *J. Exp. Bot.* 48: 1529-1535.

Osorio M., Bucker-Neto L., Castilhos G., Turchetto-Zolet A., Wiebke-Strohm B., Bodanese-Zanettini M., Margis-Pinheiro M. 2012. Identification and in silico characterization of soybean trihelix-GT and bHLH transcription factors involved in stress responses. *Genetics and Molecular Biology* 35(1): 233-246.

Palta J. 2000. Stress Interactions at the Cellular and Membrane Levels. *Hort. Sci.* 25(11): 1377.

- Palta J., Turner N., French R., Buirchell B. 2007. Physiological responses of lupin genotypes to terminal drought in a Mediterranean-type environment. *Annals of Applied Biology* 150(3): 269-279.
- Pandey B., Mehra P., Verma L., Bhadouria J., Giri J. 2017. OsHAD1, a Haloacid Dehalogenase-Like APase, Enhances Phosphate Accumulation. *Plant Physiol* 174(4): 2316-2332.
- Pandey G. 2015. Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants. 1st ed. Pandey, GK (ed.). New York, NY, Springer New York. Vol.1.
- Pandey G., Grant J., Cheong Y., Kim B., Li L., Luan S. 2005. ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 1185-1193.
- Pandey N., Iqbal Z., Pandey B., Sawant S. 2017. Phytohormones and Drought Stress: Plant Responses to Transcriptional Regulation. *Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress.* 477–504.
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Höfer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A. 2007. The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.* 145(4):1345-60.
- Park Y., Luger K. 2006. Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol.* 84(4): 549-58.
- Patonnier M., Peltier J., Marigo G. 1999. Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *J Exp Bot.* 50: 1223–31.
- Pavlů J., Novák J., Koukalová V., Luklová M., Brzobohatý B., Černý M. 2018. Cytokinin at the Crossroads of Abiotic Stress Signalling Pathways. *Int J Mol Sci.* 19(8): 2450.
- Péret B., Swarup K., Ferguson A., Seth M., Yang Y., Dhondt S. 2012. AUX1/LAX Genes Encode a Family of Auxin Influx Transporters That Perform Distinct Functions during Arabidopsis. *Dev. Plant Cell* 24: 1–12.

Péret B., Swarup K., Ferguson A., Seth M., Yang Y., Dhondt S., James N., Casimiro I., Perry P., Syed A., Yang H., Reemmer J., Venison E., Howells C., Perez-Amador M., Yun J., Alonso J., Beemster G., Laplaze L., Murphy A., Bennett M., Nielsen E., Swarup R. 2012. AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *Plant Cell* 24: 2874–2885

Pessaraki M. 2019. Handbook of Plant and Crop Stress, Fourth Edition. Pessaraki, M (ed.). Fourth edition. Books in Soils, Plants, and the Environment. CRC Press, Vol. 19990540.

Peterson C., Laniel M. 2004. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14: R546–R551.

Pineros M., Tester M. 1997. Calcium channels in higher plant cells: Selectivity, regulation and pharmacology. *J Exp Bot* 48: 551–577.

Pinheiro C., António C., Ortuño M., Dobrev P., Hartung W., Thomas-Oates J. Ricardo C., Vanková R., Chaves M., Wilson J. 2011. Initial water deficit effects on *Lupinus albus* photosynthetic performance, carbon metabolism, and hormonal balance: metabolic reorganization prior to early stress responses. *Journal of Experimental Botany* 62(14): 4965-4974.

Pinheiro C., Chaves M., Pinto C. 2001. Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany.* 52 (358): 1063-1070.

Pinheiro C., Cruz De Carvalho M., Bartels D., Ricardo C., Chaves M. 2008. Dehydrins in *Lupinus albus*: Pattern of protein accumulation in response to drought. *Functional Plant Biology* 35(1): 85-91.

Pinheiro C., Passarinho J. Pinto C. 2004. Effect of drought and rewatering on the metabolism of *Lupinus albus* organs. *Journal of Plant Physiology* 161: 1203–1210.

Pinheiro C., Passarinho J., Ricardo C. 2004. Effect of drought and rewatering on the metabolism of *Lupinus albus* organs. *Journal of Plant Physiology* 161(11): 1203-1210.

- Piotrowicz A., Dariusz M., Barbara A., Ryszard G. 2007. Different effects of soil drought on soluble carbohydrates of developing *Lupinus pilosus* and *Lupinus luteus* embryos. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 76 (2): 119-125.
- Pokhilko A., Ramos J., Holtan H., Maszle D., Khanna R., Millar A. 2011. Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: a hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* 270: 31–41.
- Premachandra G., Saneoka H., Fujita K., Ogata S. 2008. Water stress and potassium fertilization in field grown maize (*Zea mays* L.): Effects on leaf water relations and leaf rolling. *Journal of Agronomy and Crop Science* 170: 195-201.
- Qi J., Li J., Han X., Li R., Wu J., Yu H., Hu L., Xiao Y., Lu J., Lou Y. 2016. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase regulates development and herbivory-induced defense response in rice. *J Integr Plant Biol.* 58(6): 564-576.
- Rao M., Paliyath G., Ormrod D., Murr D., Watkins C. 1997. *Plant Physiology* 115 (1) 137-149.
- Ruan J., Zhou Y., Zhou M. 2019. Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *Int J Mol Sci.* 20(10): 2479.
- Schopfer P., Liskay A., Bechtold M., Frahry G., Wagner A. 2002. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta.* 214(6): 821-8.
- Seo M., Koshiba T. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7(1):41-8.
- Shaked H., Avivi-Ragolsky N., Levy A. 2006. Involvement of the Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling Gene Family in DNA Damage Response and Recombination. *Genetics* 173(1): 985-994.
- Shawquat A., Mamun A., Mahmud A., Bazzaz M., Hossain A., Alam S., Shamimuzzaman, Karim A. 2014. Effects of salt and water stress on leaf production, sodium and potassium ion accumulation in soybean. *Journal of Plant Sciences.* 2(5):209-214.

- Shenoy V., Kalagudi G. 2005. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology Advances*. 23(1): 501-513.
- Song L., Chen W., Wang B., Yao Q., Valliyodan B., Bai M., Zhao M., Ye H., Wang Z., Nguyen H. 2019. GmBZL3 acts as a major BR signaling regulator through crosstalk with multiple pathways in *Glycine max*. *BMC Plant Biol*. 19(1):86.
- Stortenbeker N, Bemer M. 2019. The SAUR gene family: the plant's toolbox for adaptation of growth and development. *J Exp Bot*. 70(1):17-27.
- Tafolla-Arellano J., González-León A., Tiznado-Hernández M., Zacarías L., Báez-Sañudo R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Rev. fitotec. mex* 36(1): 203.
- Tränkner M., Jákli B., Tavakol E., Geilfus C., Cakmak I., Ditter K., Senbayram M. 2016. Magnesium deficiency decreases biomass water-use efficiency and increases leaf water-use efficiency and oxidative stress in barley plants. *Plant Soil* 406(1): 409-423.
- Tuteja N., Sopory S. 2008. Plant Signaling in Stress, *Plant Signaling & Behavior*. 3:2, 79-86.
- Ueda M., Seki M. 2020. Histone Modifications Form Epigenetic Regulatory Networks to Regulate Abiotic Stress Response. *Plant Physiol*. 182(1):15-26.
- Windels D., Bucher E. 2018. The 5'-3' Exoribonuclease XRN4 Regulates Auxin Response via the Degradation of Auxin Receptor Transcripts. *Genes*. 9(12): 638.
- Xu C., Xia C., Xia Z., Zhou X., Huang J., Huang Z., Liu Y., Jiang Y., Casteel S., Zhang C. 2018. Physiological and transcriptomic responses of reproductive stage soybean to drought stress. *Plant Cell Rep*. 37(12): 1611-1624.
- Zhang P., Zhu Y., Luo X., Luo X., Zhou S. 2019. Comparative proteomic analysis provides insights into the complex responses to *Pseudoperonospora cubensis* infection of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Sci Rep*. 9: 9433.
- Zhou L., Liu Z., Liu Y., Kong D., Li T., Yu S., Mei H., Xu X., Liu H., Chen L., Luo L. 2016. A novel gene OsAHL1 improves both drought avoidance and drought tolerance in rice. *Scientific reports*, 6, 30264.

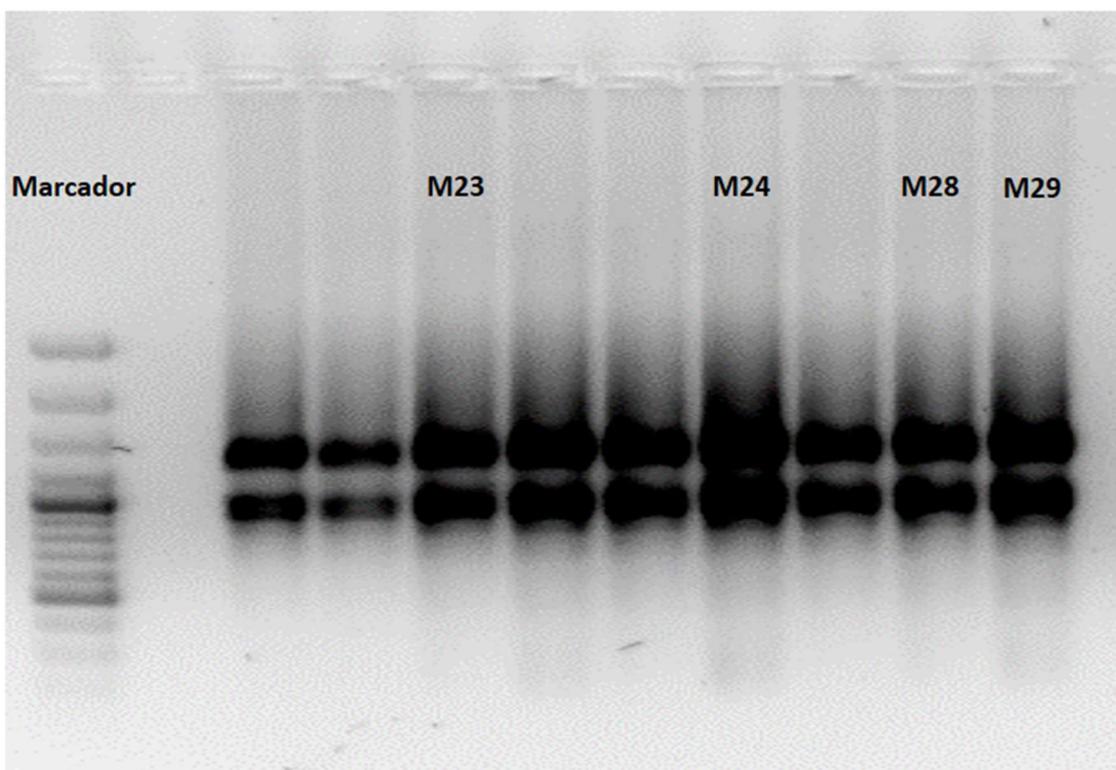
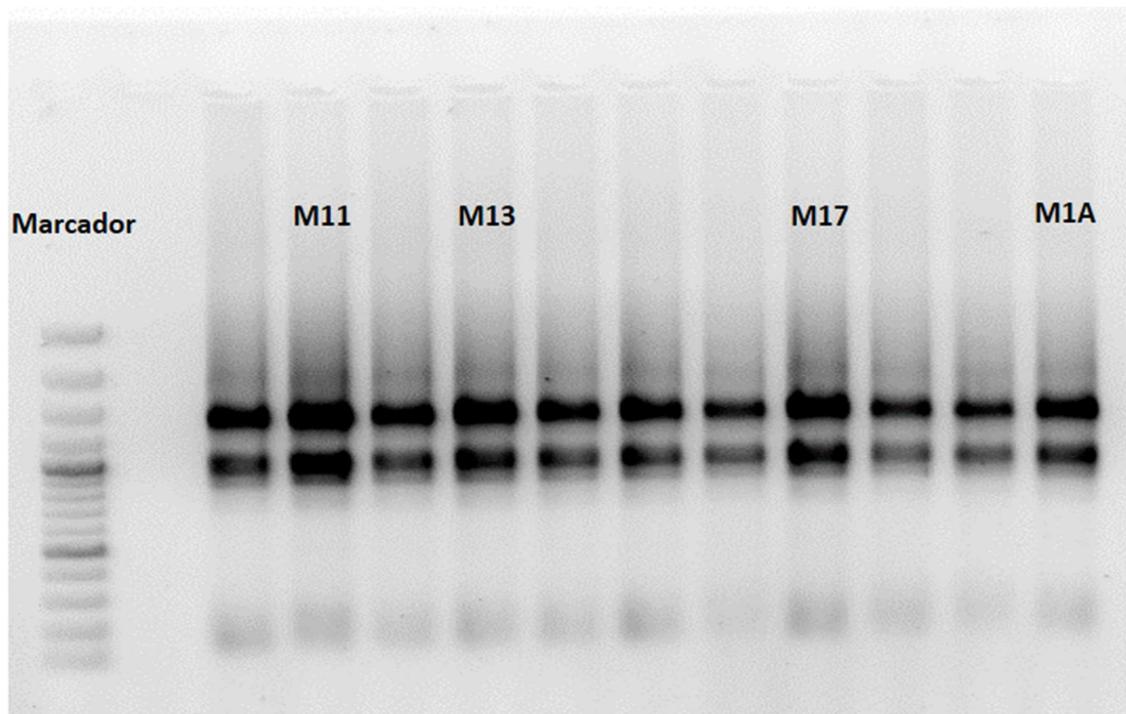
Zhu J. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167(2): 313-324.

