

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Determinación de la producción de alcaloides y análisis de expresión de genes de defensa inducidos por Metil Jasmonato en semillas de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)

Proyecto de Investigación

María Paula Erazo García

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 7 de enero de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Determinación de la producción de alcaloides y análisis de expresión de genes de defensa inducidos por Metil Jasmonato en semillas de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)

María Paula Erazo

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

Antonio León Reyes, PhD.

Firma del profesor:

Quito, 7 de enero de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: María Paula Erazo García

Código: 00118429

Cédula de Identidad: 0931067367

Lugar y fecha: Quito, 7 de enero de 2019

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mis padres, Sandra y Marlon, y mi abuela, Rossana, por brindarme todo el apoyo a la distancia y formar parte de quien soy ahora.

A Diego, porque este trabajo es resultado del trabajo duro de la persona en quien me convertí a tu lado.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos mis amigos cercanos, en especial a Darío Cueva y Antonia Castells.

A Darío Ramírez, por haber creído en mi desde el principio. Por haber estado en cada paso de este proyecto y por haber compartido conmigo cada enseñanza, además de tenerme paciencia y mucho cariño.

A mi director de tesis, Antonio León, primeramente, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos con un proyecto desafiante como este, y por cada retroalimentación como profesional y persona que me diste durante este tiempo.

A todos quienes conforman el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos por ser ejemplo de un equipo de trabajo excelente, alegre, unido, y transparente.

A Sandra Garcés, y Rafael Sotelo por haber contribuido con el material científico mostrado en este trabajo de titulación.

A Diego, por estar presente desde el principio de este camino y por haber sido la persona a quien yo necesité estando lejos de mi hogar.

RESUMEN

El chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una planta andina de interés agroindustrial para el Ecuador y otros países de América del Sur. Su consumo ha venido aumentando con el tiempo por su contenido nutricional rico en proteínas. No obstante, el rendimiento de este cultivo es bajo por la incidencia de enfermedades y plagas. Uno de los mayores problemas que tiene el cultivo de chocho en el Ecuador es el daño ocasionado a la semilla por la mosca *Delia platura*. Con un porcentaje de pérdidas del 56% en campo, ha suscitado mucho interés en encontrar estrategias de manejo efectivas adicionales a las químicas ya existentes. Una de ellas es la utilización de elicitors de defensa, tales como el uso de Metil Jasmonato (MeJA) para la inducción de la inmunidad vegetal, el cual ha demostrado disminuir de manera significativa el daño causado por *D. platura* según estudios recientes del INIAP.

Elucidar los mecanismos de defensa que ocurren tras el tratamiento con este elicitor, es un factor clave para la implementación de programas de mejoramiento genético y medidas de control efectivas de la plaga a largo plazo. Es por ello que en este estudio se evaluó la producción de alcaloides, síntesis de monoterpenos e inducción de inhibidores de proteinasas (PIs) como posibles estrategias de defensa que están ocurriendo en la semilla.

La producción de alcaloides se determinó en base a un método espectrofotométrico, mientras la síntesis de volátiles y PIs se evaluó mediante la técnica de qRT-PCR. Para este último, fue necesario la determinación de un gen constitutivo estable para la normalización de los resultados, el ensamble de transcriptomas a partir de archivos de RNASeq y diseño de primers en base a las secuencias homólogas predichas. Luego del análisis de 4 algoritmos, el gen *LmUBC* (Ubiquitina C) mostró ser el más estable bajo diferentes tratamientos hormonales, tejidos, cultivares y estados fenológicos.

Posteriormente, se obtuvo como resultados que el MeJA no elicita la biosíntesis de alcaloides, en comparación con la producción de monoterpenos y PIs, cuya expresión se vio amplificada dentro de un período de 12h. Además, la actividad de la ruta del Ácido Jasmónico se comprobó con la visualización de la expresión del gen de síntesis *LOX2* y *AOS*. Se concluye que la defensa generada en la semilla de chocho tras la aplicación de MeJA está determinada por la vía de señalización del JA, y una actividad en conjunto de al menos dos mecanismos (volátiles y PIs). En un futuro, se espera evaluar esta técnica de resistencia inducida como posible método para integrarlos dentro del manejo integrado de esta plaga.

Palabras clave: *Lupinus mutabilis*, *Delia platura*, inductor de resistencia, Metil Jasmonato, Ácido Jasmónico, qRT-PCR, normalización, alcaloides, inhibidores de proteinasas, monoterpenos.

ABSTRACT

Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) is an andean legume of agroindustrial interest for Ecuador and other Latin American countries. Its consumption has grown in the last years due to its nutritional content rich in proteins. Nonetheless, the yield of this crop is low as consequence of diseases and pests. One of the biggest problems affecting lupin cultivation in Ecuador is the seedcorn maggot *Delia platura*. With a percentage of losses of 56% in field, interest has aroused to find effective control strategies in addition to the existing chemical ones. One of them is the treatment with defense elicitors, such as Methyl Jasmonate (MeJA), for the induction of plant immunity, which has demonstrated to diminish significantly the damage caused by *D. platura*.

Elucidating defense mechanisms in action after the treatment with this elicitor, is key for the implementation of genetic improvement programs, and effective control measures at long term. That is why in this study we evaluated the alkaloid production, the synthesis of monoterpenes and the induction of proteinase inhibitors (PIs) as possible defense strategies occurring in lupin seeds.

Alkaloid production was determined with a spectrophotometric method, while volatile synthesis and PIs were evaluated by the qRT-PCR technique. For the latter, it was necessary to determine a stable constitutive gene for the normalization of results, to assembly transcriptomes based on RNAseq data, and to design of primers based on the predicted homologous sequences. After the analysis with 4 algorithms, the Lm UBC demonstrated to be the most stable gene between different hormonal treatments, tissues, cultivars and phenological states.

Results demonstrated that MeJA does not induces alkaloid biosynthesis, in comparison with monoterpene an PIs production, whose gen expressions were amplified in a 12h time lapse. Additionally, the active state of the Jasmonic Acid (JA) pathway was proven with the expression visualization of the JA-synthesis gene AOS. In conclusion, the defense generated in lupin seed after MeJA treatment is determined by the JA pathway, and the collaborative activity of at least two defense mechanisms (volatiles and PIs). Future prospects hope to evaluate the induced resistance technique as a plausible control method for this pest.

Key words: *Lupinus mutabilis*, *Delia platura*, resistance inductor, Methyl Jasmonate, Jasmonic Acid, qRT-PCR, normalization, alkaloids, proteinase inhibitors, monoterpenes.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1.1 El género <i>Lupinus</i>	13
1.2 El chocho en el Ecuador	14
1.3 Beneficios adicionales	15
1.4 Los alcaloides quinolizidínicos	15
1.5 La domesticación del chocho	16
1.6 Plagas del cultivo de chocho andino	16
1.6.1 <i>Delia platura</i>	17
1.7 Métodos de control	18
1.7.1 El uso de la inmunidad vegetal como estrategia de control: uso de elicitores.....	19
1.8 Mecanismos de defensa inducidos por Metil Jasmonato	21
1.8.1 Alcaloides	22
1.8.1 Inhibidores de proteinasas	22
1.8.2 Volátiles.....	23
1.9 Estudio de expresión genética en <i>L. mutabilis</i>	23
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28
ÁREA DE ESTUDIO	29
MATERIALES	30
5.1 Cultivo de <i>Lupinus mutabilis</i>	30
5.2 Soluciones de activadores de defensa	30
5.3 Cuantificación de alcaloides	30
5.4 Extracción de ARN total y cuantificación	31
5.5 Tratamiento DNAsa I y Transcripción reversa	32
5.6 Validación de primers	32
5.7 Ensayos RT-qPCR	33
MÉTODOS	34
6.1 Material vegetal	34
6.1.1 Variedades en estudio.....	34
6.1.2 Desinfección y germinación de la semilla	34
6.1.3 Tratamientos con los elicitores de defensa.....	34
6.1.3.1 Preparación de las soluciones de elicitores de defensa.....	35
6.2 Determinación de alcaloides totales en ejes embrionarios de semillas de chocho .	35
6.3 Estudio de expresión genética mediante qRT-PCR	37
6.3.1 Diseño de primers.....	37
6.3.1.1 Ensamble del transcriptoma.....	37
6.3.1.2 Búsqueda de transcritos homólogos.....	37
6.3.1.3 Diseño y validación de primers	38
6.3.2 Determinación del gen normalizador para estudios de expresión genética en <i>L. mutabilis</i>	39
6.3.2.1 Exposición a los elicitores de defensa	39
6.3.2.2 Muestreo de los tejidos para análisis de estabilidad de genes	40
6.3.2.3 Extracción de ARN total	40
6.3.2.4 Síntesis cDNA.....	41
6.3.2.4.1 Tratamiento DNAsa I.....	41
6.3.2.4.2 Transcripción reversa.....	41
6.3.2.5 qRT-PCR.....	42

6.3.2.6 Análisis de resultados	42
6.3.3 Estudio de expresión de genes de defensa asociados a la vía del Ácido Jasmónico	42
6.3.3.1 Exposición a los elicitores de defensa	42
6.3.3.2 Muestreo para el análisis de expresión	43
6.3.3.6 Análisis de resultados	43
RESULTADOS.....	44
7.1 Determinación de alcaloides totales en ejes embrionarios de semillas de chocho .	44
7.2 Estudio de expresión genética mediante qRT-PCR	45
7.2.1 Preparación del transcriptoma	45
7.2.1.1 Calidad de las lecturas	45
7.2.1.2 Recorte de lecturas	47
7.2.1.3 Ensamble del transcriptoma.....	47
7.2.2 Diseño de primers.....	48
7.2.2.1 Validación de primers.....	49
7.2.3 Determinación del gen normalizador para estudios de expresión genética en <i>L. mutabilis</i>	52
7.2.4 Estudio de expresión de genes de defensa asociados a la vía del Ácido Jasmónico	55
DISCUSIÓN	58
8.1 Determinación de alcaloides totales en ejes embrionarios de semillas de chocho .	58
8.2 Determinación del gen normalizador para estudios de expresión genética en <i>L. mutabilis</i>	61
8.3 Estudio de expresión de genes de defensa asociados a la vía del Ácido Jasmónico .	63
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Secuencia de los primers utilizados	33
Tabla 2 Diseño experimental para los ensayos de normalización..	40
Tabla 3 Estadísticas básicas de los archivos de secuenciación de RNA	46
Tabla 4 Parámetros de calidad FASTQC.....	46
Tabla 5 Resumen de recorte de lecturas.....	47
Tabla 6 Reporte de estadísticas de los ensamblajes generados.....	48
Tabla 7 Primers diseñados y sus parámetros	49
Tabla 8 Valores de Ct promedio para los genes candidatos	52
Tabla 9 Valores de Ct promedio para cada factor de cada gen candidato	53
Tabla 10 Valores de estabilidad de expresión y ranking general de los genes normalizadores candidatos.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de <i>Delia platura</i>	18
Figura 2 Número de galerías y mordidas promedio efectuadas por <i>D. platura</i> en eje embrionario de chocho andino pretratados con elicitores de defensa.....	21
Figura 3 Curva de calibración de alcaloides totales en suspensión vs Absorbancia a 595 nm.	44
Figura 4 Contenido de alcaloides en ejes embrionarios de chocho andino tras la aplicación de MeJA (100 μ M) y Agua	45
Figura 5 Amplicones generados por PCR convencional de los genes en estudio	49
Figura 6 Análisis de curvas de melting de los genes en estudio.....	51
Figura 7 Índices de estabilidad en orden descendente para los genes UBC, PTB y HEL.....	54
Figura 8 Expresión relativa de los genes A) LOX2, B) AOS, C) EBOS y D) PI2 tras el tratamiento con MeJA (100 μ M) en semilla germinada de chocho	57

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Extrapolación Absorbancia 595 nm a Concentración (μ g Alcaloides/ml solvente)	37
Ecuación 2 Extrapolación Concentración en solvente a g Alcaloides/kg masa seca.....	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de cuantificación de alcaloides	82
Anexo 2 Parámetros de calidad FASTQC para el archivo de secuenciamiento SRR3423049	83
Anexo 3 Parámetros de calidad FASTQC para el archivo de secuenciamiento SRR3423050	87
Anexo 4 Parámetros de calidad FASTQC para el archivo de secuenciamiento SRR3423051 ..	91
Anexo 5 Tamaño de secuencias antes y después del recorte de calidad de la librería SRR3423049	95
Anexo 6 Tamaño de secuencias antes y después del recorte de calidad de la librería SRR3423050	95
Anexo 7 Tamaño de secuencias antes y después del recorte de calidad de la librería SRR3423051	96
Anexo 8 Distribución de contigs de la librería SRR3423049 acorde al tamaño	96
Anexo 9 Distribución de contigs de la librería SRR3423050 acorde al tamaño	97
Anexo 10 Distribución de contigs de la librería SRR3423051 acorde al tamaño	97
Anexo 11 Transcritos homólogos para los genes en estudio y sus parámetros BLAST	97
Anexo 12 Secuencias de los transcritos de mayor homología.....	98
Anexo 13 Corrida en gel de agarosa 2% de muestras de ARN de chocho andino	102
Anexo 14 Ct promedio, Tm, Eficiencia PCR y R ² para los genes candidatos.	103
Anexo 15 Ct promedio para el gen UBC entre factores	105
Anexo 16 Ct promedio para el gen PTB entre factores	106
Anexo 17 Ct promedio para el gen HEL entre factores.....	107
Anexo 18 Ruta de biosíntesis de QA	108
Anexo 19 Ruta de biosíntesis y regulación del JA	108
Anexo 20 Ruta de regulación de Auxinas	109

INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Lupinus*

Perteneciente a la familia de las Fabaceas, el género *Lupinus* engloba diversas especies de plantas cuya semilla se conoce comúnmente como chocho. Esta planta despierta gran interés debido a que su fruto constituye una fuente alta de proteína (Karara, 1987; Resta et al., 2008) a niveles comparables a la soya (Reinhard et al., 2006; Wink, 1987a), lo cual lo convierte en una buena alternativa de proteína vegetal. Adicionalmente, el chocho es fuente de aminoácidos esenciales (Karara, 1987; Resta, 2008), fibra (Frick et al., 2017), macro y micronutrientes, oligosacáridos complejos y ácidos grasos omega 3 (Baldeón et al., 2012), junto con otros compuestos útiles como carotenoides, fenoles (Tsaliki et al., 1999), saponinas, taninos, flavonoides y alcaloides (Reinhard, 2006).