## VIII. ANEXOS

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

Accesión	X S	Abreviatura	COD. ACCESIÓN	COLECCI	PAÍS	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	ECOTIPO	Días de floracion
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
T01	PER005303	02-0356	03-02-00336	TARWI	PERÚ	ANCASH	CARHUAZ	X SEMI TARDIO	140
T02	PER005304	02-0357	03-02-00337	TARWI	PERÚ	ANCASH	CARHUAZ	X SEMI TARDIO	140
T03	PER005336	02-0369	03-02-00369	TARWI	PERÚ	ANCASH	HUARI	X SEMI TARDIO	140
T04	PER005338	02-0371	03-02-00371	TARWI	PERÚ	ANCASH	HUARI	X SEMI TARDIO	140
T05	PER005339	02-0372	03-02-00372	TARWI	PERÚ	ANCASH	HUARI	X SEMI TARDIO	140
T06	PER005341	02-0374	03-02-00374	TARWI	PERÚ	ANCASH	HUARI	X SEMI TARDIO	140
T07	PER005345	02-0593	03-02-00593	TARWI	PERÚ	SIN DATOS	SIN DATOS	X SEMI TARDIO	140
T08	PER005347	02-0595	595	TARWI	PERÚ	ANCASH	-	X SEMI TARDIO	140
T09	PER005350	02-0597	03-02-00597	TARWI	PERÚ	SIN DATOS	SIN DATOS	X SEMI TARDIO	140
T10	PER005395	02-1165	03-02-01165	TARWI	PERÚ	ANCASH	YUNGAY	X SEMI TARDIO	140
T11	PER005402	02-1172	03-02-01172	TARWI	PERÚ	ANCASH	HUARI	X SEMI TARDIO	140
T12	PER004845	06-01862	3197	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CELENDIN	X TARDIO	153
T13	PER004847	06-01864	3199	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CELENDIN	X TARDIO	153
T14	PER004849	06-01866	3201	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CELENDIN	X TARDIO	153
T15	PER004850	06-01867	3203	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CAJAMARCA	X TARDIO	153
T16	PER004903	06-01920	3263	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CAJABAMBA	X TARDIO	153
T17	PER005006	06-01991	4015	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CAJABAMBA	X TARDIO	153
T18	PER005007	06-01992	4016	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CAJABAMBA	X TARDIO	153
T19	PER005121	06-2065	6727	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CELENDIN	X TARDIO	153
T20	PER005390	02-0633	03-02-00633	TARWI	PERÚ	SIN DATOS	SIN DATOS	X TARDIO	166
T21	PER005407	02-1177	03-02-01177	TARWI	PERÚ	HUANUCO	ANTONIO RAMONDI	X TARDIO	166
T22	PER005437	02-1772	03-02-01772	TARWI	PERÚ	ANCASH	CORONGO	X TARDIO	158
T23	PER005471	06-0407	03-06-00407	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CAJABAMBA	X TARDIO	166
T24	PER005485	06-0421	03-06-00421	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CELENDIN	X TARDIO	166
T25	PER005505	06-0441	03-06-00441	TARWI	PERÚ	CAJAMARCA	CUTERVO	X TARDIO	158

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



\*Las muestras etiquetadas fueron secuenciadas.

### 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.

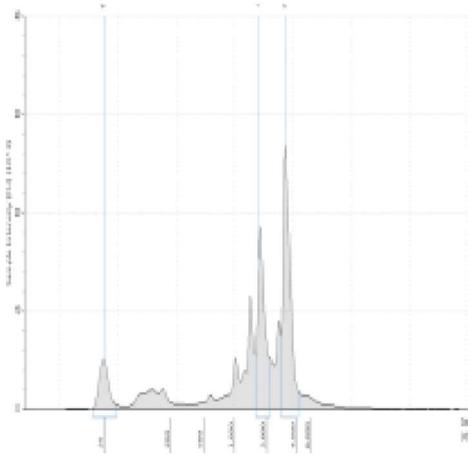
As 3 ul was taken from the sample for sample (library) QC purposes, the indicated volume represents 3ul less than the total volume received.

### QC Result of RNA

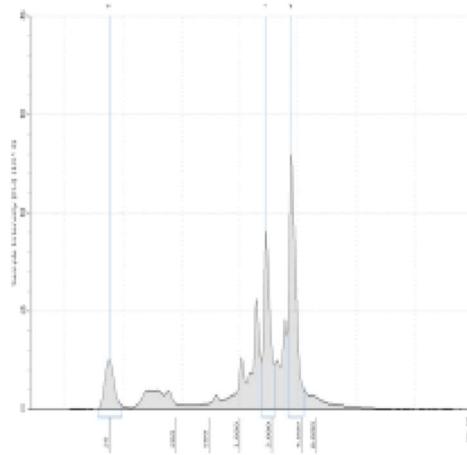
Experiment Date	2017-05-17	Tested by	LWC	Comment	
-----------------	------------	-----------	-----	---------	--

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	Result*
7	M11	181.475	50	9.074	7.1	Pass
8	M17	180.575	50	9.029	7.4	Pass
9	M1A	142.924	50	7.146	7.3	Pass
10	M23	123.236	50	6.162	7.3	Pass
11	M24	159.475	50	7.974	7.2	Pass
12	M29	154.083	50	7.704	7.3	Pass

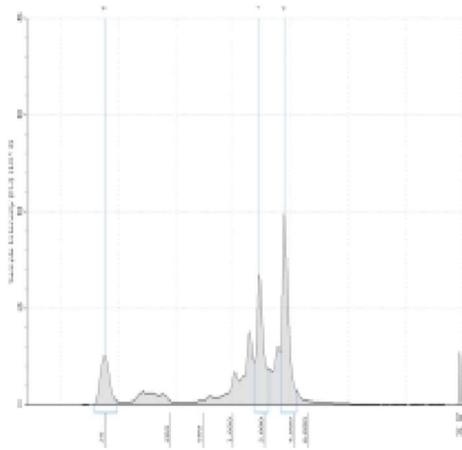
Click to Enlarge =>7:M11



Click to Enlarge =>8:M17



Click to Enlarge =>9:M1A



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>M11</b>	5,799,010,546	57,415,946	43.821	56.18	96.838	94.893
<b>M17</b>	5,162,300,082	51,111,882	43.864	56.14	96.976	95.075
<b>M1A</b>	4,924,410,944	48,756,544	44.027	55.97	96.77	94.78
<b>M23</b>	4,450,645,396	44,065,796	43.197	56.8	96.703	94.679
<b>M24</b>	4,397,283,864	43,537,464	43.105	56.9	96.858	94.895
<b>M29</b>	4,603,500,008	45,579,208	43.271	56.73	97.52	95.785
<b>PROMEDIO</b>	<b>4,889,525,140</b>	<b>48,411,140</b>	<b>44</b>	<b>56</b>	<b>97</b>	<b>95</b>

Anexo 5: Datos de reads iniciales y reads de alta calidad por muestra.

<b>NOMBRE MUESTRA</b>	<b>READS INICIALES</b>	<b>READS DE ALTA CALIDAD</b>
<b>M1A_1</b>	48756544	47660750
<b>M11_1</b>	57415946	55483344
<b>M17_1</b>	51111882	49530520
<b>M23_1</b>	44065796	42581464
<b>M24_1</b>	43537464	42283870
<b>M29_1</b>	45579208	44516680
<b>PROMEDIO</b>	<b>48411140</b>	<b>47009438</b>

## Anexo 6: Datos suplementarios de canales y transportadores

Descripción del gen	ID	logFC
delta tonoplast integral protein	Glyma.08G203000	-3.95
HCO3- transporter family	Glyma.19G219500	-3.87
proline transporter 2	AT3G55740.1	-3.84
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.07G217900	-3.75
Vacuolar iron transporter (VIT) family protein	Glyma.08G181900	-3.72
PsbQ-like 1	Glyma.12G215100	-3.52
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.09G024900	-3.49
peptide transporter 3	Glyma.02G003400	-3.42
plasma membrane intrinsic protein 2E	AT2G39010.1	-3.38
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.15G134400	-3.37
Mitochondrial substrate carrier family protein	Glyma.17G025600	-3.36
delta tonoplast integral protein	Glyma.07G018000	-3.28
tonoplast intrinsic protein 4;1	Glyma.04G083200	-3.26
plasma membrane intrinsic protein 1;4	Glyma.01G220600	-3.23
Xanthine/uracil permease family protein	Glyma.06G064700	-3.22
plasma membrane intrinsic protein 1;4	Glyma.05G208700	-3.21
putative ion channel POLLUX-like 2 isoform X2 [Lupinus angustifolius]	XP_019428671.1	-3.19
PsbQ-like 3	Glyma.11G204300	-3.18
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.20G014300	-3.16
MATE efflux family protein	Glyma.20G123500	-3.15
UDP-galactose transporter 2	Glyma.18G228100	-3.14
lysine histidine transporter 1	Glyma.16G062600	-3.13
P-glycoprotein 13	Glyma.14G220200	-3.12
nitrate transporter 1:2	Glyma.17G096800	-3.03
ABC-2 type transporter family protein	Glyma.20G163500	-2.92
gamma-soluble NSF attachment protein	Glyma.09G083100	-2.91
Transmembrane amino acid transporter family protein	AT5G02180.1	-2.85
YELLOW STRIPE like 3	Glyma.06G133000	-2.79
dicarboxylate transport 2.1	Glyma.08G177400	-2.78
Aluminium activated malate transporter family protein	Glyma.17G154200	-2.78
Magnesium transporter CorA-like family protein	Glyma.13G254800	-2.76
non-intrinsic ABC protein 7	Glyma.05G221600	-2.74
purine permease 1	Glyma.06G099400	-2.72
sodium hydrogen exchanger 2	Glyma.17G022500	-2.70
P-glycoprotein 2	Glyma.01G016500	-2.68
cyclic nucleotide gated channel 8	Glyma.07G022500	-2.65
Major facilitator superfamily protein	Glyma.18G299200	-2.65
Major facilitator superfamily protein	Glyma.19G126600	-2.65
oligopeptide transporter 7	Glyma.20G067300	-2.59
ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	Glyma.16G127300	-2.57
SEC14-like 12	Glyma.02G053200	-2.54
cyclic nucleotide-gated channel 14	Glyma.06G077600	-2.53
phosphoenolpyruvate (pep)/phosphate translocator 2	Glyma.19G005900	-2.52
Bacterial sec-independent translocation protein mttA/Hcf106	Glyma.20G161700	-2.48
nitrate transporter 1:2	Glyma.05G029900	-2.47
PsbQ-like 2	Glyma.01G050900	-2.47
HCO3- transporter family	Glyma.04G069500	-2.45
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.07G102500	-2.42

Mitochondrial substrate carrier family protein	Glyma.08G115600	-2.41
S-adenosylmethionine carrier 1	Glyma.05G185200	-2.29
pleiotropic drug resistance 4	Glyma.17G120100	-2.27
Secretory carrier membrane protein (SCAMP) family protein	Glyma.12G202000	-2.25
K <sup>+</sup> uptake permease 6	Glyma.08G056100	-2.24
aluminum-activated malate transporter 9	Glyma.05G233400	-2.22
structural maintenance of chromosomes 2	Glyma.13G202100	-2.19
plasma membrane intrinsic protein 2	Glyma.10G211000	-2.18
voltage dependent anion channel 4	Glyma.17G064100	-2.18
photosynthetic electron transfer C	Glyma.12G199400	-2.17
proteinaceous RNase P 1	Glyma.14G084800	-2.17
root cap 1 (RCP1)	Glyma.12G013400	-2.17
NOD26-like intrinsic protein 1;2	Glyma.13G224900	-2.16
Nucleotide/sugar transporter family protein	Glyma.12G174700	-2.15
Sodium Bile acid symporter family	Glyma.12G234600	-2.14
SCAMP family protein	Glyma.01G010300	-2.12
emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein	Glyma.13G061200	-2.10
UDP-galactose transporter 6	Glyma.10G296000	-2.09
Major facilitator superfamily protein	Glyma.15G066500	-2.06
Mitochondrial substrate carrier family protein	Glyma.08G272600	-2.05
multidrug resistance-associated protein 1	Glyma.06G312300	-2.05
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> transporter family	Glyma.09G031400	-2.04
non-intrinsic ABC protein 8	Glyma.09G147400	-2.03
nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein	Glyma.08G182500	-2.01
phosphate transporter 3;1	AT5G14040.1	2.00
proline transporter 1	Glyma.05G043100	2.04
Transmembrane amino acid transporter family protein	Glyma.11G234600	2.09
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.15G120800	2.12
amino acid transporter 1	Glyma.08G129600	2.14
peptide transporter 1	Glyma.18G064900	2.18
inositol transporter 2	Glyma.05G142500	2.20
sugar transporter 1	Glyma.08G059700	2.22
Transmembrane amino acid transporter family protein	Glyma.18G022400	2.27
nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein	Glyma.08G182700	2.30
bidirectional amino acid transporter 1	Glyma.06G156200	2.30
pleiotropic drug resistance 12	Glyma.03G168000	2.31
MATE efflux family protein	Glyma.04G097700	2.34
SKP1/ASK-interacting protein 16	Glyma.11G126500	2.34
Sec-independent periplasmic protein translocase	Glyma.20G123100	2.35
Amino acid permease family protein	Glyma.08G113400	2.38
YELLOW STRIPE like 1	Glyma.10G172900	2.39
Mitochondrial substrate carrier family protein	Glyma.15G015200	2.41
glycolipid transfer protein 2	Glyma.04G239900	2.42
peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3	Glyma.10G124700	2.47
Major facilitator superfamily protein	Glyma.05G030400	2.53
pleiotropic drug resistance 9	Glyma.07G233900	2.55
MATE efflux family protein	Glyma.01G216600	2.56
nitrate transporter 1.5	Glyma.17G153300	2.57
oligopeptide transporter 4	Glyma.15G059700	2.59
Major facilitator superfamily protein	Glyma.20G112900	2.63
Nucleotide/sugar transporter family protein	Glyma.17G211500	2.64
NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	Glyma.03G248500	2.67

polyol/monosaccharide transporter 5	Glyma.12G044700	2.72
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.06G030000	2.73
NOD26-like intrinsic protein 5;1	Glyma.10G221100	2.77
LAG1 longevity assurance homolog 3	Glyma.08G269700	2.79
Cation efflux family protein	Glyma.02G095400	2.84
Nodulin MtN3 family protein	Glyma.18G295100	2.86
glutamate receptor 2.7	Glyma.07G203700	2.96
golgi nucleotide sugar transporter 1	Glyma.06G153600	2.98
eukaryotic translation initiation factor 4E transporter-like [Tetranychus urticae].	XP_015785233.1	3.00
Y+L amino acid transporter 2-like [Pyrus x bretschneideri]	XP_009351107.1	3.07
amino acid permease 7	Glyma.18G071700	3.15
cyclic nucleotide-gated channel 13	Glyma.07G056400	3.20
cation exchanger 3	Glyma.03G058500	3.28
ATPase, F0/V0 complex, subunit C protein	AT1G19910.1	3.39
temperature-induced lipocalin	Glyma.17G075800	3.39
amino acid permease 2	Glyma.08G002400	3.40
MATE efflux family protein	Glyma.20G123300	3.45
amino acid permease 3	Glyma.04G246400	3.52
plasma membrane intrinsic protein 1A	Glyma.11G097800	3.57
pleiotropic drug resistance 11	Glyma.10G203000	3.60
Vacuolar protein sorting 55 (VPS55) family protein	Glyma.19G195900	3.72
Nodulin MtN3 family protein	Glyma.06G122200	3.72
Nucleotide/sugar transporter family protein	Glyma.06G218500	3.74
structural maintenance of chromosome 3	Glyma.13G062800	3.75
ADP/ATP carrier 2	Glyma.13G340500	3.79
oligopeptide transporter 5	Glyma.03G139100	3.87
Peroxidase superfamily protein	Glyma.17G061400	3.93

## Anexo 7: Metabolismo de fosfolípidos

Descripción del gen	ID	logFC
acyl carrier protein 4	Glyma.08G008800	-3.95
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Glyma.05G246500	-3.9
NDH-dependent cyclic electron flow 1	Glyma.13G356100	-3.85
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Glyma.07G102700	-3.77
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.13G232500	-3.75
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.15G134400	-3.37
phosphoinositide 4-kinase gamma 4	Glyma.01G226200	-3.37
4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Glyma.12G046000	-3.32
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Glyma.02G037000	-3.17
PHYTOENE SYNTHASE	Glyma.14G031200	-3.17
calcium sensing receptor	Glyma.05G016000	-3.11
Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	Glyma.20G201400	-3.07
homogentisate phytyltransferase 1	Glyma.13G097800	-3.02
NAD(P)H dehydrogenase 18	Glyma.10G000900	-3.01
NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Glyma.07G133200	-2.99
Ankyrin repeat family protein	Glyma.18G102100	-2.96
Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Glyma.06G131300	-2.9
fructose-bisphosphate aldolase 2	Glyma.04G008300	-2.88
plastid ribosomal protein l11	Glyma.01G201000	-2.88
Inositol monophosphatase family protein	Glyma.16G168000	-2.87
ribosomal protein L9	Glyma.12G081500	-2.87
Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.06G073600	-2.85
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Glyma.16G134400	-2.81
Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region	Glyma.04G083000	-2.74
ribosomal protein L4	Glyma.03G110100	-2.7
Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Glyma.07G041700	-2.64
starch branching enzyme 2.2	Glyma.04G017700	-2.63
Ribosomal protein L17 family protein	Glyma.18G049200	-2.62
Ribosomal protein L3 family protein	Glyma.04G002300	-2.61
Ribosomal protein L31	Glyma.14G072400	-2.59
ATP synthase delta-subunit gene	Glyma.17G130100	-2.57
NDH-dependent cyclic electron flow 1	Glyma.15G018000	-2.57
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.10G248600	-2.57
FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.11G124900	-2.56
calcium sensing receptor	Glyma.17G084300	-2.56
SEC14-like 12	Glyma.02G053200	-2.54
Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.05G014300	-2.51
ascorbate peroxidase 4	Glyma.14G177200	-2.51
Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region	Glyma.02G005100	-2.49
phosphoglycerate kinase 1	Glyma.13G045400	-2.49
Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	Glyma.05G026200	-2.49
Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein	Glyma.19G243800	-2.46
ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein	Glyma.03G235800	-2.45

2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	Glyma.20G114500	-2.43
Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	Glyma.02G173600	-2.42
RmlC-like cupins superfamily protein	Glyma.10G177000	-2.39
photosystem I light harvesting complex gene 6	Glyma.09G071400	-2.38
Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Glyma.06G223500	-2.37
chloroplast thylakoid lumen protein	Glyma.06G224200	-2.35
ribosomal protein S1	Glyma.15G136800	-2.34
thiaminC	Glyma.18G065700	-2.33
non-photochemical quenching 1	Glyma.19G251000	-2.31
Ribonuclease III family protein	Glyma.01G192200	-2.3
3-ketoacyl-CoA synthase 6	Glyma.20G115500	-2.29
Ribosomal L5P family protein	Glyma.18G237400	-2.28
homogentisate prenyltransferase	Glyma.02G168000	-2.26
fatty acid desaturase 6	Glyma.02G203300	-2.25
ALBINA 1	Glyma.11G016000	-2.23
Protein of unknown function (DUF616)	Glyma.07G197000	-2.22
chloroplast RNA binding	Glyma.03G230000	-2.19
stress enhanced protein 1	Glyma.20G127500	-2.18
calmodulin 5	AT2G27030.3	-2.18
proton gradient regulation 3	Glyma.06G061000	-2.17
root cap 1 (RCP1)	Glyma.12G013400	-2.17
CVP2 like 1	Glyma.01G235300	-2.16
hydroxymethylbilane synthase	Glyma.11G094700	-2.13
histone deacetylase 14	Glyma.05G192600	-2.13
CRS1 / YhbY (CRM) domain-containing protein	Glyma.09G183900	-2.13
Ribosomal protein S10p/S20e family protein	Glyma.18G079900	-2.12
2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	Glyma.01G081900	-2.1
non-photochemical quenching 1	Glyma.03G253500	-2.08
myo-inositol-1-phosphate synthase 3	Glyma.05G180600	-2.07
Chlorophyll A-B binding family protein	Glyma.17G147900	-2.06
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.15G080200	-2.06
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Glyma.02G143700	-2.05
cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3	Glyma.11G016200	-2.03
thylakoid lumen 18.3 kDa protein	Glyma.20G231600	-2.01
annexin 8	Glyma.13G199800	2.12
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.15G120800	2.121
staurosporin and temperature sensitive 3-like b	AT1G34130.1	2.187
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.03G004600	2.347
Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	Glyma.14G068400	2.347
annexin 3	Glyma.15G238500	2.443
Deoxyxylulose-5-phosphate synthase	Glyma.08G277100	2.509
homogentisate phytyltransferase 1	Glyma.17G061900	2.517
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.13G087900	2.518
DNAse I-like superfamily protein	Glyma.19G173900	2.596
alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Glyma.04G026500	2.712
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.06G030000	2.728
Deoxyxylulose-5-phosphate synthase	Glyma.08G277000	2.737
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase / HMG-CoA synthase / 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	Glyma.17G132300	2.751
GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein	Glyma.10G041000	2.851
cytochrome P450, family 83, subfamily B, polypeptide 1	Glyma.03G030600	2.975

phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransferase 2-like [Tetranychus urticae].	XP_015783981.1	2.977
triosephosphate isomerase	AT3G55440.1	3.075
Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region	Glyma.17G142900	3.162
hydroxy methylglutaryl CoA reductase 1	Glyma.16G113000	3.49
ENTH/ANTH/VHS superfamily protein	Glyma.13G100400	3.523
Vacuolar protein sorting 55 (VPS55) family protein	Glyma.19G195900	3.717
RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Glyma.09G205500	3.885

## Anexo 8: Fotosíntesis

Descripción del gen	ID	logFC
Dihydrodipicolinate reductase, bacterial/plant	Glyma.20G155600	-3.98
germin 3	Glyma.15G176900	-3.94
germin 3	Glyma.07G039100	-3.88
hydroxypyruvate reductase	Glyma.10G281400	-3.85
Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	Glyma.19G046600	-3.83
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.13G232500	-3.75
ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	Glyma.07G258500	-3.71
high cyclic electron flow 1	Glyma.18G193600	-3.68
PsbQ-like 1	Glyma.12G215100	-3.52
Phosphofructokinase family protein	Glyma.07G263800	-3.28
PsbQ-like 3	Glyma.11G204300	-3.18
calcium sensing receptor	Glyma.05G016000	-3.11
2-cysteine peroxiredoxin B	Glyma.10G078400	-3.06
NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Glyma.07G133200	-2.99
Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	Glyma.06G174200	-2.93
DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	Glyma.14G218200	-2.91
Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Glyma.06G131300	-2.90
fructose-biphosphate aldolase 2	Glyma.04G008300	-2.88
Inositol monophosphatase family protein	Glyma.16G168000	-2.87
Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.06G073600	-2.85
chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa	Glyma.10G026600	-2.81
plastocyanin 1	AT1G76100.1	-2.80
light harvesting complex photosystem II	Glyma.11G228800	-2.77
phytochrome B	Glyma.15G140000	-2.77
photosystem I light harvesting complex gene 5	Glyma.06G039700	-2.74
photosystem I P subunit	Glyma.07G049000	-2.72
PsbP-like protein 1	Glyma.18G286500	-2.70
glycine decarboxylase complex H	Glyma.11G042200	-2.69
Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.10G157000	-2.67
Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.03G123100	-2.64
photosystem II light harvesting complex gene 2.1	Glyma.14G008000	-2.62
high cyclic electron flow 1	Glyma.07G142700	-2.61
Ribosomal protein L31	Glyma.14G072400	-2.59
ATP synthase delta-subunit gene	Glyma.17G130100	-2.57
ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	Glyma.16G127300	-2.57
FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.11G124900	-2.56
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2	Glyma.19G106800	-2.56
calcium sensing receptor	Glyma.17G084300	-2.56
Photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.06G156100	-2.55
plastid transcriptionally active 16	Glyma.12G059600	-2.53
photosystem I subunit O	Glyma.11G181100	-2.52
ascorbate peroxidase 4	Glyma.14G177200	-2.51
photosystem I subunit K	Glyma.15G194300	-2.49
phosphoglycerate kinase 1	Glyma.13G045400	-2.49
Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	Glyma.05G026200	-2.49
plastocyanin 1	Glyma.06G020400	-2.48