Estas leguminosas crecen en las zonas templadas y subtropicales del planeta, poseyendo un ciclo de vida de entre 6 y 7 meses. Alcanzan alturas de hasta 2 metros y su inflorescencia es en racimo con corolas aromáticas de colores azules, blancas, rosadas, violetas y amarillas. El fruto por su parte, es una vaina de la cual se producen entre 5 a 6 semillas (Falconí, 2012).

Las especies domesticadas de interés comercial y agronómico incluyen a *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* (Frick, 2017; Ganzera et al., 2010; Reinhard, 2006). Específicamente, *L. mutabilis* es la especie común en países de América del Sur, especialmente en las regiones andinas gracias a la resistencia que posee a las condiciones adversas del ambiente (Ortega-David & Rodriguez-Stouvenel, 2014). Posee una distribución que va desde Colombia, Ecuador y Perú hasta Bolivia (Falconí, 2012). Se considera como un cultivo emergente dada su capacidad para adaptarse a suelos pobres en nutrientes y secos (Chludil et al., 2009; Tsaliki, 1999). Y el rango de climas y latitudes a la que pueden crecer es amplio dada su alta plasticidad (Falconí, 2012; Karara, 1987).

1.2 El chocho en el Ecuador

En el Ecuador, el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) ha sido el organismo encargado de la mantener la colección de *Lupinus* desde 1988. Es una especie con alta variabilidad (Falconí, 2012), que tras la colonización española a América Latina, fue designada, en conjunto con otros cultivos tradicionales como la quinua y el amaranto, como alimento exclusivo para el consumo de las culturas indígenas, quienes supieron conservar esta diversidad a través de los años (Mina et al., 2017).

Se pueden encontrar hasta 250 variedades de chocho andino en el Ecuador, sin embargo, entre las más cultivadas están las variedades mejoradas por selección de germoplasma del Perú conocidas como INIAP 451 Guaranguito e INIAP 450 Andino, siendo esta última la que da mejores rendimientos (600-1500 kg/ha) en comparación con las variedades criollas (250-430 kg/ha). Se cultivan en campos de 2500 y 3400 m.s.n.m. de las provincias de Chimborazo y Cotopaxi principalmente (Falconí, 2012). Y el grano posee en promedio 41% de proteínas, 25% de lípidos y 3% de alcaloides (Hatzold et al., 1983; Schoeneberger et al., 1982).

Es un alimento fácilmente accesible para la población ecuatoriana, el cual en un principio era consumido principalmente por poblaciones rurales, pero hoy en día su consumo ha aumentado en las zonas urbanas como una alternativa económica en sustitución a la proteína animal (Falconí, 2012). Este creciente interés comenzó alrededor de los años noventa, con el boom de exportación de la quinua, el cual aumentó la demanda internacional por alimentos poco conocidos, pero con alto valor nutricional (Tamrakar et al., 2007). De esta manera, se promovió su consumo por el alto contenido de proteína, hierro, vitaminas y buen sabor, y de la harina que se obtiene de la molienda se realizan sopas, galletas, leche, margarina, entre otros platos (Falconí, 2012).

1.3 Beneficios adicionales

La importancia del cultivo de chocho no sólo recae en sus bondades nutricionales, sino que también enriquece los suelos al aumentar los niveles de nitrógeno, fósforo y contenido de materia orgánica. Asimismo, su cultivo sirve para forraje y como alimento para animales rumiantes (Chludil, 2009). La planta de chocho también sintetiza metabolitos secundarios, como alcaloides, de los cuales se ha reportado más de 170 estructuras para *Lupinus* (Pozuelo et al., 2001). De éstos, se han encontrado aplicaciones en la medicina para la fabricación de medicamentos obstétricos, y antiarrítmicos (Wink, 1987). También se reportan que tienen efectos hipoglucémicos, citotóxicos, antipiréticos, alucinógenos y teratogénicos en la medicina tradicional (Wink, 1987). Tienen actividad sobre el sistema circulatorio, enfermedades de la piel, entre otras aplicaciones como agente neuroprotectivo, antibiótico, antivírico, anti-hepatitis, antiinflamatorio y antioxidante (Romeo et al., 2018).

1.4 Los alcaloides quinolizidínicos

Los alcaloides quinolizidínicos (QA) son metabolitos nitrogenados de bajo peso molecular comunes dentro de la familia Fabaceae (Ghorbanpour, 2014; Wink & Witte, 1985). Sirven a la planta como mecanismo de defensa ante ataques de herbívoros, microorganismos e insectos principalmente (Ganzera, 2010; Resta, 2008). Los tipos de alcaloides y su proporción dependen de la especie, el sitio de cultivo y las condiciones ambientales principalmente (Ortega-David, 2014). Éstos confieren al grano un sabor desagradable (Ortega-David, 2014), por lo que éstos son tradicionalmente retirados por un proceso de lavado o desamargado (Ortega-David, 2014).

La síntesis de alcaloides en el chocho ocurre en los cloroplastos de las partes aéreas para luego ser traslocados por el floema hasta el resto de la planta, y de manera abundante en los frutos y semillas (Wink, 1985). También se han reportado su presencia en polen y los pétalos (Wink, 1985). Este método de traslocación de metabolitos es ventajoso ya que repele

selectivamente a organismos que se alimentan del floema. Probablemente, esta estrategias de defensa se especializó en algunas especies de la familia de las legumbres dado que poseen en su mayoría tejidos suaves con pocas barreras estructurales (Wink, 1987).

1.5 La domesticación del chocho

El consumo de niveles altos de estos alcaloides produce toxicidad (Karara, 1987), por lo que los esfuerzos de domesticación se han concentrado en seleccionar y producir variedades no amargas de chocho. Esto ha resultado en la selección de variedades cuya semilla posee niveles de alcaloides seguros para el consumo (Karara, 1987). Éstas son conocidas como “dulces” y poseen entre el 0.05 y 0.02% de alcaloides (Chludil, 2009; Ganzera, 2010).

Lamentablemente, la domesticación provoca un fenómeno común que es la reducción del *fitness* de la especie. Este es el caso de las variedades dulces (*sweet*) de chocho cuya plantación en campo requiere el uso obligatorio de pesticidas ya que son plantas selectivamente parasitadas por herbívoros (Wink, 1987) en comparación sus contrapartes *wild-type* altas en alcaloides (Wink, 1988). En su lugar la domesticación debe dirigirse hacia la selección de variedades que almacenen alcaloides en sus tejidos a excepción de la semilla, lo cual se ha logrado en otras especies vegetales como la papa, o la selección de variedades con metabolitos secundarios adicionales que estén involucrados en la resistencia (Wink, 1988).

1.6 Plagas del cultivo de chocho andino

La entomofauna asociada al cultivo de chocho es diversa y viene dada por la forma tradicional de cultivar chocho, la cual se realiza en “monocultivo, asociación, intercalado y en rotación con otros cultivos” como maíz, cebada, quinua, haba, arveja, melloco, etc. (Lomas et al., 2012; Mina, 2017). Comprende al menos 5 órdenes de insectos entre ellos Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hemiptera y Thysanoptera. De las especies asociadas a los grupos anteriores, alrededor del 18% son plagas, 26% depredadores, 6% polinizadores y el resto no

poseen todavía un rol ecológico confirmado (Mina, 2017). Es de importancia recalcar que las plagas de chocho son abundantes y específicas a lo largo del estado fenológico del cultivo. Pocas han sido clasificadas a nivel de especie, y se sabe que las familias de insectos que afectan el chocho en el Ecuador, también lo hacen en países como Perú y Bolivia (Mina, 2017). La mayoría de las plagas corresponden a insectos del orden Diptera, que son considerados como minadores y perforadores capaces de producir ataques masivos y grandes pérdidas económicas.

1.6.1 *Delia platura*

A partir del año 2009, una de las principales plagas que azota los cultivos de chocho en el Ecuador es la larva de la mosca *Delia platura* (Diptera: Anthomyiidae) causando hasta el 56% de pérdidas del grano en germinación (Lomas, 2012). Ésta es una plaga polífaga con distribución cosmopolita que afecta diversos cultivos como la soya y maíz, fréjol, arveja, pepino, melón, cebolla, pimienta y papa. En su estadio larval causa daños a semillas en germinación mediante la penetración y formación de galerías (Falconí, 2012; Sotelo, 2017) que realizan con el fin de alimentarse. Como consecuencia, las semillas no terminan de germinar, y aquellas que sí lo hacen a menudo generan plántulas débiles que mueren antes de madurar.

El ciclo de vida desde huevo hasta adulto dura alrededor de 3 a 4 semanas. Comienza con el apareamiento de las moscas adultas a partir del segundo o tercer día de haber emergido. Las hembras colocan alrededor de 270 huevos, de preferencia en suelos húmedos con materia orgánica en descomposición (abono y restos de cultivos), y/o semillas en germinación. Después de 2 a 4 días de la puesta, los huevos eclosionan para generar larvas, quienes completan un ciclo de 21 días en el suelo mediante la alimentación de los cotiledones de las semillas en emergencia. Tras este periodo, las pupas generadas pasan al menos 10 días en el suelo para luego emerger como moscas adultas (Gill et al., 2016) (Figura 1).

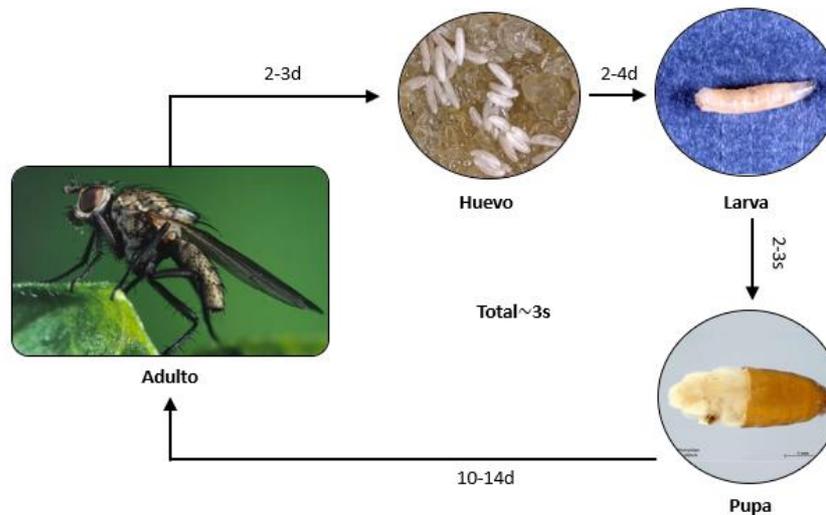


Figura 1 Ciclo de vida de *Delia platura*

El daño causado por *D. platura* se ve promovido e intensificado por algunos factores como el clima, tipo de cultivo y manejo del suelo. Por ejemplo, se sabe que la mosca tiene como preferencia climas fríos y húmedos, así como prefiere alimentarse de semillas de ciertas especies más que otras. En cuanto al manejo del suelo, las fechas tempranas de siembra, y los cultivos de cobertura pesada aumentan el daño que puede causar la mosca de la semilla (Gill, 2016).