photosystem II family protein	Glyma.12G202500	-2.48
rubisco activase	Glyma.11G221000	-2.48
light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4	Glyma.06G194900	-2.47
PsbQ-like 2	Glyma.01G050900	-2.47
Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein	Glyma.19G243800	-2.46
photosystem I light harvesting complex gene 2	Glyma.07G047600	-2.43
Photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.04G209900	-2.42
photosystem I light harvesting complex gene 1	Glyma.02G064700	-2.42
photosystem I subunit E-2	Glyma.10G042000	-2.40
serine transhydroxymethyltransferase 1	Glyma.08G274400	-2.40
photosystem I light harvesting complex gene 6	Glyma.09G071400	-2.38
Photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.10G153100	-2.37
2-cysteine peroxiredoxin B	Glyma.02G198400	-2.37
photosystem II subunit X	Glyma.09G073900	-2.36
Photosystem II reaction center PsbP family protein	Glyma.04G014500	-2.36
chloroplast thylakoid lumen protein	Glyma.06G224200	-2.35
cysteine synthase 26	Glyma.19G119200	-2.33
photosystem II subunit P-1	Glyma.08G304200	-2.32
photosystem II subunit O-2	Glyma.16G143600	-2.29
photosystem II family protein	Glyma.13G299200	-2.27
photosystem I P subunit	Glyma.16G017600	-2.27
photosystem I subunit H2	Glyma.08G204800	-2.25
fatty acid desaturase 6	Glyma.02G203300	-2.25
NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O	Glyma.06G153400	-2.24
PsbP-like protein 2	Glyma.20G098500	-2.23
ALBINA 1	Glyma.11G016000	-2.23
uridylyltransferase-related	Glyma.07G022700	-2.20
light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	Glyma.16G165800	-2.19
chloroplast RNA binding	Glyma.03G230000	-2.19
photosystem I subunit E-2	Glyma.13G129500	-2.18
light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	Glyma.12G219300	-2.17
photosynthetic electron transfer C	Glyma.12G199400	-2.17
hydroxymethylbilane synthase	Glyma.11G094700	-2.13
Ribosomal protein S10p/S20e family protein	Glyma.18G079900	-2.12
light harvesting complex photosystem II	Glyma.03G060300	-2.11
photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative / PSI-N, putative (PSAN)	Glyma.04G215800	-2.11
photosystem II subunit X	Glyma.04G055300	-2.08
Phosphofructokinase family protein	Glyma.09G007900	-2.08
myo-inositol-1-phosphate synthase 3	Glyma.05G180600	-2.07
Chlorophyll A-B binding family protein	Glyma.17G147900	-2.06
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.15G080200	-2.06
photosystem II BY	Glyma.11G245400	-2.05
phosphoribulokinase	Glyma.01G010200	-2.05
photosystem I subunit F	Glyma.05G022900	-2.04
photosystem I subunit D-2	Glyma.10G249000	-2.03
thylakoid lumen 18.3 kDa protein	Glyma.20G231600	-2.01
photosystem I subunit G	Glyma.06G321900	-2.01
ferretin 1	Glyma.07G155200	3.00
stress enhanced protein 2	Glyma.05G183500	3.08
aconitase 3	Glyma.12G098900	3.34
salt tolerance zinc finger	Glyma.20G133200	3.73

RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Glyma.09G205500	3.88
---	-----------------	------

## Anexo 9: Genes de detoxificación

Descripción del gen	ID	logFC
Dihydrodipicolinate reductase, bacterial/plant	Glyma.20G155600	-3.98
cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 26	Glyma.07G194300	-3.92
Peroxidase superfamily protein	Glyma.13G069400	-3.90
NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	Glyma.03G066600	-3.75
TESMIN/TSO1-like CXC 2	Glyma.01G236300	-3.70
Thioredoxin superfamily protein	Glyma.17G046500	-3.53
respiratory burst oxidase protein F	Glyma.05G021100	-3.39
SKU5 similar 5	Glyma.06G307100	-3.39
Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	Glyma.18G158700	-3.34
4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Glyma.12G046000	-3.32
NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Glyma.20G233000	-3.26
gibberellin 20 oxidase 2	Glyma.13G035600	-3.25
glyoxylate reductase 2	Glyma.13G349100	-3.24
cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 5	Glyma.19G240800	-3.22
Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	Glyma.01G231900	-3.14
laccase 6	Glyma.07G054200	-3.13
Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	Glyma.20G201400	-3.07
2-cysteine peroxiredoxin B	Glyma.10G078400	-3.06
NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Glyma.07G133200	-2.99
beta-hydroxylase 1	Glyma.16G179100	-2.98
laccase 17	Glyma.07G134100	-2.97
cinnamate-4-hydroxylase	Glyma.20G114200	-2.96
NADH-dependent glutamate synthase 1	Glyma.06G127400	-2.92
FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	Glyma.08G173600	-2.88
Copper amine oxidase family protein	Glyma.02G038500	-2.81
plastocyanin 1	AT1G76100.1	-2.80
cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 8	Glyma.07G069500	-2.78
cytochrome P450, family 93, subfamily D, polypeptide 1	Glyma.12G067000	-2.74
sodium hydrogen exchanger 2	Glyma.17G022500	-2.70
lipoamide dehydrogenase 1	Glyma.17G032300	-2.69
cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 1	Glyma.05G003000	-2.65
Ferritin/ribonucleotide reductase-like family protein	Glyma.16G056300	-2.62
cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2	AT2G29090.2	-2.60
ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	Glyma.16G127300	-2.57
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2	Glyma.19G106800	-2.56
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2	Glyma.16G044900	-2.53
Transcription factor jumonji (jnj) family protein / zinc finger (C5HC2 type) family protein	AT1G30810.2	-2.51
fatty acid desaturase 8	Glyma.14G194300	-2.51
ascorbate peroxidase 4	Glyma.14G177200	-2.51
ribonucleotide reductase 1	Glyma.04G217300	-2.50
protochlorophyllide oxidoreductase A	Glyma.06G247100	-2.49
cytochrome P450, family 77, subfamily A, polypeptide 4	Glyma.20G188000	-2.49
Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	Glyma.05G026200	-2.49
glutamate dehydrogenase 2	Glyma.17G148000	-2.48
2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Glyma.11G172500	-2.45
Radical SAM superfamily protein	Glyma.04G192800	-2.44
2-cysteine peroxiredoxin B	Glyma.02G198400	-2.37
cinnamyl alcohol dehydrogenase 9	Glyma.05G187700	-2.37

Peroxidase superfamily protein	Glyma.13G307000	-2.37
laccase 5	Glyma.14G056100	-2.35
Peroxidase superfamily protein	Glyma.03G007700	-2.35
non-photochemical quenching 1	Glyma.19G251000	-2.31
Fe superoxide dismutase 3	Glyma.20G050800	-2.27
SKU5 similar 5	Glyma.04G019500	-2.26
Cytochrome P450 superfamily protein	Glyma.06G202300	-2.25
SKU5 similar 5	Glyma.14G223000	-2.24
NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O	Glyma.06G153400	-2.24
NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Glyma.11G101400	-2.23
fatty acid hydroxylase 1	Glyma.15G132500	-2.20
SKU5 similar 4	Glyma.17G012300	-2.18
Glutamyl-tRNA reductase family protein	Glyma.14G185700	-2.17
photosynthetic electron transfer C	Glyma.12G199400	-2.17
laccase 17	Glyma.18G183500	-2.15
NADH dehydrogenase subunit J	ATCG00420.1	-2.15
glutathione S-transferase PHI 9	Glyma.08G306900	-2.15
Sodium Bile acid symporter family	Glyma.12G234600	-2.14
sterol 1	Glyma.13G044800	-2.13
oxidoreductases, acting on NADH or NADPH, quinone or similar compound as acceptor	Glyma.18G049600	-2.12
Fatty acid/sphingolipid desaturase	Glyma.18G120400	-2.10
Coproporphyrinogen III oxidase	AT1G03475.1	-2.08
non-photochemical quenching 1	Glyma.03G253500	-2.08
cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3	Glyma.11G016200	-2.03
sterol 4-alpha-methyl-oxidase 2-1	Glyma.02G030900	-2.02
NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	Glyma.09G169800	-2.01
gibberellin 2-oxidase	Glyma.13G218200	2.05
cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 3	Glyma.09G048800	2.08
cation/H <sup>+</sup> exchanger 17	AT4G23700.1	2.10
cytochrome P450, family 94, subfamily D, polypeptide 2	Glyma.03G122300	2.11
glycine decarboxylase P-protein 2	AT2G26080.1	2.12
catalase 2	Glyma.06G017900	2.19
lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	Glyma.13G115500	2.21
copper/zinc superoxide dismutase 2	AT2G28190.1	2.21
cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 6	Glyma.07G220500	2.25
cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 3	Glyma.09G049100	2.29
ferulic acid 5-hydroxylase 1	Glyma.01G169200	2.31
cytochrome P450, family 93, subfamily D, polypeptide 1	Glyma.07G202300	2.32
FMN binding	Glyma.19G112500	2.32
2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Glyma.19G062800	2.34
elicitor-activated gene 3-2	Glyma.16G096300	2.34
Cupredoxin superfamily protein	Glyma.U040600	2.35
nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 9	AT1G78390.1	2.40
UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	AT5G39320.1	2.44
6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	AT5G41670.2	2.50
2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Glyma.03G104300	2.50
2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Glyma.02G084400	2.63
2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Glyma.02G136000	2.73

flavanone 3-hydroxylase	Glyma.01G166200	2.75
2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Glyma.02G136200	2.78
brassinosteroid-6-oxidase 2	Glyma.18G272300	2.81
aldehyde dehydrogenase 6B2	Glyma.08G066600	2.83
cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 6	Glyma.20G018600	2.84
GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein	Glyma.10G041000	2.85
formate dehydrogenase	Glyma.19G009100	2.86
Aldolase-type TIM barrel family protein	Glyma.08G178100	2.88
glutathione S-transferase PHI 9	Glyma.18G111200	2.88
cytochrome P450, family 94, subfamily C, polypeptide 1	Glyma.12G087200	2.90
glutathione peroxidase 3	Glyma.08G047200	2.91
cytochrome P450, family 83, subfamily B, polypeptide 1	Glyma.03G030600	2.98
Amino acid dehydrogenase family protein	AT3G12290.1	3.00
GDP dissociation inhibitor family protein / Rab GTPase activator family protein	AT5G09550.1	3.00
cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 4	Glyma.16G149300	3.00
ferretin 1	Glyma.07G155200	3.00
Peroxidase superfamily protein	Glyma.16G164400	3.01
aldehyde dehydrogenase 2B4	AT3G48000.1	3.01
Lactate/malate dehydrogenase family protein	Glyma.10G006500	3.02
peroxidase 2	Glyma.09G109800	3.09
acyl-CoA oxidase 4	Glyma.18G202800	3.11
Ferritin/ribonucleotide reductase-like family protein	Glyma.19G091400	3.11
abscisic aldehyde oxidase 3	Glyma.02G272200	3.12
Methylenetetrahydrofolate reductase family protein	Glyma.18G278900	3.13
2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Glyma.18G164100	3.27
cation exchanger 3	Glyma.03G058500	3.28
catalytic LigB subunit of aromatic ring-opening dioxygenase family	Glyma.09G156900	3.28
succinate dehydrogenase 1-1	Glyma.02G057400	3.33
AAA-type ATPase family protein	AT2G27600.1	3.38
cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	Glyma.06G035300	3.43
cytochrome P450, family 93, subfamily D, polypeptide 1	Glyma.10G092500	3.44
FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	Glyma.11G179300	3.49
hydroxy methylglutaryl CoA reductase 1	Glyma.16G113000	3.49
DC1 domain-containing protein	Glyma.04G021000	3.51
aldehyde dehydrogenase 3H1	Glyma.06G114300	3.61
aldehyde dehydrogenase 3F1	Glyma.15G034400	3.67
Peroxidase superfamily protein	Glyma.17G061400	3.93

## Anexo 10: Osmolitos

<b>Descripción del gen</b>	<b>ID</b>	<b>logFC</b>
proline transporter 2	AT3G55740.1	-3.84
Glycine cleavage T-protein family	Glyma.17G012000	-3.81
terpene synthase 14	Glyma.07G187600	-3.79
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.03G200900	-3.37
Glycine cleavage T-protein family	Glyma.09G004700	-3.25
homogentisate phytyltransferase 1	Glyma.13G097800	-3.02
FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.05G245200	-2.91
fructose-bisphosphate aldolase 2	Glyma.04G008300	-2.88
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.03G122100	-2.85
FK506-binding protein 16-2	Glyma.08G139100	-2.73
glycine decarboxylase complex H	Glyma.11G042200	-2.69
Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Glyma.07G041700	-2.64
FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.11G124900	-2.56
Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein	Glyma.19G243800	-2.46
2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	Glyma.20G114500	-2.43
serine transhydroxymethyltransferase 1	Glyma.08G274400	-2.40
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.07G113200	-2.36
non-photochemical quenching 1	Glyma.19G251000	-2.31
3-ketoacyl-CoA synthase 6	Glyma.20G115500	-2.29
fatty acid desaturase 6	Glyma.02G203300	-2.25
FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.04G015400	-2.16
glutathione S-transferase PHI 9	Glyma.08G306900	-2.15
Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	Glyma.02G014800	-2.13
alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 2	Glyma.01G026700	-2.12
2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein	Glyma.01G081900	-2.10
non-photochemical quenching 1	Glyma.03G253500	-2.08
alanine:glyoxylate aminotransferase	Glyma.08G302600	-2.01
proline transporter 1	Glyma.05G043100	2.04
glycine decarboxylase P-protein 2	AT2G26080.1	2.12
amino acid transporter 1	Glyma.08G129600	2.14
GDSL-motif lipase 5	Glyma.16G012500	2.16
peptide transporter 1	Glyma.18G064900	2.18
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein	Glyma.04G100900	2.22
MYB-like 102	Glyma.15G066800	2.26
bidirectional amino acid transporter 1	Glyma.06G156200	2.30
MAC/Perforin domain-containing protein	Glyma.05G240200	2.36
Mitochondrial substrate carrier family protein	Glyma.15G015200	2.41
glutamine-dependent asparagine synthase 1	Glyma.14G195000	2.44
Deoxyxylulose-5-phosphate synthase	Glyma.08G277100	2.51
homogentisate phytyltransferase 1	Glyma.17G061900	2.52
Glutathione S-transferase family protein	Glyma.02G024800	2.53
HXXXD-type acyl-transferase family protein	Glyma.18G268300	2.64
CYS, MET, PRO, and GLY protein 1	Glyma.09G172100	2.65
polyol/monosaccharide transporter 5	Glyma.12G044700	2.72
Deoxyxylulose-5-phosphate synthase	Glyma.08G277000	2.74
MAC/Perforin domain-containing protein	Glyma.08G047300	2.76
ornithine-delta-aminotransferase	Glyma.05G141900	2.76
Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	Glyma.19G212300	2.78

glutathione S-transferase PHI 9	Glyma.18G111200	2.88
trehalose phosphatase/synthase 11	Glyma.13G092500	2.92
glutamine synthetase 1.3	AT3G17820.1	2.95
HXXXD-type acyl-transferase family protein	Glyma.18G268500	2.96
cytochrome P450, family 83, subfamily B, polypeptide 1	Glyma.03G030600	2.98
RING/U-box superfamily protein	Glyma.12G208600	2.99
aldehyde dehydrogenase 2B4	AT3G48000.1	3.01
Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	AT1G70730.3	3.04
Ras-related small GTP-binding family protein	Glyma.12G099700	3.11
Methylenetetrahydrofolate reductase family protein	Glyma.18G278900	3.13
ornithine-delta-aminotransferase	Glyma.08G097800	3.15
GDSL-motif lipase 5	Glyma.15G264200	3.25
Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	Glyma.02G088800	3.40
homolog of carrot EP3-3 chitinase	Glyma.13G346700	3.84

## Anexo 11: Factores de protección

<b>Descripción del gen</b>	<b>ID</b>	<b>logFC</b>
HVA22 homologue C	Glyma.02G105800	-2.99
Glycine-rich protein family	Glyma.08G023500	-2.22
late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein	Glyma.13G291800	2.16
Late embryogenesis abundant protein	Glyma.09G254300	2.21
Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	Glyma.08G239400	2.48
Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	Glyma.19G198600	2.64
Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	Glyma.14G208000	2.70
Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	Glyma.07G103900	3.29
Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	Glyma.08G019000	3.92

## Anexo 12: Proteasas

Descripción del gen	ID	logFC
subtilase 1.3	Glyma.16G201700	-3.93
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.01G084600	-3.69
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.04G136000	-3.48
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.02G098000	-3.45
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.13G196200	-3.42
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.15G234300	-3.41
serine carboxypeptidase-like 17	Glyma.13G075200	-3.40
alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Glyma.17G073200	-3.37
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.03G200900	-3.37
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.08G162100	-3.35
serine carboxypeptidase-like 17	Glyma.20G043400	-3.15
PPPDE putative thiol peptidase family protein	Glyma.20G007800	-3.08
Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	Glyma.07G050200	-3.06
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.20G100900	-3.03
Trypsin family protein with PDZ domain	Glyma.13G063400	-2.96
subtilase family protein	Glyma.13G222800	-2.92
signal peptide peptidase	Glyma.17G082700	-2.88
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.07G021200	-2.82
Subtilase family protein	Glyma.05G151000	-2.79
Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	Glyma.14G048000	-2.66
serine carboxypeptidase-like 20	Glyma.18G242900	-2.62
Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	Glyma.14G048200	-2.61
Subtilase family protein	Glyma.09G243700	-2.50
ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein	Glyma.03G235800	-2.45
Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.11G230700	-2.42
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.09G017900	-2.36
Granulin repeat cysteine protease family protein	Glyma.05G096800	-2.21
PPPDE putative thiol peptidase family protein	Glyma.17G249300	-2.19
FtsH extracellular protease family	AT4G23940.1	-2.17
subtilase family protein	Glyma.02G093400	-2.08
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.10G171300	-2.05
Subtilase family protein	Glyma.15G190800	-2.05
Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	Glyma.16G211700	2.07
Cytosol aminopeptidase family protein	Glyma.02G204000	2.14
serine carboxypeptidase-like 40	Glyma.14G080500	2.22
proteasome alpha subunit D2	Glyma.02G046400	2.23
aspartic proteinase A1	Glyma.19G225500	2.25
Matrixin family protein	Glyma.01G037200	2.33
Eukaryotic aspartyl protease family protein	Glyma.09G185900	2.38
xylem cysteine peptidase 2	Glyma.04G014800	2.38
RHOMBOID-like protein 15	Glyma.19G204000	2.40
Insulinase (Peptidase family M16) protein	Glyma.05G223700	2.57
probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta, mitochondrial [Ananas comosus]OAY82345.1 putative mitochondrial-processing peptidase subunit beta [Ananas comosus]	XP_020104768.1	2.58
IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 6	Glyma.06G115100	2.61
ubiquitin-specific protease 23	Glyma.02G203500	2.61
Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	Glyma.16G212500	2.64
probable signal peptidase complex subunit 2 [Tetranychus urticae].	XP_015782185.1	2.67

Matrixin family protein	Glyma.11G033400	2.70
proteasome alpha subunit A1	AT5G35590.1	2.71
20S proteasome beta subunit PBB2	Glyma.02G299000	2.90
20S proteasome alpha subunit G1	AT2G27020.1	2.91
20S proteasome alpha subunit C1	AT3G22110.1	2.92
serine carboxypeptidase-like 31	Glyma.13G183700	2.95
20S proteasome beta subunit E1	AT1G13060.1	2.97
Cysteine proteinases superfamily protein	Glyma.17G049000	3.09
RHOMBOID-like 1	Glyma.03G079800	3.18
Ubiquitin supergroup;Ribosomal protein L40e	Glyma.06G133600	3.24
heat shock cognate protein 70-1	Glyma.18G289100	3.30
predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	BAK02675.1	3.38
Clp ATPase	Glyma.06G162200	3.51
gamma vacuolar processing enzyme	Glyma.06G050700	3.61
PHYTOCYSTATIN 2	Glyma.18G003700	3.80
gamma-glutamyl transpeptidase 4	Glyma.07G126200	3.87

### Anexo 13: Complejos ligasa de ubiquitina

<b>Descripción del gen</b>	<b>ID</b>	<b>logFC</b>
Sulfite exporter TauE/SafE family protein	Glyma.13G251400	-3.54
Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Glyma.01G054100	-3.25
BRCA1-associated RING domain protein 1	Glyma.15G092000	-2.66
Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Glyma.11G130800	-2.22
Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	Glyma.07G034400	2.30
auxin signaling F-box 3	Glyma.02G065300	2.37
damaged DNA binding protein 1A	AT4G05420	2.55
F-box/RNI-like superfamily protein	Glyma.06G120600	2.81
Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Glyma.09G017700	3.10

#### Anexo 14: Hidrolasas ácido-anhidrido

<b>Descripción del gen</b>	<b>ID</b>	<b>logFC</b>
Alkaline-phosphatase-like family protein	Glyma.07G129700	-3.43
DUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1	Glyma.14G207800	-3.38
pyrophosphorylase 1	Glyma.07G048300	3.18

Anexo 15: Transducción de señal

Descripción del gen	ID	logFC
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.01G213600	-3.99
Cystathionine beta-synthase (CBS) protein	Glyma.02G020200	-3.97
Seven transmembrane MLO family protein	Glyma.01G165200	-3.95
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.14G098600	-3.94
probable serine/threonine-protein kinase PBL26 [Lupinus angustifolius]OIW13787.1 hypothetical protein TanjilG_31676 [Lupinus angustifolius]	XP_019439893.1	-3.86
PAS domain-containing protein tyrosine kinase family protein	Glyma.09G035400	-3.82
minichromosome maintenance 8	Glyma.19G178600	-3.81
IQ-domain 6	Glyma.13G348400	-3.79
Seven transmembrane MLO family protein	Glyma.12G223100	-3.78
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.13G232500	-3.75
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.15G215600	-3.71
high cyclic electron flow 1	Glyma.18G193600	-3.68
origin recognition complex 1	Glyma.13G340100	-3.67
NPK1-related protein kinase 1	Glyma.19G235200	-3.65
proline-rich receptor-like protein kinase PERK8 [Lupinus angustifolius]OIW05458.1 hypothetical protein TanjilG_12049 [Lupinus angustifolius]	XP_019456419.1	-3.55
probable membrane-associated kinase regulator 6 isoform X2 [Lupinus angustifolius]	XP_019432814.1	-3.49
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.09G024900	-3.49
Cyclin B2;3	Glyma.01G159700	-3.45
Alkaline-phosphatase-like family protein	Glyma.07G129700	-3.43
RAC-like GTP binding protein 5	Glyma.12G208000	-3.42
mitotic-like cyclin 3B from Arabidopsis	Glyma.04G071600	-3.42
Protein kinase family protein with ARM repeat domain	Glyma.15G098800	-3.41
DUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1	Glyma.14G207800	-3.38
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.03G219200	-3.38
phosphoinositide 4-kinase gamma 4	Glyma.01G226200	-3.37
HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	Glyma.U041700	-3.36
thylakoid-associated phosphatase 38	Glyma.06G130900	-3.35
Phosphofructokinase family protein	Glyma.07G263800	-3.28
IQ-domain 24	Glyma.16G196900	-3.26
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.08G084400	-3.24
probable protein phosphatase 2C 62 isoform X4 [Lupinus angustifolius]	XP_019440369.1	-3.17
CYCLIN D3;1	Glyma.10G263500	-3.17
HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	Glyma.03G001600	-3.15
P-glycoprotein 13	Glyma.14G220200	-3.12
cyclin-dependent kinase B1;2	Glyma.07G021100	-3.11
CYCLIN D3;1	Glyma.04G042000	-3.11
Protein kinase superfamily protein	Glyma.01G227800	-3.07
Cyclin A3;1	Glyma.04G043700	-3.06
apyrase 2	Glyma.16G043300	-3.02
phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) synthase 3	Glyma.01G026800	-3.00
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.17G096500	-2.99
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.14G148700	-2.98
MAP kinase kinase 6	Glyma.10G107500	-2.95