1.7 Métodos de control

Los métodos de control de esta plaga pueden ser de tipo biológico, cultural y químico. Dado que la mayoría del ciclo de vida de la mosca ocurre en el suelo, existen pocos depredadores naturales que pueden constituir como un control biológico. Existen casos de depredación por arañas, hormigas y pájaros, pero no constituyen como una estrategia de control efectiva (Gill, 2016). En cuanto al control cultural, éste engloba diversas prácticas de agricultura tales como la maduración del estiércol para abono, eliminación de gradientes de humedad en el suelo (Gill, 2016), remoción de malezas, y evitar la plantación de chocho en campos de brócoli, así como el utilizar residuos del mismo como fertilizante del suelo (Tamrakar, 2007). Finalmente, el

control químico es el más efectivo, con la capacidad de aumentar el rendimiento del cultivo de chocho en 1.5 hasta 5 veces más (Mina, 2017). En Ecuador se utilizan principalmente 5 tipos de insecticidas en el cultivo de chocho: los neonicotinoides, los carbamatos, los piretroides sintéticos, los organofosfatos y el Spinosad (Guerra et al., 2017), siendo el Thiodicarb (carbamato) el que se reporta como más efectivo para el control de *D. platura*, con un 75% de control en campo (Samaniego et al., 2015).

La desventaja del control químico radica en que existe siempre la eminente generación de resistencia del insecto a estos ingredientes activos (Sotelo, 2017). Adicionalmente, la mayoría de agricultores desconocen las dosis adecuadas de aplicación de estos plaguicidas, provocando impactos a largo plazo tanto al ambiente como a la salud (Mina, 2017). De esta manera, surge el interés por encontrar medidas alternativas más ecoamigables y con menos riesgos para el ser humano. Hasta el momento, se ha explorado la alternativa de control con microorganismos entomopatógenos, encontrándose que el hongo *Beauveria bassiana*, tuvo una efectividad del 44.8% para el control de *D. platura* en campo (Samaniego, 2015).

1.7.1 El uso de la inmunidad vegetal como estrategia de control: uso de elicitores

Cuando los mecanismos de defensa estructurales de la planta son sobrepasados por los organismos, se prende una segunda barrera de defensa asociada a la traducción de las señales inducidas por los patógenos en mensajes que activan estrategias de defensa propias de la inmunidad vegetal (Pieterse et al., 2012). Esta resistencia sistémica inducida (ISR) es efectiva contra un amplio grupo de atacantes, y está asociado con la producción de compuestos de defensa como proteínas PR (*pathogenesis-related*), inhibidores de proteinasas, y volátiles atrayentes de parasitoides y depredadores de herbívoros. Sin embargo, lo que determina la actividad de amplio espectro de la ISR es la potenciación del tejido para reaccionar de manera más efectiva a la condición de estrés (Pozo et al., 2004).

Estos eventos de transmisión y traducción de señales están mediados por fitohormonas centrales tales como el Ácido Salicílico (SA), Ácido Jasmónico (JA) y Etileno (ET), interviniendo en rutas metabólicas vegetales conectadas que desencadenan la expresión de genes de defensa (Pieterse, 2012). Se sabe también que existen diversas moléculas pequeñas capaces de intervenir y regular estas vías de señalización. Éstas se conocen como elicitores o activadores de defensa, que al ser aplicados desencadenan los mismos mecanismos de inmunidad vegetal, de manera que pueden constituir una estrategia para la protección de plantas contra patógenos (Pieterse et al., 2009).

Un ejemplo de elicitador es el BTH (Benzothiadazole) que mimetiza los efectos de SA, con menos efectos fitotóxicos, y respuestas más eficientes que la hormona natural, para inducir resistencia a enfermedades, como el TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) en Tabaco, (Bektas & Eulgem, 2015), el mildiú veloso en Brócoli, y el oídio en Arroz (Thakur & Singh, 2013). O el elicitador BABA (Ácido β -aminobutírico) que reporta generación de resistencia contra *Penicillium italicum* en naranja, y el Metil Jasmonato (MeJA) para la inducción de glucosinolatos en colza, el control de la araña roja en fréjol, etc. Asimismo, se encuentran más ejemplos de inductores de resistencia como el quitosano, otros análogos del SA, productos fúngicos y extractos de algas (Thakur & Singh, 2013).

Recientemente, en un estudio se demostró que la aplicación de MeJA como elicitador de defensa en semilla germinada de chocho andino, redujo significativamente el daño mecánico provocado por larva de *D. platura* en comparación con la semilla no tratada (Figura 2) (Sotelo, 2017). Se determinó una reducción significativa del número de galerías y mordidas tanto en el eje embrionario como en cotiledones, convirtiendo al tratamiento con MeJA como un potencial método de control para la plaga. Los mecanismos de defensa que promueven esta inmunidad son desconocidos, sin embargo, el elucidarlos contribuye en un futuro a desarrollar programas

de producción agrícola, cruce y obtención de semillas de chocho más eficientes (Falconí, 2012).

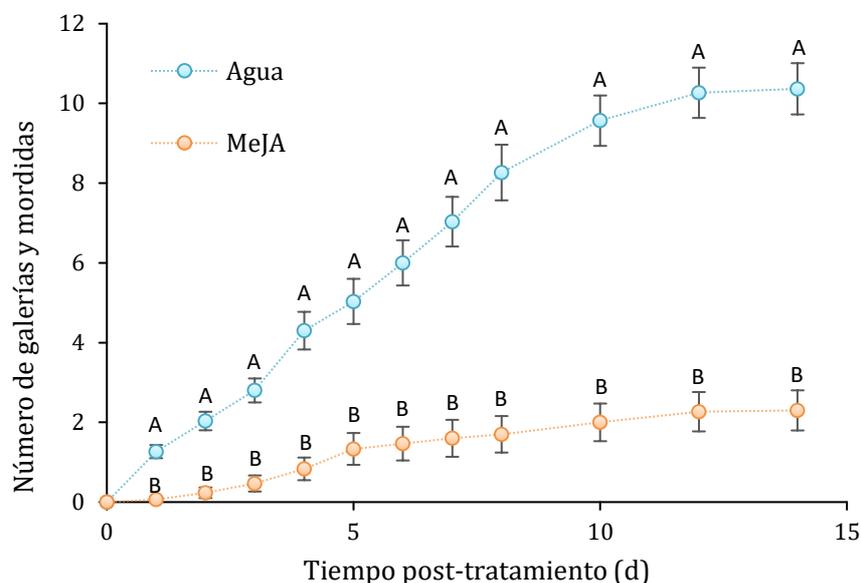


Figura 2 Número de galerías y mordidas promedio efectuadas por *D. platura* en eje embrionario de chocho andino pretratados con elicitores de defensa. Se observa que desde el día 1 el número de galerías y mordidas es diferente entre el tratamiento con Agua y MeJA (100 μ M). Letras no compartidas indican diferencias significativas.

Fuente: Representación propia de los datos crudos tomados de Sotelo, 2017

1.8 Mecanismos de defensa inducidos por Metil Jasmonato

El MeJA es un conocido elicitador de la ruta del JA ya que emula el efecto que tiene el daño mecánico y la herbivoría sobre la vía de señalización de esta hormona (Turner et al., 2002). Éste promueve la síntesis y acumulación del JA a partir del Ácido Linoleico de la membrana de los cloroplastos, mediante la activación primera del gen *LOX2*, y la subsecuente expresión de los genes *downstream* como el gen *AOS* y *AOC* (Chico et al., 2008). La acumulación de JA en las células desencadena la activación de diversos factores de transcripción como MYC2, que por unión a promotores prende un sinnúmero de genes de respuesta (Hickman et al., 2017).

De manera general, basado en la planta modelo *Arabidopsis*, el tratamiento con MeJA induce la expresión de 9 tipos de genes: de síntesis de Jasmonatos, de defensa, de respuesta a

estrés, de senescencia, de modificación de la pared celular, de metabolismo hormonal, de almacenamiento, de transducción de señales, y de metabolismo primario y secundario (Seob et al., 2007). Todos estos genes corresponden a los que se les llama en inglés *JA-responsive genes*, de los cuales resultan de interés aquellos que prenden estrategias de defensa contra el daño de insectos.

Son diversos los mecanismos que pueden entrar en acción, pero predominan y son más extensos aquellos asociados al metabolismo secundario. De este se destaca la producción de flavonoides, taninos, antocianinas, ligninas, glucosinolatos, inhibidores de proteinasas, lectinas, defensinas, volátiles, fitoalexinas (incluyen isoflavonoides, terpenoides, alcaloides) etc. (War et al., 2012). Otros procesos no asociados al metabolismo secundario, pero que también son de respuesta al JA, incluyen la formación de tricomas, producción de enzimas (peroxidasas, lipooxigenasas, polifenoloxidasas) y secreción de extra néctar floral (EFN – *Extra floral nectar*) entre otros (Hickman, 2017; War, 2012).

1.8.1 Alcaloides

La inducción de la biosíntesis alcaloides en respuesta a la acumulación de JA fue de las primeras rutas de defensa en ser caracterizadas (Wasternack & Hause, 2013). Estos permiten la protección contra insectos porque causan toxicidad (Wink, 1987). Se pueden evaluar fácilmente por espectrofotometría, sin la necesidad de determinarlos individualmente, sobrellevando la limitante de falta de estándares químicos para cada uno de los alcaloides (Barlóg, 2002; Sreevidya & Mehrotra, 2003). La técnica funciona gracias a la capacidad de los alcaloides para formar complejos con colorantes acídicos, extraíbles con solventes orgánicos (Levine & Fischbach, 1955).

1.8.1 Inhibidores de proteinasas

Los inhibidores de proteinasas son de las proteínas de defensa más abundantes en plantas, que se acumulan especialmente en semillas y tubérculos (War, 2012). Éstos han sido

extensivamente estudiados en plantas como el tomate (Wink, 1983) y se reporta que son ampliamente inducidos por elicitores como la sistemina, oligosacáridos, jasmonatos etc. (Shoji et al., 2000). Existen dos subfamilias, la tipo I y II, siendo los de tipo I inhibidores con 1 sólo sitio activo para la inhibición de quimiotripsinas, y los de tipo II inhibidores con dos sitios activos para la inhibición de tripsinas y quimiotripsinas. Las hormonas vegetales inducen de manera especial la producción sistémica de los inhibidores de proteinasas tipo II (Zhang et al., 2004). El mecanismo de acción está basado en la unión de estos inhibidores con las enzimas digestivas del tracto intestinal de los insectos, inhibiendo así su actividad y reduciendo la digestión proteica. Esto provoca la incapacidad de absorber aminoácidos, resultando en la baja en el desarrollo y muerte por inanición del insecto (War, 2012).

1.8.2 Volátiles

Los volátiles son un mecanismo de defensas indirecto, ya que funcionan mediante la atracción de los enemigos naturales del herbívoro atacante, o repeliendo la alimentación u oviposición (War, 2012). Pertenecen al grupo de los terpenos, de los cuales todos los monoterpenos, muchos sesquiterpenos y poco diterpenos funcionan como señales químicas aéreas por tener una presión de vapor alta a temperatura ambiente facilitando su volatilización (Pichersky et al., 2004). De entre los monoterpenos, el E- β -ocimeno es de los más comunes encontrados en las mezclas de volátiles emitidas tras la herbivoría o daño mecánico (Arimura et al., 2003).

1.9 Estudio de expresión genética en *L. mutabilis*

En cuanto al estudio de expresión de genes se puede mencionar que, hasta el momento, sí se han realizado estudios de expresión en 3 las 4 especies domesticadas, con excepción del chocho andino *L. mutabilis*. Estos estudios se realizan mediante la técnica qRT-PCR que permite encontrar diferencias en las cantidades de transcritos iniciales de una muestra en un

tiempo y bajo un tratamiento target y control determinado (Andersen et al., 2004). Los niveles de expresión relativos se estudian con métodos como el de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001).

Para esta técnica se requiere de uno o varios genes constitutivos estables que permitan determinar los niveles de expresión basal, para el cual se calibrarán o normalizarán los resultados obtenidos (Taylor et al., 2016). En *L. albus* se ha propuesto el gen de referencia PP2AA3 (Serina/treonina fosfatasa) y *UBC* (Ubiquitina C) (Wang et al., 2015), para *L. luteus* el gen *LI*ACT (Actina) (Frankowski et al., 2015), y para *L. angustifolius* los genes *TUB* (β -tubulina), 18s rRNA (Przysiecka et al., 2015), *UBC* (Ubiquitina C), *HEL* (Helicasa) y *PTB* (*Polypyrimidine tract binding protein*) (Taylor, 2016). No obstante, sólo para *L. angustifolius* se ha realizado un estudio completo de identificación de genes de referencia (Taylor, 2016), de manera que los genes candidatos propuestos son los más robustos para ser considerados como genes normalizadores. Éstos son determinados en base al nivel de estabilidad calculado con diferentes algoritmos que evalúan las variaciones de expresión intra e inter grupos (Taylor, 2016).

Ya que no existe un genoma secuenciado para *L. mutabilis* es necesario predecir las secuencias de los genes de interés mediante el ensamble de transcriptomas, para el cual sí existe información. El ensamble se realiza generando *contigs* (secuencia contigua más larga) con una estrategia *de novo*. En esta técnica utiliza la información provista por las lecturas (*reads*) encontradas en la librería, en donde cada una representa un nodo, que pueden ser unidos entre sí, si entre secuencias existe el solapamiento de al menos 5 nucleótidos (Compeau et al., 2011).