Leucine-rich repeat protein kinase family protein	AT2G45340.1	-2.95
ABC-2 type transporter family protein	Glyma.20G163500	-2.92
purple acid phosphatase 27	Glyma.09G225000	-2.88
Inositol monophosphatase family protein	Glyma.16G168000	-2.87
calcium-dependent protein kinase 17	Glyma.02G278900	-2.85
Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	Glyma.07G181900	-2.85
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Glyma.03G122100	-2.85
Cyclin A3;1	Glyma.04G043600	-2.85
Protein kinase superfamily protein	Glyma.13G289900	-2.83
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.01G168100	-2.81
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.06G026600	-2.79
IQ-domain 26	Glyma.01G007000	-2.79
phytochrome B	Glyma.15G140000	-2.77
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.08G333200	-2.76
Protein kinase superfamily protein	Glyma.11G009700	-2.76
mitogen-activated protein kinase phosphatase 1	Glyma.02G095100	-2.74
Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	Glyma.14G118100	-2.74
non-intrinsic ABC protein 7	Glyma.05G221600	-2.74
RAS associated with diabetes protein 51	Glyma.13G115000	-2.74
Protein kinase superfamily protein	Glyma.18G058800	-2.73
recA DNA recombination family protein	Glyma.09G064300	-2.70
IQ-domain 24	Glyma.09G143900	-2.70
Protein phosphatase 2C family protein	Glyma.19G176600	-2.68
P-glycoprotein 2	Glyma.01G016500	-2.68
L-fucokinase/GDP-L-fucose pyrophosphorylase	Glyma.03G259000	-2.68
cyclic nucleotide gated channel 8	Glyma.07G022500	-2.65
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.11G199700	-2.65
Protein kinase superfamily protein	Glyma.04G205000	-2.65
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.17G119800	-2.65
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.02G097400	-2.64
Double Clp-N motif protein	Glyma.01G212900	-2.64
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.17G226100	-2.64
Calmodulin-binding transcription activator protein with CG-1 and Ankyrin domains	Glyma.17G038800	-2.63
HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	Glyma.16G220900	-2.62
high cyclic electron flow 1	Glyma.07G142700	-2.61
cyclin d5;1	Glyma.06G046200	-2.61
putative protein kinase 1	Glyma.06G109800	-2.60
Protein kinase superfamily protein	Glyma.03G109300	-2.55
Protein kinase superfamily protein	Glyma.12G073700	-2.54
cyclic nucleotide-gated channel 14	Glyma.06G077600	-2.53
Mevalonate/galactokinase family protein	Glyma.17G035800	-2.52
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.01G125200	-2.52
Dihydropterin pyrophosphokinase / Dihydropteroate synthase	Glyma.01G062200	-2.51
phosphoglycerate kinase 1	Glyma.13G045400	-2.49
Cyclin A2;4	Glyma.07G034100	-2.49
IQ-domain 21	Glyma.14G159300	-2.49
ATP binding;protein kinases;protein serine/threonine kinases	Glyma.12G116400	-2.48
Seven transmembrane MLO family protein	Glyma.13G278400	-2.48
Protein kinase superfamily protein	Glyma.15G218200	-2.47
NPK1-related protein kinase 1	Glyma.16G001200	-2.47
IQ-domain 21	Glyma.04G235400	-2.45
autoinhibited Ca(2+)-ATPase 9	Glyma.13G372400	-2.44

P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.06G112600	-2.44
Duplicated homeodomain-like superfamily protein	Glyma.10G161200	-2.43
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.13G150000	-2.42
IQ-domain 10	Glyma.13G271800	-2.41
HISTIDINE TRIAD NUCLEOTIDE-BINDING 2	Glyma.15G161000	-2.39
Protein kinase superfamily protein	Glyma.17G127200	-2.39
thiamin pyrophosphokinase 2	Glyma.03G213500	-2.39
Protein kinase superfamily protein	Glyma.10G156200	-2.34
APS kinase	AT2G14750.1	-2.34
Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein	Glyma.19G168600	-2.34
Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Glyma.04G214900	-2.28
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.10G220700	-2.28
pleiotropic drug resistance 4	Glyma.17G120100	-2.27
Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	Glyma.06G132600	-2.26
Protein kinase superfamily protein	Glyma.03G017600	-2.25
Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain	Glyma.12G032900	-2.24
ALBINA 1	Glyma.11G016000	-2.23
dual specificity protein phosphatase (DsPTP1) family protein	Glyma.04G220900	-2.23
Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein	Glyma.10G040500	-2.22
hexokinase 3	Glyma.17G257800	-2.22
receptor serine/threonine kinase, putative	Glyma.14G118800	-2.22
probable membrane-associated kinase regulator 6 [Lupinus angustifolius]	XP_019465106.1	-2.21
calmodulin 5	AT2G27030.3	-2.18
Protein kinase superfamily protein	Glyma.12G133500	-2.18
IQ-domain 31	Glyma.05G028600	-2.17
Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Glyma.05G189800	-2.17
Protein kinase superfamily protein	Glyma.17G215900	-2.16
CVP2 like 1	Glyma.01G235300	-2.16
histone deacetylase 14	Glyma.05G192600	-2.13
calcium-dependent protein kinase 17	Glyma.20G041500	-2.12
like SEX4 1	Glyma.16G073500	-2.12
photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative / PSI-N, putative (PSAN)	Glyma.04G215800	-2.11
Protein kinase superfamily protein	Glyma.03G002200	-2.10
cyclin p4;1	Glyma.18G247800	-2.09
Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	Glyma.18G246700	-2.09
hercules receptor kinase 2	Glyma.09G024700	-2.09
Protein kinase superfamily protein	Glyma.08G256200	-2.08
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.19G140100	-2.08
Phosphofructokinase family protein	Glyma.09G007900	-2.08
SAUR-like auxin-responsive protein family	Glyma.06G025300	-2.08
CBS domain-containing protein	Glyma.13G240900	-2.07
Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	Glyma.19G143300	-2.07
Duplicated homeodomain-like superfamily protein	Glyma.20G224000	-2.06
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.15G080200	-2.06
purple acid phosphatase 16	Glyma.02G192200	-2.06
STRUBBELIG-receptor family 8	Glyma.15G111600	-2.05
multidrug resistance-associated protein 1	Glyma.06G312300	-2.05
Protein kinase superfamily protein	Glyma.16G047100	-2.05

IQ-domain 11	Glyma.09G225300	-2.05
phosphoribulokinase	Glyma.01G010200	-2.05
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein	Glyma.10G271900	-2.04
Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Glyma.13G279400	-2.04
homolog of yeast CDT1 B homolog of yeast CDT1 B	Glyma.09G162100	-2.03
non-intrinsic ABC protein 8	Glyma.09G147400	-2.03
adenosine kinase 2	Glyma.03G181900	-2.03
IQ-domain 6	Glyma.04G052200	-2.02
U-box domain-containing protein kinase family protein	Glyma.11G139700	-2.02
Seven transmembrane MLO family protein	Glyma.01G157500	-2.02
thylakoid lumen 18.3 kDa protein	Glyma.20G231600	-2.01
PREDICTED: probable serine/threonine-protein kinase At1g54610 isoform X2 [Lupinus angustifolius]	XP_019451208.1	-2.00
purple acid phosphatase 27	Glyma.05G047900	-2.00
Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	Glyma.01G121700	-2.00
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.08G352100	2.00
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	Glyma.05G080900	2.02
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.06G258200	2.03
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.17G250800	2.04
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.08G019400	2.04
calcium-dependent protein kinase 28	Glyma.11G077300	2.05
probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At2g25790 [Lupinus angustifolius]	XP_019418318.1	2.05
Protein kinase superfamily protein	Glyma.17G211700	2.07
cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29	Glyma.10G253600	2.08
Protein kinase superfamily protein	Glyma.07G197200	2.10
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.03G079500	2.12
Protein phosphatase 2C family protein	Glyma.02G228200	2.12
MDIS1-interacting receptor like kinase 2-like isoform X1 [Lupinus angustifolius]	XP_019444432.1	2.12
Protein kinase superfamily protein	Glyma.06G177700	2.13
phosphoglycerate kinase, cytosolic [Daucus carota subsp. sativus]KZN00898.1 hypothetical protein DCAR_009652 [Daucus carota subsp. sativus]	XP_017242618.1	2.14
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein	Glyma.16G156200	2.18
Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	Glyma.20G078100	2.19
pfkB-like carbohydrate kinase family protein	Glyma.09G266300	2.21
ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	Glyma.19G038600	2.22
Kinase-related protein of unknown function (DUF1296)	Glyma.08G122700	2.24
phosphoglucan, water dikinase	AT4G24450.1	2.24
Protein kinase superfamily protein	Glyma.04G065900	2.26
histidine kinase 1	Glyma.11G078300	2.27
cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	Glyma.20G139400	2.27
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.01G171300	2.28
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.14G054500	2.29
BTB and TAZ domain protein 2	Glyma.17G126400	2.29
Kinase interacting (KIP1-like) family protein	Glyma.02G236600	2.30
pleiotropic drug resistance 12	Glyma.03G168000	2.31
Protein kinase superfamily protein	Glyma.03G191000	2.32
protein kinase 2A	Glyma.14G040000	2.32
protein phosphatase 2A-2	Glyma.08G293400	2.33

cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29	Glyma.10G253800	2.34
MDIS1-interacting receptor like kinase 2-like [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019462370.1	2.35
Protein phosphatase 2C family protein	Glyma.05G227100	2.35
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.14G124400	2.35
LOW QUALITY PROTEIN: wall-associated receptor kinase-like 8 [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019418697.1	2.36
ATPases;nucleotide binding;ATP binding;nucleoside-triphosphatases;transcription factor binding	Glyma.16G004800	2.37
MDIS1-interacting receptor like kinase 2-like [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019460262.1	2.37
Protein kinase superfamily protein	Glyma.02G247600	2.38
IQ-domain 2	Glyma.20G177900	2.38
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 21	Glyma.17G173000	2.40
Protein kinase superfamily protein	Glyma.13G032100	2.41
no pollen germination related 2	Glyma.10G183700	2.42
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.17G047900	2.42
probable bifunctional methylthioribulose-1-phosphate dehydratase/enolase-phosphatase E1 1 isoform X3 [ <i>Prunus persica</i> ]	XP_020418576.1	2.42
receptor serine/threonine kinase, putative	Glyma.10G271700	2.43
bZIP transcription factor family protein	Glyma.18G020900	2.43
endoplasmic reticulum-type calcium-transporting ATPase 3	AT1G10130.1	2.45
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.05G170600	2.48
MAP kinase 4	Glyma.05G211000	2.49
Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain	Glyma.01G007500	2.53
Protein kinase superfamily protein	Glyma.05G066700	2.55
type one serine/threonine protein phosphatase 4	Glyma.19G248700	2.55
pleiotropic drug resistance 9	Glyma.07G233900	2.55
receptor-like kinase in in flowers 3	Glyma.10G023400	2.58
Protein phosphatase 2C family protein	Glyma.08G033800	2.59
DNase I-like superfamily protein	Glyma.19G173900	2.60
FRAGILE HISTIDINE TRIAD	Glyma.18G049000	2.61
myristoylated alanine-rich C-kinase substrate-like [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]XP_019415032.1 PREDICTED: myristoylated alanine-rich C-kinase substrate-like [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019415031.1	2.66
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.13G253300	2.66
mitogen-activated protein kinase phosphatase 1	Glyma.11G243900	2.67
GTP binding Elongation factor Tu family protein	AT5G60390.3	2.67
Protein kinase superfamily protein	Glyma.07G039700	2.69
casein kinase II beta chain 1	AT5G47080.4	2.70
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.12G198600	2.70
GHMP kinase family protein	Glyma.10G279800	2.73
casein kinase 1-like protein 2	Glyma.08G190300	2.75
shaggy-related kinase 11	Glyma.02G009200	2.80
predicted protein [ <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> ]	BAK02183.1	2.81
mitogen-activated protein kinase kinase 3	Glyma.19G006300	2.83
AGC (cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C) kinase family protein	Glyma.16G084700	2.83
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.12G198200	2.84
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.06G197600	2.86
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2 isoform X2 [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019428774.1	2.89
trehalose phosphatase/synthase 11	Glyma.13G092500	2.92
ATPase, AAA-type, CDC48 protein	Glyma.04G186000	2.92
receptor kinase 3	Glyma.15G065100	2.93
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Glyma.05G024000	2.97