En este estudio se decidió evaluar el efecto del MeJA sobre 3 estrategias de defensa bastante conocidas y caracterizadas. Primeramente, se decidió evaluar si existe un cambio en la biosíntesis de alcaloides, un metabolito secundario encontrado naturalmente en *Lupinus*

(Frick, 2017). Y luego se realizó un estudio de expresión genética para evaluar si existe inducción de un gen que codifica para inhibidores de proteinasas y otro que codifica para una enzima productora de volátiles.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente demanda de alimento para suplir el consumo humano y animal, el cultivo de leguminosas aumentará de manera rápida dada las ventajas nutricionales que ofrecen (Falconí, 2012). Es por ello que el estudio de estas plantas resulta de suma importancia para conducir la producción hacia una más eficiente y de calidad (Barlóg, 2002), con el fin de asegurar la soberanía alimentaria de un país (Falconí, 2012).

Un ejemplo de leguminosa importante para América del Sur es el chocho andino, *Lupinus mutabilis*, que al ser la especie de lupino menos estudiada, carece todavía de un buen entendimiento y manejo de los aspectos agrotécnicos y biológicos adecuados para el aprovechamiento máximo de este cultivo (Schoeneberger, 1982). Específicamente en Ecuador, la investigación relacionada al chocho y las mejoras en el uso de agroquímicos, técnicas de siembra, selección fenotípica de semillas, combate de plagas, entre otros, se encuentra aún deficiente (Falconí, 2012). Es así que de las 80,000 hectáreas de tierras propicias en el país para su cultivo, sólo se ha logrado aprovechar de 8,000 a 10,000 hectáreas, generando una subutilización de tierras del 90%, y la necesidad de importar chocho desde países como Perú y Bolivia para suplir la demanda nacional (Caicedo & Peralta, 2000).

La incidencia de enfermedades y plagas es una de las principales causas en el país de esta situación. Especialmente, a nivel de semilla, plagas como *Delia platura* puede generar pérdidas económicas de hasta \$1100/ha chocho cultivado, y una baja del rendimiento a 250kg/ha (Mina, 2017) en comparación con la media nacional de 818,1kg/ha (Moncayo et al., 2000). El control químico de la plaga es el más utilizado hasta el momento, pero dado los impactos en el ambiente y la salud, las medidas alternativas, tales como el aprovechamiento de la resistencia inducida por medio de elicitors resultan de gran interés (Sotelo, 2017). No obstante, para que estas estrategias sean factibles e implementables en la realidad, es necesario la investigación a fondo de los mecanismos de inducción de resistencia para que sean efectivos.

La comprensión profunda de la interacción planta-patógeno es necesaria para el desarrollo a largo plazo de estrategias efectivas de manejo de plagas (Neil et al., 2017). Y el poder elucidar, y crear conocimiento basal sobre los procesos moleculares y físicos que ocurren en la planta, permite también direccionar de mejor manera programas de mejoramiento genético, así como nuestra habilidad para predecir y potenciar el desempeño de la inmunidad vegetal como una estrategia de control factible (Neil, 2017).

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Elucidar los mecanismos de inmunidad efectivos contra *Delia platura* tras la aplicación de Metil Jasmonato en semilla germinada de chocho andino, mediante la determinación de la producción de alcaloides y análisis de expresión de genes de defensa.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de alcaloides en ejes embrionarios de semillas de chocho tras la aplicación de Metil Jasmonato, utilizando un método espectrofotométrico.
- Utilizar herramientas bioinformáticas para diseñar primers homólogos para los genes de estudio.
- Determinar un gen normalizador estable para la realización de estudios de expresión génica en *L. mutabilis*,
- Determinar el cambio en la expresión de dos genes de síntesis de Ácido Jasmónico (*LOX2*, *AOS*) y dos genes de respuesta de la vía metabólica (*PI2*, *EBOS*) en ejes embrionarios de semilla de chocho, tras la aplicación de Metil Jasmonato.

ÁREA DE ESTUDIO

Las semillas de chocho andino utilizadas, correspondientes a la variedad INIAP 450 Andino, INIAP 451 Guaranguito, y Criolla, así como el extracto de alcaloides totales de chocho, variedad INIAP 451 Guaranguito, y tierra abonada, fueron donados por el Departamento de Protección Vegetal, de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias), Quito, Ecuador.

Por otra parte, los análisis moleculares y ensayos de siembra se realizaron en las instalaciones e invernadero, respectivamente, del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

MATERIALES

5.1 Cultivo de *Lupinus mutabilis*

- Semillas de *Lupinus mutabilis* variedad I-451 Guaranguito, I-450 Andino y Criolla, tamaño grande (agujero de malla: 0.9cm).
- Cajas Petri
- Algodón
- Tierra negra, abonada, tamizada y esterilizada
- Envases plásticos (48,53 dm³) con tapa con malla anti insectos

5.2 Soluciones de activadores de defensa

- Metil Jasmonato (MeJA) 95% (Sigma Aldrich)
- Ácido Salicílico (SA) $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich)
- Tween-20
- Etanol 96%

5.3 Cuantificación de alcaloides

- Liofilizador TFD 5503 (Il Shin® Bio Base)
- Mortero y pistilo
- Balanza analítica Pioneer PA214 (OHAUS)
- Agitador de nutación 2.5/3 rpm (Fisher Scientific)
- Nitrógeno líquido
- Extracto de alcaloides totales (pureza 16.86%) de chocho andino variedad I-450
- Almidón de maíz
- Tubos Falcon 15 ml (Boeco)
- Tubos de vidrio 5 ml con fondo plano y tapa rosca

- Solución NaOH 15%
- Cloroformo
- Solución Azul de Bromotimol 3% en 0.001M NaOH
- Buffer de Borato, pH 8
- Solución NaOH 0.002M en Metanol
- Espectrofotómetro UV-Vis (Jenway 7315)
- Cubeta de cuarzo 1cm (10mm de camino óptico)

5.4 Extracción de ARN total y cuantificación

- Nitrógeno líquido
- Mortero, pistilo y espátula
- Tubos Eppendorf 2 ml, 1.5 ml y 0.6 ml
- Sea Star® Vortex Mixer (Heathrow Scientific)
- Centrífuga refrigerada (Sigma 1-14k)
- Fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen)
- Qubit™ RNA XR Assay Kit (Invitrogen)
- Qubit™ RNA IQ Assay Kit (Invitrogen)
- Cámara de electroforesis Enduro™ Horizontal Electrophoresis Unit (Labnet)
- Fotodocumentador Enduro™ GDS Gel Documentation System (Labnet)
- TAE 1X
- SYBR Safe (Invitrogen)
- Agarosa (Bioline)
- TRIzol Reagent (Invitrogen)
- Cloroformo
- Buffer 0.8M citrato de sodio/ 1.2M NaCl

- Isopropanol
- Etanol 75%
- Agua PCR

5.5 Tratamiento DNasa I y Transcripción reversa

- Termociclador Labnet TC020-24 MultiGene™ Mini
- Tubos Eppendorf 0.2 ml
- DNase I (RNase free) 2U/μl (Invitrogen)
- 10X DNase I Buffer
- EDTA 25 mM (Invitrogen)
- Oligo (dT)₁₅ Primer (Promega)
- GoScript™ 5X Reaction Buffer (Promega)
- GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega)
- MgCl₂ 25 mM (Promega)
- PCR Nucleotide Mix (Promega)
- Recombinant RNAsin® Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- Agua PCR

5.6 Validación de primers

- Termociclador Labnet TC020-24 MultiGene™ Mini
- Fotodocumentador Enduro™ GDS Gel Documentation System (Labnet)
- Cámara de electroforesis Enduro™ Gel XL Electrophoresis System (Labnet)
- 10X Buffer PCR (Invitrogen)
- 50 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 10 mM dNTPs Mix (Invitrogen)

- 5U/μl Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
- 10 μM Primers (Macrogen) (Tabla 1)
- Agua PCR
- TBE 1X
- SYBR Safe (Invitrogen)
- Agarosa (Bioline)

Tabla 1 Secuencia de los primers utilizados

Gen	Nombre	Secuencia (5'→3')	Función
<i>UBC</i>	Lm- <i>UBC</i> -F	CATAATATCCACTATGCAGGCTTCT	Ubiquitina C
	Lm- <i>UBC</i> -R	ACAGACAAGAGTAATATCGGGATCA	
<i>PTB</i>	Lm- <i>PTB</i> -F	GGTTTCATACTATGCTTCATCTTCG	Proteína de Unión de Tracto de Polipirimidina
	Lm- <i>PTB</i> -R	GGATATCTCCAGGGCTTTTATTGTT	
<i>HEL</i>	Lm- <i>HEL</i> -F	CAACTGTTTCCTGATATTCCAGTTC	Helicasa
	Lm- <i>HEL</i> -R	CCAGACCTATGATCTTTCTCACTGT	
<i>LOX2</i>	Lm- <i>LOX2</i> -F	AACCATAGAGACCTGCTTTAGTCCT	Lipoxigenasa 2
	Lm- <i>LOX2</i> -R	CTCTATTGATAAGGTCAGCAGGAAG	
<i>AOS</i>	Lm- <i>AOS</i> -F	TTACAGAATCCTCTCATACTCGAC	Aleno óxido sintasa
	Lm- <i>AOS</i> -R	GTAGGTTGAATGAAACTCTGGAATG	
<i>PI2</i>	Lm- <i>PI2</i> -F	CATCTACAGCTGATGAACACCTC	Inhibidor de proteinasas II
	Lm- <i>PI2</i> -R	CAAGAAGCAGTGCAAATAGTAGTTC	
<i>EBOS</i>	Lm- <i>EBOS</i> -F	CAACTTGAGCTCATTGATGTTCTTC	Sintasa de (E)β-ocimeno
	Lm- <i>EBOS</i> -R	AAGTCTTGTTCCCTTTTGGTGTATC	

5.7 Ensayos RT-qPCR

- Termociclador Techne PrimeQ Real-time PCR System
- SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad)
- Agua PCR
- Primers 10 μM (Tabla 1)

MÉTODOS

6.1 Material vegetal

6.1.1 Variedades en estudio

Para la determinación de alcaloides y análisis de expresión de genes de defensa, se utilizó la variedad I-450 Andino al ser la variedad que dio mejores resultados en el estudio previo de Sotelo (2017). Se usó los ejes embrionarios de la semilla germinada como material inicial, tomando como estado germinado cuando la radícula superaba 2mm de longitud (Pérez et al., 2013).

Para los ensayos de normalización del gen calibrador, se utilizaron 3 variedades: I-450 Andino, I-451 Guaranguito y Criolla. El material inicial en este caso fueron los cotiledones y las hojas de plantas de chocho de dos estadios fenológicos: *early seedling* (2 a 3 hojas arriba del epicótilo; 2 semanas de desarrollo), y *seedling* (4 a 5 hojas arriba del epicótilo, 4 semanas de desarrollo) (Falconi et al., 2015).

6.1.2 Desinfección y germinación de la semilla

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min, seguido de 3 lavados con agua destilada de 5 min cada uno. Se esparcieron las semillas en cajas Petri con algodón humedecido con 10 ml de agua destilada, y se expusieron a luz de sol indirecta hasta su germinación.

6.1.3 Tratamientos con los elicitores de defensa

Para la determinación de alcaloides y el estudio de expresión de genes de defensa, se trataron las semillas germinadas con el elicitador en estudio (MeJA) y el control de agua destilada (Sotelo, 2017). De la misma manera se realizó en los ensayos de normalización, pero se probó un tratamiento adicional con el elicitador SA.

6.1.3.1 Preparación de las soluciones de elicitores de defensa

Solución de Metil Jasmonato 100 μ M

Se disolvió 2.3 μ l de MeJA 95% (Sigma Aldrich) en 9.7 μ l de etanol al 96%, y se añadió a 100 ml de agua destilada con Tween-20 al 0.01%.

Solución de Ácido Salicílico 1 mM

Se pesó 0.0138g de SA \geq 99% (Sigma Aldrich) y se agregó 1ml de etanol al 96% hasta su disolución. Luego se añadió en agua destilada con Tween-20 al 0.01% y se aforó a 100 ml.

Solución Control

Se tomó 100 ml agua destilada con Tween-20 al 0.01% y se añadió el mismo volumen de etanol al 96% utilizado en la solución de MeJA 100 μ M.

6.2 Determinación de alcaloides totales en ejes embrionarios de semillas de chocho

Se tomaron grupos de 20 semillas germinadas y se las incubó en los tratamientos de MeJA y Agua a 4°C, durante 8h en oscuridad como lo descrito por Sotelo (2017). Se realizó un total de 3 réplicas biológicas. Tras la incubación, las semillas fueron trasplantadas a recipientes plásticos tapados que contenían 30g de tierra esterilizada. Luego se dejaron en oscuridad (Sotelo, 2017) a condiciones ambientales, y se regaron con iguales volúmenes de agua destilada según era necesario. Se muestrearon 5 semillas de cada tratamiento a los 0d, 1d, 4d, y 9d post-tratamiento, las cuales se lavaron, se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Las muestras se liofilizaron y los ejes embrionarios fueron molidos. El contenido de alcaloides totales fue determinado por colorimetría según el método de Barlóg (2002) con algunas modificaciones (Anexo 1). Para ello, 20 mg de material vegetal se pesaron en tubos de ensayo de vidrio, y se alcalinizó durante 15 min con 40 μ l de NaOH 15%. Posteriormente se añadió 2 ml de cloroformo y se dejó extraer por 24h en oscuridad a 20°C.

Al día siguiente, 50 μ l del extracto de alcaloides se diluyeron con 2.95 ml de cloroformo en un tubo Falcon de 15 ml para un volumen final de 3 ml. Luego se agregó 1 ml de una solución de Azul de Bromotimol (mezcla de Buffer de Borato, pH 8 y 3% de solución de Azul de Bromotimol en 0.001M NaOH a una razón 24:1), y se mezcló en un agitador de nutación durante 30 min (Barlóg, 2002), para promover la mezcla de las fases inmiscibles y la subsecuente formación pares iónicos entre los alcaloides y el colorante (Levine, 1955).

Tras la agitación, se retiró la fase acuosa por pipeteo, quedando la fase orgánica con los complejos alcaloides-Azul de Bromotimol (relación 1:1). Luego, se realizó un cambio de pH agregando 2 mL de 0.002M NaOH en metanol, induciendo así la ruptura de los complejos. De esta manera, se midió por espectrofotometría la intensidad del color azul generado por las moléculas de colorante libre, a una longitud de onda de 595 nm (Barlóg, 2002). Se utilizó cloroformo como blanco para la calibración del equipo.

Para la extrapolación de los datos de absorbancia a concentración de alcaloides, se realizó una curva de calibración utilizando como estándar un extracto en polvo de alcaloides totales de chocho andino I-450 (pureza 16.86%). Siguiendo la metodología previa, se realizó un *pool* de 10 extractos de alcaloides en cloroformo, del cual se realizaron diluciones y se midió la absorbancia por cada concentración conocida probada. Las mediciones se realizaron por triplicado para un total de 3 réplicas biológicas.

Se determinó el rango de concentración de alcaloides en donde se cumple la ley de Beer (Birner, 1969), y se procedió a transformar los datos de absorbancia en datos de concentración (μ g Alcaloides/ml cloroformo) con la curva de calibración (Ecuación 1).

Éstos se multiplicaron por un factor de dilución de 100 y por el volumen de solvente orgánico utilizado (2 ml), y se dividió para la masa inicial (20mg chocho), obteniendo así la concentración de alcaloides por unidad de peso seco (g Alcaloides/kg materia seca) (Ecuación 2). Las diferencias estadísticas entre medias se determinaron con una prueba de ANOVA (α

0.05) y una prueba de comparación múltiple de Tukey en el programa Minitab® 18 (Minitab, 2017).

Ecuación 1 Extrapolación Absorbancia 595 nm a Concentración (μg Alcaloides/ml solvente)

$$\frac{\mu\text{g Alcaloides}}{\text{ml solvente}} = \frac{(\text{Abs } 595\text{nm} - 0,018)}{0,0139} \times FD$$

Ecuación 2 Extrapolación Concentración en solvente a g Alcaloides/kg masa seca

$$\frac{\text{g Alcaloides}}{\text{kg masa seca}} = \frac{\mu\text{g Alcaloides}}{\text{ml solvente}} \times \frac{2 \text{ ml solvente}}{20 \text{ mg masa seca}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^6 \mu\text{g}} \times \frac{10^6 \text{ mg}}{1 \text{ kg}}$$

6.3 Estudio de expresión genética mediante qRT-PCR

6.3.1 Diseño de primers

6.3.1.1 Ensamble del transcriptoma

Se descargó 3 archivos de secuenciación de ARN en formato FASTQ para *L. mutabilis* de la base de datos SRA del NCBI (Accesión GenBank no. SRR3423051, SRR3423050, SRR3423049) utilizando el NCBI SRA Toolkit versión 2.8.2 (SRA Toolkit Development Team, 2018). Adicionalmente, la calidad de las lecturas se analizó con el programa FASTQC versión 0.11.7 (Bioinformatics, 2018). Luego, para cada archivo de secuenciación se realizó un recorte de calidad de las lecturas, y un ensamble *de novo* utilizando la configuración por *default* del programa CLC Genomics Workbench versión 11.0.1 (Qiagen, 2018).

6.3.1.2 Búsqueda de transcritos homólogos

Mediante el programa BLAST+ versión 2.6.0 (Altschup et al., 1990), se realizó una búsqueda de los *contigs* homólogos a los genes de interés, dentro de cada uno de los 3 transcriptomas ensamblados. Los genes seleccionados fueron el gen *UBC*, *PTB* y *HEL* (Accesión GenBank no. XM_019560392.1, XM_019573216.1 y XM_019579367.1) de *L. angustifolius* (Taylor, 2016), y las proteínas de los genes *LOX2*, *AOS*, y *EBOS* (Accesión

GenBank no. NP_566875.1, NP_199079.1 y AAN65379.1) de *A. thaliana*, y *PI2* (Accesión GenBank no. AAN05016.1) de *S. lycopersicum* (Zhang, 2004).

Utilizando estas secuencias molde, y las herramientas *blastn* y *blastx* para análisis de ADN y proteínas respectivamente, se encontraron las secuencias homólogas de *L. mutabilis* para cada gen. El nivel de homología de cada hit se estableció mediante los parámetros *E-value* y *Bitscore* arrojados por el análisis, siendo los mejores *contigs* de cada ensamble los que poseían el menor *E-value* y el mayor *Bitscore* (Anexo 11). Se descartaron *contigs* con tamaños <350bp e *E-values* >1e-20 (Taylor, 2016).

6.3.1.3 Diseño y validación de primers

Sobre la región homóloga de los *contigs* candidatos se diseñaron los primers utilizando el programa Primer3 (Untergasser et al., 2012). Los criterios de diseño fue una Temperatura de melting de 60°C, contenido GC 40-60%, tamaño de primer de 20-35bp y tamaño de amplicón de 100-150bp. Se dio preferencia a los pares de primers que arrojaban valores de ΔG más positivo tras el plegamiento de las secuencias con el programa mFold (Zuker, 2003). Finalmente, se corrió un Primer Blast (Ye et al., 2012) de los primers candidatos, y se calculó el T_m teórico en el programa OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, 2018).

Para el caso de los genes calibradores, se alinearon las secuencias de los primers de *L. angustifolius* reportados por Taylor (2016), con las secuencias homólogas respectivas en *L. mutabilis*. Cualquier *mismatch* en la secuencia se reemplazó con el respectivo nucleótido de la secuencia homóloga. Estos primers fueron comparados con primers adicionales diseñados sobre el fragmento homólogo, y se eligió el par con los mejores parámetros de diseño.

Se validaron los primers mediante un programa de PCR convencional a partir de cDNA de hoja o semilla de chocho andino. La reacción individual de 25 μ l comprendió de 1X Buffer PCR, 0.5 μ M de cada primer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U de Taq DNA Polimerasa y 1 μ l de cDNA. Se corrió la PCR en el termociclador TC020-24 MultiGene™

Mini (Labnet) con un programa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 55 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s, y 72°C por 1 min, con una extensión final de 72° por 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%.

6.3.2 Determinación del gen normalizador para estudios de expresión genética en *L. mutabilis*

6.3.2.1 Exposición a los elicitores de defensa

Para la prueba de la estabilidad de los genes normalizadores ante diferentes condiciones de variabilidad se realizó un diseño factorial incompleto, en donde se varió los niveles de un factor, mientras el resto de los niveles de los demás factores se mantuvo constante. Es así que se probó el efecto de la variedad de la semilla (I-451, I-450 y Criolla), el estado fenológico de la planta (*early seedling* y *seedling*), el tipo de órgano (hojas y cotiledones), y la exposición a diferentes elicitores (MeJA, SA y Agua) durante diferentes tiempos post-tratamiento (0h y 24h), sobre la estabilidad de expresión de los genes normalizadores candidatos.

De esta manera, siguiendo el diseño experimental (Tabla 2), un total de 42 semillas germinadas de la variedad I-451, 6 de la variedad I-450 y 6 de la variedad Criolla se colocaron en recipientes con 60g de tierra esterilizada. Éstos se trasladaron a condiciones de invernadero con una temperatura promedio de 23°C, y un régimen luz-oscuridad de 12h. Las plantas se regaron con iguales volúmenes de agua destilada según era necesario, y se dejaron crecer por un periodo de 2 semanas hasta alcanzar el estadio *early seedling* (Falconi, 2015).

De las 42 plantas I-451, 18 fueron expuestas a la solución de agua, 12 a la de MeJA y 12 a la de SA, por la técnica de inmersión. Por otra parte, las 12 plantas de la variedad I-450 y Criolla se expusieron sólo a la solución de agua a través de la misma técnica (Tabla 2).

Tabla 2 Diseño experimental para los ensayos de normalización. Las “X” marcan los ensayos necesarios para realizar las comparaciones dentro de ese factor. La coincidencia de colores indica los niveles probados para ese factor. Para cada comparación, se varía los niveles de un factor, manteniendo constante los niveles del resto de factores.

No. plantas	Variedad	Elicitor	Tiempo post tratamiento (h)	Órgano	Estado fenológico	Comparaciones			
						Entre órganos	Entre Variedades	Entre tratamientos y tiempos	Entre estados fenológicos
6	I-451	Agua	0	Hoja	ES	X	X	X	X
	I-451	Agua	0	Cotiledón	ES	X			
6	I-451	Agua	24	Hoja	ES			X	
6	I-451	Agua	336	Hoja	S				X
6	I-451	MeJA	0	Hoja	ES			X	
6	I-451	MeJA	24	Hoja	ES			X	
6	I-451	SA	0	Hoja	ES			X	
6	I-451	SA	24	Hoja	ES			X	
6	I-450	Agua	0	Hoja	ES		X		
6	Criolla	Agua	0	Hoja	ES		X		
54	Total								

6.3.2.2 Muestreo de los tejidos para análisis de estabilidad de genes

Una vez aplicados los tratamientos, se muestrearon individualmente cada uno de los órganos (hoja o cotiledón), de cada tratamiento, al tiempo indicado en la Tabla 2. De las 6 muestras existentes por cada combinación del diseño experimental, se eligieron las 3 más uniformes a manera de réplicas biológicas. Cada muestra se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta la extracción de ARN.

6.3.2.3 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó acorde a Foley et al., 2015 utilizando el método de TRIzol estandarizado para chocho. Para ello, se molió la muestra con nitrógeno líquido, y 150mg del material se trasvasó a un tubo Eppendorf. Luego se agregó 1 ml de TRIzol (Invitrogen), 200 μl de cloroformo, y se homogenizó mediante vórtex por 1 min. Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 15 min, y se centrifugó a 12000g y 4°C por 10 min.

Se retiró el sobrenadante y se lo mezcló con 200 μl de cloroformo, seguido de otra centrifugación a 12000g y 4°C por 15 min. Nuevamente, se obtuvo el sobrenadante y se mezcló con 300 μl de un buffer de precipitación alto en sal (0.8 M citrato de sodio/1.2 M NaCl) y 300 μl de isopropanol. La muestra se dejó incubar por 30 min para la precipitación selectiva del

ARN, el cual fue recolectado luego por centrifugación a 12000g y 4°C por 10 min. Se realizó dos lavados del pellet con Etanol 75%, y se lo secó por 12 min colocando el tubo invertido. Finalmente, la muestra se resuspendió con 50 µl de Agua PCR, y la concentración del ARN se midió con el equipo Qubit 4 (Invitrogen) (Foley, 2015). La calidad, por otra parte, se evaluó de manera cualitativa mediante la corrida de las muestras en un gel de agarosa al 2% (Anexo 13).

6.3.2.4 Síntesis cDNA

6.3.2.4.1 Tratamiento DNAsa I

La digestión con DNAsa I se realizó con el kit Ambion™ DNase I (Invitrogen) acorde a las instrucciones del fabricante. El volumen final de reacción fue de 8.2 µl que contenía 1 µg de ARN, 1X DNase I Buffer, 0.82U DNase I y agua de PCR. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente, se agregó 0.8 µl de EDTA y se calentó a 65°C por 10 min en un termociclador.

6.3.2.4.2 Transcripción reversa

Se realizó la transcripción reversa del ARN acorde a las instrucciones del fabricante del kit Go Script™ Reverse Transcription System (Promega). Para ello, se tomó los 9 µl de ARN libre de DNA y se agregó 1 µl de Primer oligo(dT)₁₅, seguido de una incubación por 5 min a 70°C y en hielo por 5 min.

Luego se agregó 10 µl de un Master Mix que contenía 4 µl de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 2.6 µl de 25 mM MgCl₂, 1 µl PCR Nucleotide Mix, 0.5 µl de Recombinant RNAsin® Ribonuclease Inhibitor, 1 µl de GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), y 0.9 µl de agua PCR por reacción individual. Luego se incubó con un programa de termociclado de 25°C por 5 min, 42°C por 1h y 70°C por 15 min.