Protein kinase superfamily protein	Glyma.08G044300	2.99
Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain	Glyma.15G237200	2.99
cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25	Glyma.10G109200	3.06
Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	Glyma.03G166300	3.08
Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Glyma.09G017700	3.10
regulatory particle triple-A ATPase 3	Glyma.11G199900	3.10
Coatomer, beta' subunit	Glyma.15G013900	3.11
HOPW1-1-interacting 2	Glyma.06G059700	3.13
cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 26	Glyma.10G253900	3.17
pyrophosphorylase 1	Glyma.07G048300	3.18
diacylglycerol kinase 4	Glyma.13G093100	3.19
cyclic nucleotide-gated channel 13	Glyma.07G056400	3.20
regulatory particle triple-A ATPase 5A	AT3G05530.1	3.26
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.09G099200	3.30
protein phosphatase 2A subunit A2	AT3G25800.1	3.32
lipid transfer protein 1	Glyma.03G040400	3.35
Seven transmembrane MLO family protein	Glyma.U019600	3.39
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	Glyma.14G195300	3.44
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.13G248800	3.44
kinases;protein kinases	Glyma.20G138200	3.46
Protein kinase family protein	Glyma.18G294800	3.48
Calcium-binding EF-hand family protein	Glyma.14G156300	3.49
Clp ATPase	Glyma.06G162200	3.51
receptor kinase 3	Glyma.12G142200	3.55
LEAF RUST 10 DISEASE-RESISTANCE LOCUS RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE-like 2.4 [Lupinus angustifolius]	XP_019419010.1	3.59
pleiotropic drug resistance 11	Glyma.10G203000	3.60
S-locus lectin protein kinase family protein	Glyma.15G206400	3.65
MDIS1-interacting receptor like kinase 2-like [Lupinus angustifolius]	XP_019413539.1	3.67
diacylglycerol kinase 5	Glyma.12G106500	3.74
calcineurin B-like protein 1	Glyma.11G038900	3.76
signal recognition particle receptor alpha subunit family protein	Glyma.06G220500	3.82
protein phosphatase 2A-4	Glyma.02G169200	3.91
homology to ABI1	Glyma.13G106800	3.93

## Anexo 16: Factores de transcripción

Descripción del gen	ID	logFC
transcription factor SCREAM2-like isoform X1 [Lupinus angustifolius]	XP_019459537.1	-3.70
NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	Glyma.08G161300	-3.60
myb domain protein 105	Glyma.07G228700	-3.49
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.07G049100	-3.28
NAC domain containing protein 83	Glyma.05G202300	-3.21
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.13G166700	-2.99
GRAS family transcription factor	Glyma.12G197300	-2.95
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.01G029300	-2.90
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.08G227700	-2.90
basic leucine-zipper 44	Glyma.05G157000	-2.86
transcription factor ICE1-like [Lupinus angustifolius]XP_019437206.1 PREDICTED: transcription factor ICE1-like [Lupinus angustifolius]OIW15378.1 hypothetical protein TanjilG_20290 [Lupinus angustifolius]	XP_019437205.1	-2.80
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	AT1G01250.1	-2.74
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.03G029800	-2.74
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.08G271000	-2.73
NAC domain containing protein 85	Glyma.16G069300	-2.68
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.U037700	-2.65
Helicase protein with RING/U-box domain	Glyma.20G087900	-2.62
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.07G013600	-2.60
nuclear factor Y, subunit C13	Glyma.18G007100	-2.58
Transcription factor jumonji (jmj) family protein / zinc finger (C5HC2 type) family protein	AT1G30810.2	-2.51
Duplicated homeodomain-like superfamily protein	Glyma.10G161200	-2.43
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.01G137200	-2.42
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.15G058300	-2.40
Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	Glyma.12G208400	-2.36
myb domain protein 83	Glyma.12G237500	-2.34
myb domain protein 111	Glyma.07G242600	-2.21
C2H2-like zinc finger protein	AT5G52010.1	-2.20
WRKY DNA-binding protein 40	Glyma.08G218600	-2.17
GRAS family transcription factor	Glyma.09G270000	-2.16
high mobility group B2	Glyma.16G116300	-2.16
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.06G068800	-2.13
PHD finger transcription factor, putative	Glyma.02G227900	-2.12
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.17G138200	-2.12
CONSTANS-like 2	Glyma.18G278100	-2.12
zinc ion binding;DNA binding	Glyma.11G208500	-2.11
ssDNA-binding transcriptional regulator	Glyma.08G297200	-2.11
GATA transcription factor 9	Glyma.07G016800	-2.10
GATA type zinc finger transcription factor family protein	Glyma.13G103900	-2.09
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.07G017300	-2.08
GRAS family transcription factor	Glyma.01G194200	-2.08
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.19G236900	-2.07
Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	Glyma.11G186700	-2.07
Duplicated homeodomain-like superfamily protein	Glyma.20G224000	-2.06
Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	Glyma.13G272500	-2.04

myb-like HTH transcriptional regulator family protein	Glyma.09G017400	2.01
Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	Glyma.14G217200	2.04
WRKY DNA-binding protein 69	Glyma.13G289400	2.06
C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	Glyma.12G179000	2.07
SCARECROW-like 1	Glyma.06G121300	2.07
GRAS family transcription factor	Glyma.14G006900	2.07
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.16G047600	2.08
WRKY DNA-binding protein 40	Glyma.13G370100	2.12
PLATZ transcription factor family protein	Glyma.09G205300	2.14
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.04G199900	2.15
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.20G070000	2.16
ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like [Lupinus angustifolius]OIW18377.1 hypothetical protein TanjilG_31517 [Lupinus angustifolius]	XP_019456358.1	2.16
WRKY DNA-binding protein 33	Glyma.02G232600	2.23
NAC domain containing protein 100	Glyma.13G062000	2.26
C2H2-type zinc finger family protein	Glyma.13G133100	2.26
MYB-like 102	Glyma.15G066800	2.26
PLATZ transcription factor family protein	Glyma.11G008900	2.26
PLATZ transcription factor family protein	Glyma.01G017700	2.27
zinc finger (C2H2 type) family protein	Glyma.15G063600	2.27
Homeodomain-like superfamily protein	Glyma.03G056900	2.27
myb domain protein 15	Glyma.10G165800	2.28
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.14G084200	2.30
ethylene-responsive transcription factor 2-like [Lupinus angustifolius]OIW11267.1 hypothetical protein TanjilG_28358 [Lupinus angustifolius]	XP_019444461.1	2.31
heat shock factor 4	Glyma.17G174900	2.33
heat shock transcription factor B2A	Glyma.09G143200	2.36
WRKY family transcription factor	Glyma.05G215900	2.38
bZIP transcription factor family protein	Glyma.18G020900	2.43
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.08G014900	2.47
NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	Glyma.05G195000	2.48
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	AT1G22190.1	2.51
WRKY DNA-binding protein 30	Glyma.04G238300	2.52
NAC domain containing protein 1	Glyma.15G254000	2.56
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.05G208300	2.56
WRKY DNA-binding protein 40	Glyma.17G222500	2.56
WRKY family transcription factor	Glyma.15G110300	2.58
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.10G034300	2.59
NAC domain containing protein 83	Glyma.18G301500	2.60
heat shock transcription factor A6B	Glyma.19G159500	2.62
nuclear factor Y, subunit A3	Glyma.13G107900	2.62
Transcription factor DP	Glyma.12G018000	2.62
homeobox 7	Glyma.04G231400	2.72
WRKY DNA-binding protein 75	Glyma.16G054400	2.77
TGACG motif-binding factor 6	Glyma.15G232000	2.78
WRKY family transcription factor	Glyma.16G026400	2.82
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.12G122800	2.85
WRKY DNA-binding protein 23	Glyma.07G238000	2.85
WRKY DNA-binding protein 23	Glyma.10G011300	2.85
WRKY DNA-binding protein 14	Glyma.09G029800	2.86

sequence-specific DNA binding transcription factors	Glyma.04G135400	2.87
transcription factor TCP9-like [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019450426.1	2.91
myb domain protein 15	Glyma.20G209700	2.97
WRKY DNA-binding protein 72	Glyma.19G020600	3.06
myb-like transcription factor family protein	Glyma.01G038600	3.11
WRKY DNA-binding protein 50	Glyma.04G054200	3.16
Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein	Glyma.07G016500	3.18
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.14G056200	3.19
WRKY DNA-binding protein 51	Glyma.05G184500	3.20
NAC domain containing protein 2	Glyma.12G221400	3.23
Dof-type zinc finger DNA-binding family protein	Glyma.15G082400	3.26
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.17G155900	3.27
WRKY DNA-binding protein 40	Glyma.14G103100	3.30
transcription factor bHLH18-like [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019445969.1	3.31
NAC-like, activated by AP3/PI	Glyma.01G051300	3.33
myb domain protein 111	Glyma.07G054000	3.33
WRKY DNA-binding protein 72	Glyma.17G097900	3.38
probable WRKY transcription factor 50 isoform X2 [ <i>Lupinus angustifolius</i> ]	XP_019436850.1	3.41
WRKY DNA-binding protein 23	Glyma.02G010900	3.43
K-box region and MADS box transcription factor family protein	Glyma.02G041500	3.44
xylem NAC domain 1	Glyma.05G192500	3.50
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.15G061400	3.55
WRKY DNA-binding protein 33	Glyma.14G200200	3.57
basic leucine-zipper 44	Glyma.14G071400	3.60
Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	Glyma.19G194500	3.64
WRKY DNA-binding protein 72	Glyma.06G190800	3.65
C2H2-like zinc finger protein	Glyma.01G056900	3.70
WRKY DNA-binding protein 23	Glyma.17G035400	3.70
myb domain protein 78	Glyma.09G032100	3.82
myb domain protein 36	Glyma.12G177700	3.85
WRKY DNA-binding protein 28	Glyma.14G028900	3.87
WUSCHEL related homeobox 13	Glyma.04G016700	3.89
AP2/B3-like transcriptional factor family protein	Glyma.20G108400	3.91

Anexo 17: Hormonas

<b>Descripción del gen</b>	<b>ID</b>	<b>logFC</b>
PAS domain-containing protein tyrosine kinase family protein	Glyma.09G035400	-3.82
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.07G217900	-3.75
Gibberellin-regulated family protein	Glyma.03G131700	-3.60
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.09G024900	-3.49
PYR1-like 4	Glyma.01G124700	-3.45
respiratory burst oxidase protein F	Glyma.05G021100	-3.39
Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	Glyma.15G134400	-3.37
alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Glyma.17G073200	-3.37
gibberellin 20 oxidase 2	Glyma.13G035600	-3.25
N-MYC downregulated-like 1	Glyma.10G161000	-3.23
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.20G014300	-3.16
RHO-related protein from plants 9	Glyma.07G084200	-3.05
nitrate transporter 1:2	Glyma.17G096800	-3.03
AMP-dependent synthetase and ligase family protein	Glyma.19G075800	-3.01
AMP-dependent synthetase and ligase family protein	Glyma.19G075800	-3.01
Gibberellin-regulated family protein	Glyma.06G193800	-2.98
tetratricopeptide-repeat thioredoxin-like 3	Glyma.13G291200	-2.88
tetratricopeptide-repeat thioredoxin-like 3	Glyma.13G291200	-2.88
calcium-dependent protein kinase 17	Glyma.02G278900	-2.85
phytochrome B	Glyma.15G140000	-2.77
phytochrome B	Glyma.15G140000	-2.77
Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region	Glyma.04G083000	-2.74
Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	Glyma.07G032000	-2.72
purine permease 1	Glyma.06G099400	-2.72
cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2	AT2G29090.2	-2.60
Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region	Glyma.02G005100	-2.49
nitrate transporter 1:2	Glyma.05G029900	-2.47
syntaxin of plants 121	Glyma.10G082400	-2.47
syntaxin of plants 121	Glyma.10G082400	-2.47
phy rapidly regulated 2	Glyma.14G028000	-2.44
Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein	Glyma.08G163900	-2.44
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.07G102500	-2.42
RING/U-box superfamily protein	Glyma.13G273500	-2.27
jasmonic acid carboxyl methyltransferase	Glyma.14G072300	-2.20
actin-related protein 5	Glyma.18G037700	-2.19
cellulose synthase A4	Glyma.09G051100	-2.17
cellulose synthase A4	Glyma.09G051100	-2.17
cellulose synthase A4	Glyma.09G051100	-2.17
CVP2 like 1	Glyma.01G235300	-2.16
CVP2 like 1	Glyma.01G235300	-2.16
sterol 1	Glyma.13G044800	-2.13