6.3.2.5 qRT-PCR

Para cada muestra se realizó una réplica técnica por gen. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Techne Real-time PCR System (PrimeQ) acompañado del programa Quansoft versión 1.1.30. El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, seguido de 50 ciclos de 95°C por 15s, 55°C por 30s y 72°C por 30s. Luego se condujo un análisis de las curvas de melting de 60 a 95 °C.

El mix de reacción individual contenía 1.5 µl de cDNA, 3pmol de cada primer, 7.5 µl de 1X SsoFast™ EvaGreen® Supermix, y agua de PCR para un volumen final de 15 µl.

6.3.2.6 Análisis de resultados

Con el programa LinRegPCR versión 2014.x (Ruijter et al., 2014) se obtuvo los valores de Ct corregidos por ajuste de una regresión lineal de los resultados de fluorescencia crudos, sin corrección de la línea base. A partir de los mismos se calculó el gen de normalización más estable siguiendo los algoritmos de geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen, 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) y Delta Ct (Silver et al., 2006), del programa RefFinder («RefFinder», 2018).

Adicionalmente, se midió la significancia estadística de cada factor sobre la estabilidad de expresión de los genes candidatos, utilizando una prueba de ANOVA (α 0.05) en el programa Minitab® 18 (Minitab, 2017).

6.3.3 Estudio de expresión de genes de defensa asociados a la vía del Ácido Jasmónico

6.3.3.1 Exposición a los elicitores de defensa

Por cada intervalo de tiempo post-tratamiento estudiado, se tomaron grupos de 5 semillas germinadas a manera de 1 réplica biológica, y se las expuso al tratamiento de MeJA y Agua por inmersión. Luego las semillas se colocaron en cámara húmeda a condiciones ambientales, en una caja Petri con algodón y 10 ml de agua destilada hasta su muestreo.

6.3.3.2 Muestreo para el análisis de expresión

Los grupos de 5 semillas germinadas se muestrearon acorde a los intervalos de tiempo en estudio para cada gen. Para el gen *LOX2* y *AOS* se muestreó a las 0h, 1h, 5h y 12h post-tratamiento y para el gen *PI2* y *EBOS* se muestreó a las 0h, 5h, 24h, y 96h, agregando la hora 3 para el gen *EBOS*. Cada muestra se congeló con nitrógeno líquido y almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Se extrajo ARN total de los ejes embrionarios, y se sintetizó cDNA tal como en las secciones anteriores. El qRT-PCR fue realizado bajo las mismas condiciones, pero en este caso con dos réplicas técnicas por cada gen.

6.3.3.6 Análisis de resultados

Con el programa LinRegPCR versión 2014.x (Ruijter, 2014) se obtuvo los valores de Ct corregidos. El análisis de la expresión genética relativa se realizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001), utilizando el gen *UBC* como gen normalizador, y las muestras a las 0h post-tratamiento como control interno. Las diferencias estadísticas entre medias respecto al control se determinaron con una prueba t-student (α 0.05).

RESULTADOS

7.1 Determinación de alcaloides totales en ejes embrionarios de semillas de chocho

A partir de extracto de alcaloides totales de chocho andino variedad I-450, se realizó la curva de calibración de la Figura 3 para la extrapolación de datos de Absorbancia a concentración de alcaloides en solución, medidos por el método espectrofotométrico con Azul de Bromotimol (Barlóg, 2002). Se observa un rango de linealidad entre los 0 y 15 μg Alcaloides/ml solvente, permitiendo la cuantificación de alcaloides dentro de un rango de absorbancia a 595 nm de 0 y 0.225.

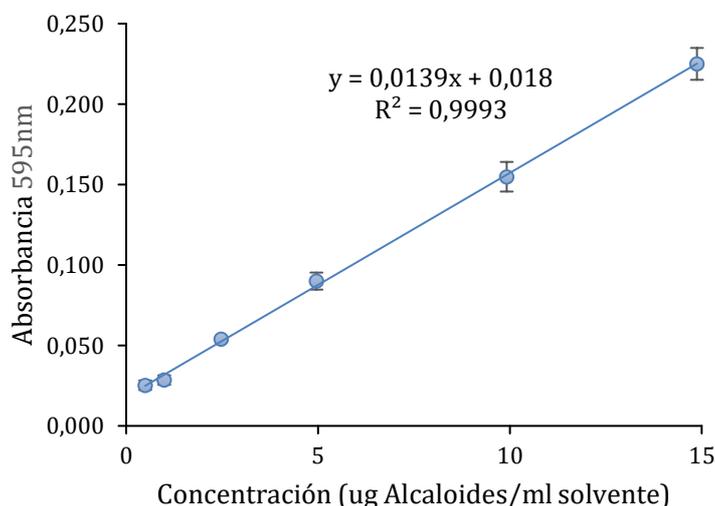


Figura 3 Curva de calibración de alcaloides totales en suspensión vs Absorbancia a 595 nm.

El grano de chocho de la variedad I-450 contiene aproximadamente un 3.92% de alcaloides (Caicedo V. et al., 2010), lo cual se traduce en que se extraerían 392 μg Alcaloides/ml solvente por cada 20 mg de material inicial. Este valor basal de referencia se encuentra fuera del rango de concentración en el que la curva de calibración es lineal, por ello, para la determinación de alcaloides en los ensayos se estimó conveniente la dilución de 100 veces del extracto de alcaloides concentrado, previo a la cuantificación.

Mediante la extrapolación a concentración de los datos de absorbancia con la curva de calibración, se obtuvieron los resultados de la Figura 4, en donde se observa el contenido de alcaloides en g/kg masa seca de eje embrionario tras el tratamiento con los elicitores MeJA y el control de Agua destilada.

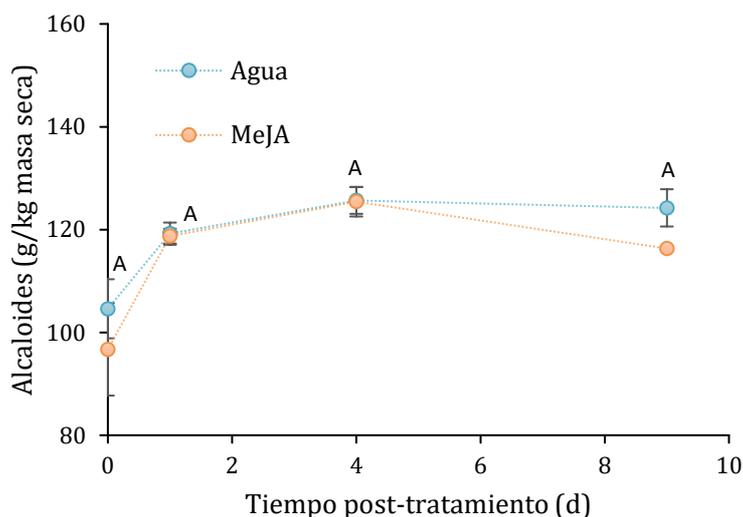


Figura 4 Contenido de alcaloides en ejes embrionarios de chocho andino tras la aplicación de MeJA (100 μ M) y Agua. Letras que se comparten indica que no existen diferencias significativas.

En el gráfico se puede observar que dentro del período de medición hasta los 9 días, no existen diferencias significativas entre los tratamientos con el elicitor y el control, de manera que la aplicación de MeJA, no cambia el nivel de alcaloides encontrado en la semilla durante su germinación. En cuanto al factor “Tiempo post-tratamiento”, los análisis estadísticos sí arrojaron diferencias significativas entre el día 0 y los días 1, 4, y 9 post-tratamiento.

7.2 Estudio de expresión genética mediante qRT-PCR

7.2.1 Preparación del transcriptoma

7.2.1.1 Calidad de las lecturas

Según el programa FASTQC, se obtuvo el siguiente reporte de estadísticas básicas para las lecturas de las librerías de RNA de *L. mutabilis* (Tabla 3). La tabla reporta que las

lecturas son de buena calidad por lo que se utilizaron todas para el ensamble del transcriptoma.

Tabla 3 Estadísticas básicas de los archivos de secuenciamiento de RNA

Parámetro	Librería		
	SRR3423049	SRR3423050	SRR3423051
Secuenciamiento	Illumina 1.9	Illumina 1.9	Illumina 1.9
Total de secuencias	27118555	22412296	25188767
Secuencias de mala calidad	0	0	0
Tamaño de las secuencias	250	250	250
%GC	42	42	43

Adicionalmente con el programa FASTQC, se midieron los parámetros de calidad de la Tabla 4, donde se observa que para cada librería no se cumplen los criterios para: el contenido por base en la secuencia, y existe un indicador de advertencia en los niveles duplicación de secuencias y contenido de adaptadores de secuenciamiento (Anexo 2, Anexo 3, Anexo 4). Esto indica respectivamente que la diferencia entre A y T, o G y C es mayor al 20% en cualquier posición de la secuencia, que las secuencias no únicas hacen más del 20% del total de las lecturas, y que el contenido de secuencias de adaptadores, como el Adaptador Universal Illumina (Anexo 2, Anexo 3, Anexo 4) contribuye con al menos el 5% de las lecturas (Bioinformatics, 2018).

Tabla 4 Parámetros de calidad FASTQC

Parámetro	Librería		
	SRR3423049	SRR3423050	SRR3423051
Calidad de la secuencia por base	PSAA	PSAA	PSAA
Puntaje de calidad por secuencia	PSAA	PSAA	PSAA
Contenido por base en la secuencia	FALLA	FALLA	FALLA
Contenido GC por secuencia	PSAA	PSAA	PSAA
Contenido N por base	PSAA	PSAA	PSAA
Distribución del tamaño de las secuencias	PSAA	PSAA	PSAA
Niveles de duplicación de secuencias	ADVERTENCIA	ADVERTENCIA	ADVERTENCIA
Secuencias sobrerrepresentadas	PSAA	PSAA	PSAA
Contenido de adaptadores	ADVERTENCIA	ADVERTENCIA	ADVERTENCIA

7.2.1.2 Recorte de lecturas

A partir de esta información, se decidió hacer un recorte de las lecturas en el programa CLC Genomics Workbench para eliminar las secuencias de los adaptadores y la sobre representación de bases específicas al inicio de las mismas que ocurre por el uso de random hexámeros para las librerías de RNA-Seq (Bioinformatics, 2018). Por otra parte, no se modificaron los niveles de duplicación de secuencias ya que éstos son eventos comunes en librerías de RNA-Seq, debido al sobre secuenciamiento que comúnmente se realiza para la detección de transcritos poco expresados (Bioinformatics, 2018). El resumen de estadísticas del proceso de recorte se encuentra en la

Tabla 5, y la distribución de tamaños de las lecturas tras el recorte en el Anexo 5, Anexo 6 y Anexo 7.

Tabla 5 Resumen de recorte de lecturas. Parámetros: remoción automática de secuencias de adaptadores, remoción de secuencias de baja calidad (límite=0.05), remoción de nucleótidos ambiguos (máximo 2 nucleótidos permitidos)

Librería	Antes del recorte		Después del recorte				
	No. lecturas	Tamaño promedio (bp)	No. lecturas	Descartadas por calidad	Descartadas por ambigüedad	Tamaño promedio (bp)	Nucleótidos recortados
SRR3423049	27118555	250.0	27117821	156	578	248.7	36304354
SRR3423050	22412296	250.0	22411626	195	475	248.6	32237601
SRR3423051	25188767	250.0	25188113	103	551	248.6	35635512

7.2.1.3 Ensamble del transcriptoma

En cuanto al ensamble del transcriptoma en el programa CLC Genomics Workbench se obtuvo el siguiente reporte (Tabla 6), que indica el número de *contigs* generados por ensamble, y los tamaños promedios, mínimos y máximos. La distribución de los *contigs* según el tamaño se encuentran en el Anexo 8, Anexo 9 y Anexo 10.

Se observa en la tabla que el ensamble SRR3223049 es el que contiene más información del genoma de *L. mutabilis* con un total de 113623 *contigs* generados. Los tamaños promedios de los transcritos bordean los 636 a 649 bp, sobre los cuales se diseñaron los primers a continuación.

Tabla 6 Reporte de estadísticas de los ensamblajes generados

Parámetros <i>contigs</i>	Assembly		
	SRR3223049	SRR3223050	SRR3223051
Tamaño mínimo	200	200	200
Tamaño máximo	9397	8332	10018
Tamaño promedio	636	636	649
Conteo	113623	104210	96531

7.2.2 Diseño de primers

Según los parámetros de diseño, se obtuvieron los siguientes primers candidatos (Tabla 7), basados en las secuencias homólogas del Anexo 12. Éstas fueron identificadas dentro de los *contigs* generados de los 3 ensamblajes, utilizando las herramientas blastx y blastn y los parámetros *E-value*, Bitscore y % Identidad (Anexo 11).

Para los genes *PTB* y *HEL*, sí se encontraron las secuencias homólogas de los primers heterólogos de *L. angustifolius* dentro de la información contenida en los *contigs* ensamblados. Los primers homólogos concordaron en secuencia, a excepción del Forward del gen *PTB* donde se observó un SNP hacia el extremo 5', marcado en amarillo (Tabla 7). No obstante, dado que los primers no cumplían con buenos parámetros de diseño (Diferencias entre T_m y ΔG negativos), se diseñaron primers con mejores características sobre las secuencias homólogas predichas. El diseño de *novo* a partir de secuencias predichas se realizó de la misma manera para los genes *UBC*, *AOS*, *LOX2*, *EBOS* y *PI2*.

Tabla 7 Primers diseñados y sus parámetros. Se realizó el diseño de cada primer en base a las secuencias predichas. Para el gen *PTB* y *HEL* se encontraron primers homólogos para los reportados en (Taylor, 2016). En Amarillo se resalta un SNP encontrado en *L. mutabilis* respect al primer reportado para *L. angustifolius*. (Fw= Forward, Rv= Reverse, Tm= Temperatura de melting, %GC= contenido de GC)

Gen	Tipo	Primer	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	%GC	Tamaño (bp)	ΔG (kcal/mol)	Producto (bp)
<i>UBC</i>	Diseñado	Fw	CATAATATCCACTATGCAGGCTTCT	59.93	40.00	25	0.42	100
		Rv	ACAGACAAGAGTAATATCGGGATCA	60.26	40.00	25	0.01	
<i>PTB</i>	Diseñado	Fw	GGTTTCATACTATGCTTCATCTTCG	60.37	40.00	25	0.26	113
		Rv	GGATATCTCCAGGGCTTTTATTGTT	61.88	40.00	25	-0.76	
	Homólogo paper	Fw	TGGAAGCTGGAGATGTAGCATT	62.21	47.83	23	-1.02	113
		Rv	CTGAATCAGAGCCTGGAAACCT	60.03	50.00	22	-0.25	
<i>HEL</i>	Diseñado	Fw	CAACTGTTTCCTGATATCCAGTTC	60.27	40.00	25	-1.73	125
		Rv	CCAGACCTATGATCTTTCTCACTGT	60.07	44.00	25	0.30	
	Homólogo paper	Fw	TTGTACGAGGTCGGTGCTCT	60.89	55.00	20	-1.07	127
		Rv	ACAAGCAACCAAATATTGCACCATA	60.05	36.00	25	-1.07	
<i>LOX2</i>	Diseñado	Fw	AACCATAGAGACCTGCTTTAGTCCT	60.09	44.00	25	-0.13	116
		Rv	CTCTATTGATAAGGTCAGCAGGAAG	59.83	44.00	25	-0.01	
<i>AOS</i>	Diseñado	Fw	TTACAGAATCCTCTCATACCTCGAC	60.04	44.00	25	0.06	121
		Rv	GTAGGTTGAATGAAACTCTGGAATG	60.27	40.00	25	-0.61	
<i>EBOS</i>	Diseñado	Fw	CAACTTGAGCTCATTGATGTTCTTC	61.48	40.00	25	0.33	118
		Rv	AAGTCTTGTCCCTTTTGGTGTATC	60.95	40.00	25	-0.61	
<i>PI2</i>	Diseñado	Fw	CATCTACAGCTGATGAACACCTC	58.88	47.83	23	-1.15	106
		Rv	CAAGAAGCAGTGCAAATAGTAGTTC	58.77	40.00	25	-0.14	

7.2.2.1 Validación de primers

Mediante una PCR convencional con los primers diseñados, se obtuvo el siguiente gel de agarosa al 2% (Figura 5). En éste se observa la amplificación satisfactoria de una sola banda en el tamaño esperado, indicando especificidad de los primers por las secuencias de los genes, y la amplificación de un producto único.

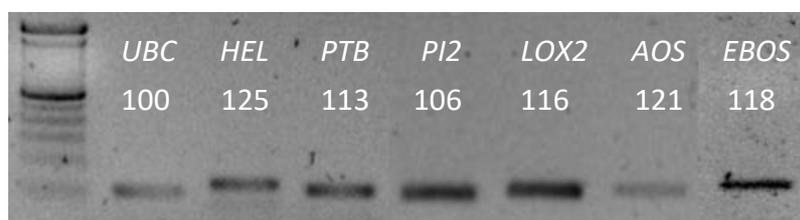
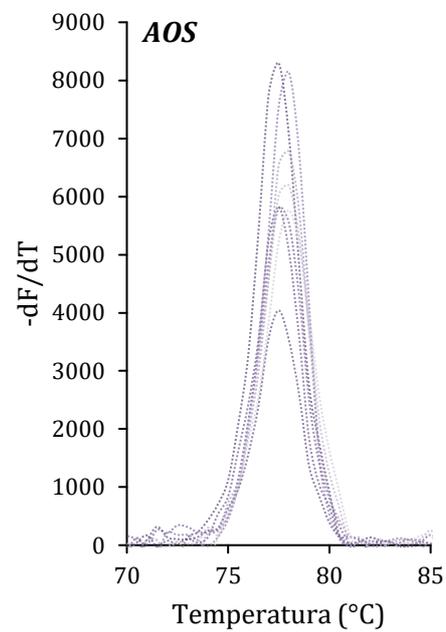
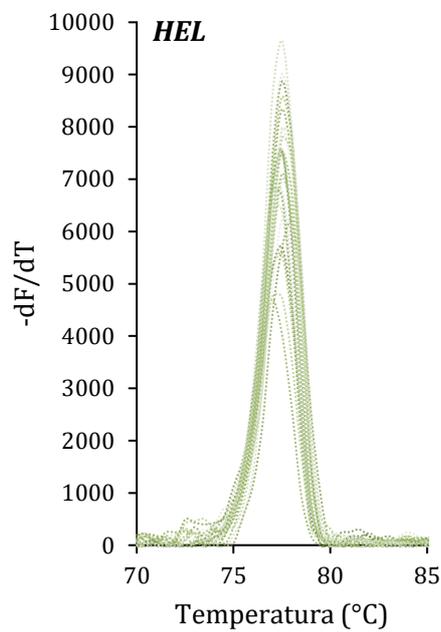
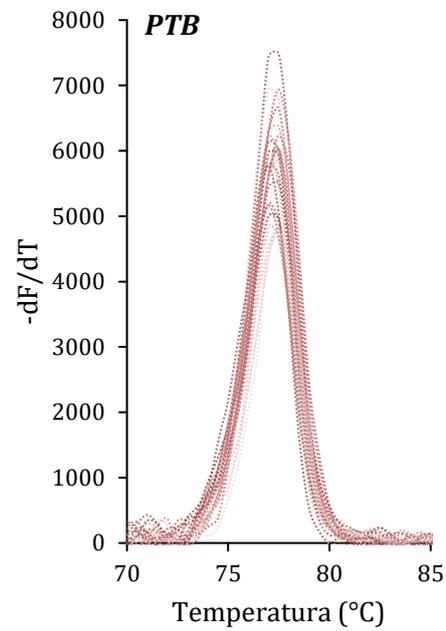
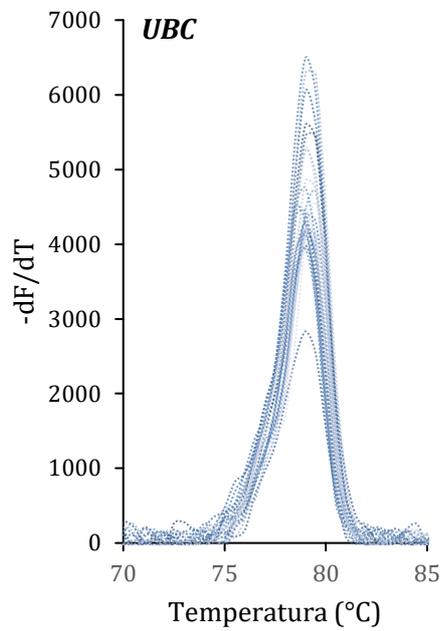


Figura 5 Amplicones generados por PCR convencional de los genes en estudio. Para los genes *UBC*, *HEL*, *PTB*, y *PI2* se usó cDNA de semilla germinada, y para los genes *LOX2*, *AOS* y *EBOS* se usó cDNA de hoja elicitada con MeJA. La corrida de los productos se realizó con en un gel de agarosa al 2% con un marcador de peso molecular de 100 bp. Se indica el nombre del gen y su tamaño esperado.

La especificidad de los primers también se corroboró mediante el análisis de las curvas de melting por qPCR. En la Figura 6 se observa un pico específico a la temperatura de fusión

(T_m) de cada amplicón, indicando la amplificación de un solo tipo de producto de PCR con la misma secuencia y por ende el mismo contenido de nucleótidos, el cual determina la T_m .



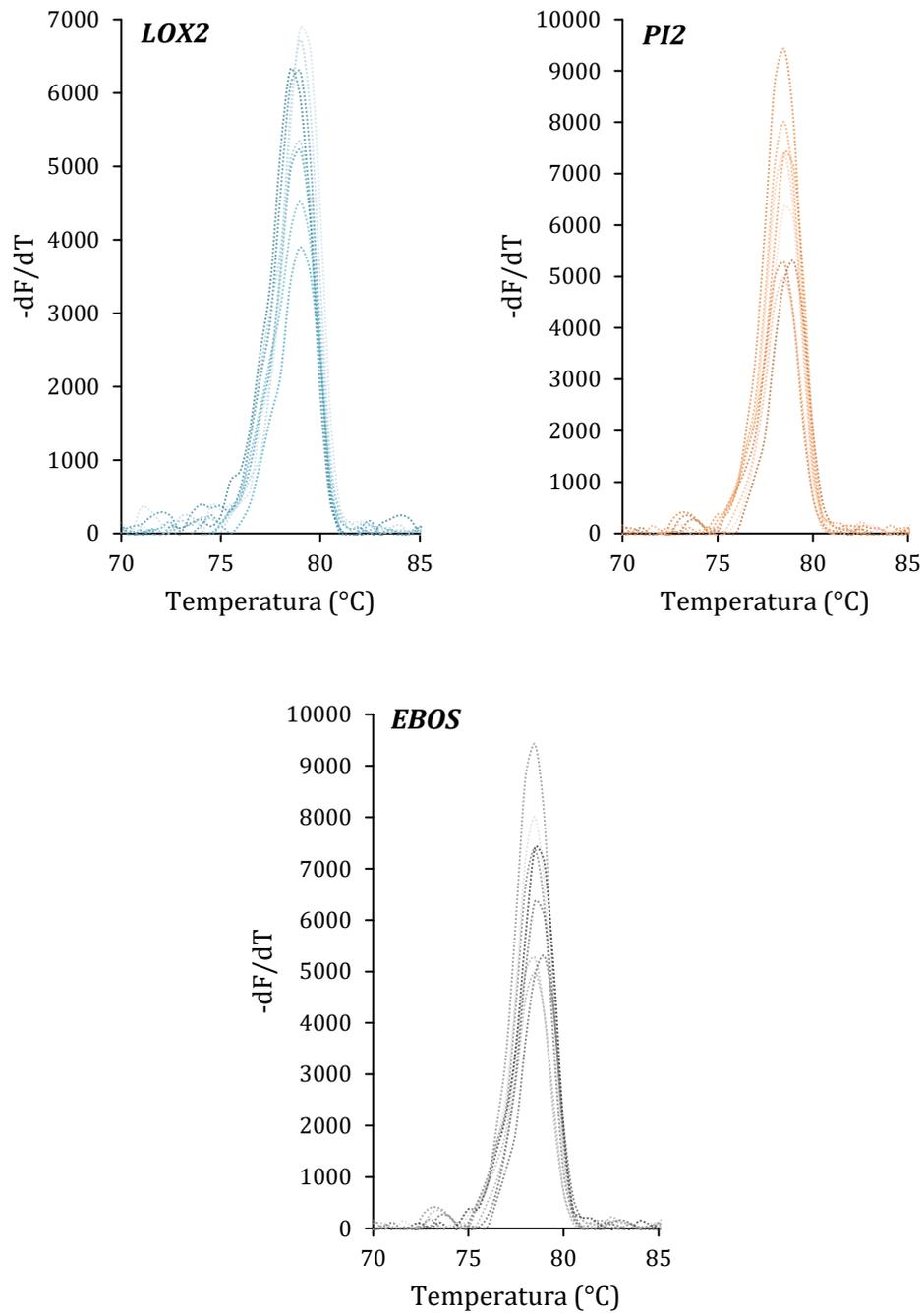


Figura 6 Análisis de curvas de melting de los genes en estudio. La presencia de un pico en una misma temperatura indica especificidad.