calcium-dependent protein kinase 17	Glyma.20G041500	-2.12
cellulose synthase family protein	Glyma.08G117500	-2.11
cellulose synthase family protein	Glyma.08G117500	-2.11
cellulose synthase family protein	Glyma.08G117500	-2.11
GATA type zinc finger transcription factor family protein	Glyma.13G103900	-2.09
N-MYC downregulated-like 2	Glyma.06G051500	-2.04
indole-3-acetic acid inducible 14	Glyma.10G180100	-2.03
indole-3-acetic acid inducible 14	Glyma.19G161100	-2.02
phospholipase D delta	Glyma.11G081500	-2.01
isochorismate synthase 2	Glyma.01G104100	-2.01
zinc induced facilitator-like 1	Glyma.13G186700	2.01
lipxygenase 1	Glyma.07G034800	2.04
gibberellin 2-oxidase	Glyma.13G218200	2.05
calcium-dependent protein kinase 28	Glyma.11G077300	2.05
WWE protein-protein interaction domain protein family	Glyma.09G207200	2.07
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.16G047600	2.08
jasmonate-zim-domain protein 6	Glyma.07G041400	2.09
erf domain protein 9	Glyma.12G117000	2.10
Protein phosphatase 2C family protein	Glyma.02G228200	2.12
jasmonate-zim-domain protein 8	Glyma.15G093100	2.12
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.20G070000	2.16
TIFY domain/Divergent CCT motif family protein	Glyma.05G235500	2.17
Walls Are Thin 1	Glyma.11G072800	2.22
acyl-activating enzyme 18	Glyma.05G155800	2.24
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.01G157700	2.26
histidine kinase 1	Glyma.11G078300	2.27
RING/U-box superfamily protein	Glyma.18G037200	2.27
lipxygenase 3	Glyma.16G008700	2.28
BTB and TAZ domain protein 2	Glyma.17G126400	2.29
BTB and TAZ domain protein 2	Glyma.17G126400	2.29
Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	Glyma.07G034400	2.30
ethylene responsive element binding factor 2	Glyma.15G079100	2.31
ethylene responsive element binding factor 2	Glyma.15G079100	2.31
pleiotropic drug resistance 12	Glyma.03G168000	2.31
Protein kinase superfamily protein	Glyma.03G191000	2.32
protein phosphatase 2A-2	Glyma.08G293400	2.33
Protein phosphatase 2C family protein	Glyma.05G227100	2.35
nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 9	AT1G78390.1	2.40
alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Glyma.02G151100	2.41
UDP-glycosyltransferase 74 F1	Glyma.19G025200	2.42
jasmonate-zim-domain protein 1	Glyma.09G071600	2.43
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.08G014900	2.47
peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3	Glyma.10G124700	2.47
peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3	Glyma.10G124700	2.47
peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3	Glyma.10G124700	2.47

Gibberellin-regulated family protein	Glyma.14G215600	2.48
NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	Glyma.05G195000	2.48
MAP kinase 4	Glyma.05G211000	2.49
MAP kinase 4	Glyma.05G211000	2.49
Protein kinase superfamily protein	Glyma.05G066700	2.55
Chalcone and stilbene synthase family protein	Glyma.08G109400	2.55
pleiotropic drug resistance 9	Glyma.07G233900	2.55
NAC domain containing protein 1	Glyma.15G254000	2.56
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Glyma.05G208300	2.56
erf domain protein 9	AT5G44210	2.57
Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	Glyma.05G155600	2.57
RING/U-box superfamily protein	Glyma.03G060000	2.57
Protein phosphatase 2C family protein	Glyma.08G033800	2.59
IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 6	Glyma.06G115100	2.61
IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 6	Glyma.06G115100	2.61
Thioredoxin superfamily protein	Glyma.13G234500	2.66
Thioredoxin superfamily protein	Glyma.13G234500	2.66
syntaxin of plants 121	Glyma.02G195300	2.67
syntaxin of plants 121	Glyma.02G195300	2.67
Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	Glyma.14G208000	2.70
homeobox 7	Glyma.04G231400	2.72
Homeodomain-like superfamily protein	Glyma.05G011500	2.76
brassinosteroid-6-oxidase 2	Glyma.18G272300	2.81
F-box/RNI-like superfamily protein	Glyma.06G120600	2.81
WRKY family transcription factor	Glyma.16G026400	2.82
WRKY family transcription factor	Glyma.16G026400	2.82
mitogen-activated protein kinase kinase 3	Glyma.19G006300	2.83
mitogen-activated protein kinase kinase 3	Glyma.19G006300	2.83
SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	Glyma.03G214100	2.97
cytochrome P450, family 83, subfamily B, polypeptide 1	Glyma.03G030600	2.98
carotenoid cleavage dioxygenase 8	Glyma.04G084100	3.02
Putative lysine decarboxylase family protein	Glyma.04G025100	3.10
abscisic aldehyde oxidase 3	Glyma.02G272200	3.12
abscisic aldehyde oxidase 3	Glyma.02G272200	3.12
WRKY DNA-binding protein 50	Glyma.04G054200	3.16
SAUR-like auxin-responsive protein family	AT2G46690.1	3.19
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.14G056200	3.19
WRKY DNA-binding protein 51	Glyma.05G184500	3.20
C-repeat/DRE binding factor 2	Glyma.20G155100	3.23
methyl esterase 1	Glyma.16G145200	3.27
methyl esterase 1	Glyma.16G145200	3.27
ethylene response factor 1	AT3G23240.1	3.34
jasmonic acid carboxyl methyltransferase	Glyma.02G054200	3.37
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.18G218300	3.38

lipoxygenase 1	Glyma.08G189800	3.41
Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	Glyma.19G194500	3.64
calcineurin B-like protein 1	Glyma.11G038900	3.76
lipoxygenase 1	Glyma.07G006900	3.82
homology to ABI1	Glyma.13G106800	3.93
Auxin efflux carrier family protein	Glyma.09G195600	3.95

## Anexo 18: Complejos histonas

Descripción del gen	ID	logFC
Microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family protein	Glyma.10G178100	-3.76
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.17G233200	-3.76
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.U029300	-3.73
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	Glyma.06G206800	-3.72
Cell cycle regulated microtubule associated protein	Glyma.01G213800	-3.64
Dynamin related protein 5A	Glyma.12G152100	-3.62
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.20G207200	-3.60
Kinesin motor family protein	Glyma.18G082000	-3.58
targeting protein for XKLP2	Glyma.06G290300	-3.47
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.03G219200	-3.38
Phosphofructokinase family protein	Glyma.07G263800	-3.28
E2F target gene 1	Glyma.06G143400	-3.26
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.08G084400	-3.24
chromomethylase 3	Glyma.01G007800	-3.22
Vacuolar import/degradation, Vid27-related protein	Glyma.04G038800	-3.15
DNA primases;DNA primases	Glyma.02G286600	-3.07
Plant protein of unknown function (DUF827)	Glyma.01G131300	-3.03
phragmoplast-associated kinesin-related protein, putative	Glyma.05G149700	-3.03
DNA-directed DNA polymerases	Glyma.01G187400	-2.89
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.01G168100	-2.81
Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	Glyma.06G026600	-2.79
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.03G197300	-2.79
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.17G104000	-2.78
Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)	Glyma.20G106700	-2.75
chromatin remodeling factor17	Glyma.07G250700	-2.75
Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)	Glyma.04G079400	-2.70
Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	Glyma.20G126300	-2.65
chromatin remodeling 1	Glyma.01G175300	-2.62
AT hook motif DNA-binding family protein	Glyma.05G207300	-2.62
putative protein kinase 1	Glyma.06G109800	-2.60
O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	Glyma.05G235700	-2.57
Di-glucose binding protein with Kinesin motor domain	Glyma.08G174300	-2.52
DNA primase, large subunit family	Glyma.08G105600	-2.51
proliferating cell nuclear antigen 2	Glyma.08G334900	-2.46
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.06G096600	-2.42
villin-like 1	Glyma.08G333900	-2.35
lysm domain GPI-anchored protein 1 precursor	Glyma.04G250300	-2.34
3'\-5'\-exoribonuclease family protein	Glyma.11G145000	-2.34
PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein	Glyma.03G119200	-2.20
structural maintenance of chromosomes 2	Glyma.13G202100	-2.19
Family of unknown function (DUF566)	Glyma.09G018100	-2.17
poly(ADP-ribose) polymerase 2	Glyma.03G161300	-2.17
double-stranded RNA binding protein-related / DsRBD protein-related	Glyma.08G081600	-2.15
histone deacetylase 14	Glyma.05G192600	-2.13
zinc ion binding;DNA binding	Glyma.11G208500	-2.11

Phosphofructokinase family protein	Glyma.09G007900	-2.08
vernalization5/VIN3-like	Glyma.14G182300	-2.05
homolog of yeast CDT1 B homolog of yeast CDT1 B	Glyma.09G162100	-2.03
growth-regulating factor 6	Glyma.16G007600	2.37
structural maintenance of chromosome 3	Glyma.13G062800	3.75

## Anexo 19: Cromatina

<b>Descripción del gen</b>	<b>ID</b>	<b>logFC</b>
chromatin remodeling 24	Glyma.08G001900	-3.97
Microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family protein	Glyma.10G178100	-3.76
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.17G233200	-3.76
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.U029300	-3.73
Cell cycle regulated microtubule associated protein	Glyma.01G213800	-3.64
Dynamin related protein 5A	Glyma.12G152100	-3.62
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.20G207200	-3.60
DEK domain-containing chromatin associated protein	Glyma.05G203100	-3.59
Kinesin motor family protein	Glyma.18G082000	-3.58
Protein of Unknown Function (DUF239)	Glyma.05G167100	-3.56
minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.15G154900	-3.52
targeting protein for XKLP2	Glyma.06G290300	-3.47
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.03G219200	-3.38
Plant protein of unknown function (DUF828)	Glyma.18G061200	-3.33
Phosphofructokinase family protein	Glyma.07G263800	-3.28
E2F target gene 1	Glyma.06G143400	-3.26
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.08G084400	-3.24
chromomethylase 3	Glyma.01G007800	-3.22
Protein of Unknown Function (DUF239)	Glyma.08G125400	-3.15
Vacuolar import/degradation, Vid27-related protein	Glyma.04G038800	-3.15
Histone superfamily protein	AT3G45980.1	-3.06
phragmoplast-associated kinesin-related protein, putative	Glyma.05G149700	-3.03
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.01G029300	-2.90
kinesin like protein for actin based chloroplast movement 2	Glyma.02G041400	-2.86
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.03G197300	-2.79
Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein	Glyma.17G104000	-2.78
phytochrome B	Glyma.15G140000	-2.77
telomerase reverse transcriptase	Glyma.08G155900	-2.76
Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)	Glyma.20G106700	-2.75
chromatin remodeling factor17	Glyma.07G250700	-2.75
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.03G029800	-2.74
RAS associated with diabetes protein 51	Glyma.13G115000	-2.74
Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)	Glyma.04G079400	-2.70
Integrase-type DNA-binding superfamily protein	Glyma.U037700	-2.65
chromatin remodeling 1	Glyma.01G175300	-2.62
histone H2A 11	Glyma.02G143200	-2.62
AT hook motif DNA-binding family protein	Glyma.05G207300	-2.62
putative protein kinase 1	Glyma.06G109800	-2.60
Histone superfamily protein	Glyma.18G064300	-2.57
O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	Glyma.05G235700	-2.57
Di-glucose binding protein with Kinesin motor domain	Glyma.08G174300	-2.52
exoribonuclease 4	Glyma.19G242400	-2.48
RAS associated with diabetes protein 51C	Glyma.03G027600	-2.46
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.01G137200	-2.42
P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Glyma.06G096600	-2.42

interactor of constitutive active rops 1	Glyma.13G259200	-2.36
villin-like 1	Glyma.08G333900	-2.35
gamma histone variant H2AX	Glyma.19G239200	-2.22
structural maintenance of chromosomes 2	Glyma.13G202100	-2.19
Family of unknown function (DUF566)	Glyma.09G018100	-2.17
poly(ADP-ribose) polymerase 2	Glyma.03G161300	-2.17
high mobility group B2	Glyma.16G116300	-2.16
double-stranded RNA binding protein-related / DsRBD protein-related	Glyma.08G081600	-2.15
histone H2A 12	Glyma.13G334300	-2.15
histone deacetylase 14	Glyma.05G192600	-2.13
Plant-specific transcription factor YABBY family protein	Glyma.17G138200	-2.12
Plant protein of unknown function (DUF828)	Glyma.11G171300	-2.12
ssDNA-binding transcriptional regulator	Glyma.08G297200	-2.11
Phosphofructokinase family protein	Glyma.09G007900	-2.08
vernalization5/VIN3-like	Glyma.14G182300	-2.05
homolog of yeast CDT1 B homolog of yeast CDT1 B	Glyma.09G162100	-2.03
sterol 4-alpha-methyl-oxidase 2-1	Glyma.02G030900	-2.02
high mobility group B1	Glyma.01G116000	2.15
senescence associated gene 24	AT1G66580.1	2.60
pyrophosphorylase 1	Glyma.07G048300	3.18
paired amphipathic helix protein Sin3-like 3 [Lupinus angustifolius]	XP_019423160.1	3.23
histone H2A protein 9	Glyma.14G126700	3.50
structural maintenance of chromosome 3	Glyma.13G062800	3.75