7.2.3 Determinación del gen normalizador para estudios de expresión genética en *L. mutabilis*

Siguiendo la evaluación preliminar de los primers, se realizaron los análisis de estabilidad genética de los genes normalizadores candidatos frente a diferentes factores de variabilidad. Se estudió el efecto de los factores Órgano (Hoja, Cotiledón), Variedad (I-450, I-451, Criolla), Tratamiento con elicitador (Agua, SA, MeJA), Tiempo post-tratamiento (0h, 24h), y Estado fenológico (*Early seedling*, *seedling*), siendo el gen de mayor expresión el gen *PTB*, seguido del gen *UBC*, y *HEL*, con un Ct promedio de 26.82, 27.34 y 28.81 respectivamente, con una variabilidad de 2.35, 1.72 y 2.45 ciclos. La eficiencia de los primers se encontró entre 1.73 y 1.88 con un R^2 entre 0.96 y 0.98 para el ajuste de la regresión lineal. Estos datos se representan en la Tabla 8, que fueron obtenidos de los datos crudos del Anexo 14.

Tabla 8 Valores de Ct promedio para los genes candidatos

Gen	Ct	Tm (°C)	Tm teórico (°C)	Eficiencia PCR	R ²
<i>UBC</i>	27,34 ± 1,72	79,09 ± 0,18	78,9	1,74 ± 0,28	0,96 ± 0,04
<i>PTB</i>	26,82 ± 2,35	77,27 ± 0,17	80,1	1,88 ± 0,19	0,98 ± 0,03
<i>HEL</i>	28,81 ± 2,45	77,47 ± 0,20	79,3	1,73 ± 0,19	0,96 ± 0,05

De entre los factores estudiados, el factor Estado Fenológico es el que causó mayor variabilidad en el nivel de expresión relativa de los tres genes candidatos, ya que se observa una mayor desviación estándar en los Ct promedio obtenidos por qPCR. No obstante, las diferencias de Ct observadas entre cada factor no son estadísticamente diferentes entre sí, a excepción del gen *PTB*, en donde los Ct obtenidos para el factor Órgano y Variedad, son diferentes de los obtenidos con el factor Elicitador (0h y 24h) y el factor Estado Fenológico, con un valor P de 0.009 (Tabla 9). Esto indica que el estado fenológico de la planta, así como el aplicar o no un tratamiento con un elicitador, sí afecta significativamente la estabilidad de expresión del gen *PTB*. Los ensayos individuales para la evaluación de cada factor se encuentran en el Anexo 15, 16, 17.

Tabla 9 Valores de Ct promedio para cada factor de cada gen candidato. Factores que comparten letras indica que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos

Gen	Factor	Ct promedio	Valor p	Agrupación
<i>UBC</i>	Órgano	27,09 ± 1,95	0,725	A
	Variedad	27,84 ± 2,05		A
	Elicitor (0h)	27,01 ± 1,46		A
	Elicitor (24h)	26,56 ± 0,78		A
	Estado Fenológico	27,25 ± 2,29		A
<i>PTB</i>	Órgano	26,35 ± 1,26	0,009*	A B
	Variedad	27,89 ± 2,03		A B
	Elicitor (0h)	25,62 ± 1,41		B
	Elicitor (24h)	26,30 ± 1,65		B
	Estado Fenológico	29,66 ± 2,46		A
<i>HEL</i>	Órgano	28,03 ± 2,22	0,749	A
	Variedad	28,63 ± 2,62		A
	Elicitor (0h)	27,83 ± 0,65		A
	Elicitor (24h)	29,26 ± 2,82		A
	Estado Fenológico	29,36 ± 3,13		A

Usando los algoritmos BestKeeper, Normfinder, Genorm y Delta Ct, los tres genes normalizadores candidatos se puntuaron acorde a un índice de estabilidad calculado. La clasificación se realizó para cada factor en estudio, llegando a un consenso final en donde el gen de mayor estabilidad para la normalización de estudios de expresión génica en *L. mutabilis* es el gen *UBC* seguido del gen *PTB* y *HEL*. Esto se puede observar en la Figura 7 que muestra los valores de estabilidad calculados mediante los 4 algoritmos, utilizando todos los datos. En ésta se observa hacia la izquierda los genes de mayor estabilidad y hacia la derecha los menos estables. Se observa un consenso entre todos los métodos de cálculo, en donde se puntúa al gen *UBC* como el de expresión más estable entre todos los factores.

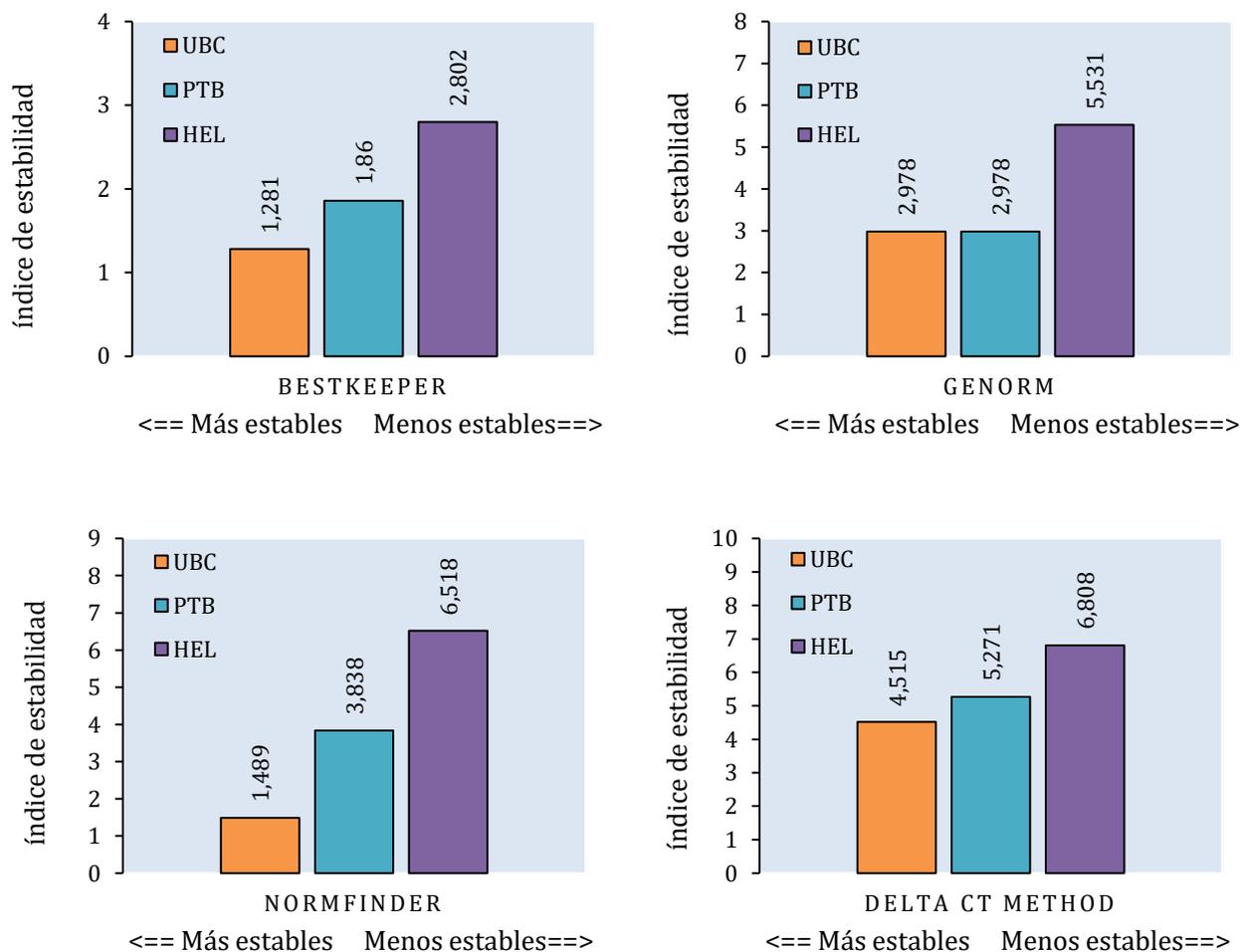


Figura 7 Índices de estabilidad en orden descendente para los genes *UBC*, *PTB* y *HEL*. Se evaluó la estabilidad mediante los algoritmos BestKeeper, Genorm, NormFinder y Delta Ct. Mientras menor el índice, más estable el gen.

En la

Tabla 10 se muestra el desglose de índices de estabilidad calculados para cada gen, con los 4 algoritmos y para cada factor. Se observa que de entre todos los factores probados, el gen *UBC* fue encontrado con más recurrencia como el gen de mayor estabilidad, obteniendo el mejor índice de estabilidad en 3 de los 5 factores, lo cuales fueron el factor Órgano, Tratamiento con elicitador (24h post-tratamiento) y Estado fenológico. El gen *PTB* y *HEL* fueron puntuados como los genes de mayor estabilidad cuando se probó el factor Variedad, y Tratamiento con elicitador (0h post-tratamiento) respectivamente.

Tabla 10 Valores de estabilidad de expresión y ranking general de los genes normalizadores candidatos

Factor	Algoritmo	Índice estabilidad			Ranking			Recomendado		
		<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	1er	2do	3ro	1er	2do	3ro
Todos los datos	Delta Ct	4,515	5,271	6,808	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>			
	Bestkeeper	1,281	1,86	2,802	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>
	Normfinder	1,489	3,838	6,518	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>			
	Genorm	2,978	2,978	5,531	<i>UBC PTB</i>	-	<i>HEL</i>			
Órgano	Delta Ct	2,242	3,017	2,258	<i>UBC</i>	<i>HEL</i>	<i>PTB</i>			
	Bestkeeper	1,360	1,040	1,520	<i>PTB</i>	<i>UBC</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>HEL</i>	<i>PTB</i>
	Normfinder	1,000	2,828	1,095	<i>UBC</i>	<i>HEL</i>	<i>PTB</i>			
	Genorm	1,483	2,505	1,483	<i>UBC HEL</i>	-	<i>PTB</i>			
Variedad	Delta Ct	3,754	3,348	3,665	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>			
	Bestkeeper	1,551	1,469	1,714	<i>PTB</i>	<i>UBC</i>	<i>HEL</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>
	Normfinder	2,980	1,711	2,773	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>			
	Genorm	3,589	3,259	3,259	<i>PTB HEL</i>	-	<i>UBC</i>			
Elicitor (0h)	Delta Ct	1,845	2,012	1,632	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>			
	Bestkeeper	0,939	1,061	0,653	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>
	Normfinder	1,384	1,739	0,463	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>			
	Genorm	1,464	1,83	1,464	<i>UBC HEL</i>	-	<i>PTB</i>			
Elicitor (24h)	Delta Ct	2,222	2,431	3,256	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>			
	Bestkeeper	0,735	1,102	2,531	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>
	Normfinder	0,699	1,528	3,109	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>			
	Genorm	1,397	1,397	2,636	<i>UBC PTB</i>	-	<i>HEL</i>			
Estado Fenológico	Delta Ct	8,193	9,652	14,735	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>			
	Bestkeeper	1,75	2,25	10,75	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>
	Normfinder	1,555	6,916	14,643	<i>UBC</i>	<i>PTB</i>	<i>HEL</i>			
	Genorm	3,109	3,109	10,86	<i>UBC PTB</i>	-	<i>HEL</i>			

7.2.4 Estudio de expresión de genes de defensa asociados a la vía del Ácido Jasmónico

Una vez identificado al gen *UBC* como el gen normalizador para estudios de expresión en *L. mutabilis*, se procedió a realizar los ensayos de qPCR para los genes de respuesta de la vía del Ácido Jasmónico. Se realizó el estudio de expresión de dos genes de síntesis de la hormona (*LOX2* y *AOS*) y dos genes de mecanismos de defensa (*EBOS* y *PI2*). Se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001) para la cuantificación de la expresión relativa, y se tomó la expresión a las 0h post-tratamiento como control de los genes target.

De esta manera, dentro del intervalo de estudio de expresión dentro de las 12h primeras horas post-tratamiento con MeJA se obtuvieron los siguientes resultados de expresión relativa para los genes estudiados. En la Figura 8 se observan gráficos los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ calculados a partir de los datos de Ct individuales. Comenzando por los genes de síntesis, se observa que hay inducción del gen *LOX2* a la hora 1 y hora 3 post-tratamiento evaluadas. No obstante, sí se observa la inducción de la expresión del gen *AOS*, con un pico de expresión desde a la hora 5, con una subsecuente subexpresión del gen para la hora 12 post-tratamiento. Esto concuerda con el orden de eventos dentro de la ruta metabólica de síntesis de JA en todas las plantas, que comienza con la oxigenación del Ácido Linoleico a través de una Lipooxigenasa que probablemente se encuentre prendida antes de la hora 1, y una posterior oxidación de la estructura en presencia de la Aleno Óxido Sintasa (Turner, 2002) en las siguientes horas. Las diferencias de expresión entre los tratamientos con MeJA a diferentes tiempos post-tratamiento son estadísticamente diferentes para el gen *LOX2* y *AOS*. De igual manera no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los tratamientos control con agua.

En cuanto a los genes de respuesta de la vía del JA, se puede observar que para el gen *EBOS* existe una inducción de su expresión para la hora 3, y una reducción de ésta para la hora 5. Mientras en el gen *PI2*, se ve un alza en la expresión desde la hora 5 en adelante, manteniéndose hasta las 12h. No hubo diferencias en la expresión de estos genes con el tratamiento de Agua desde la hora 0 hasta la hora 96.

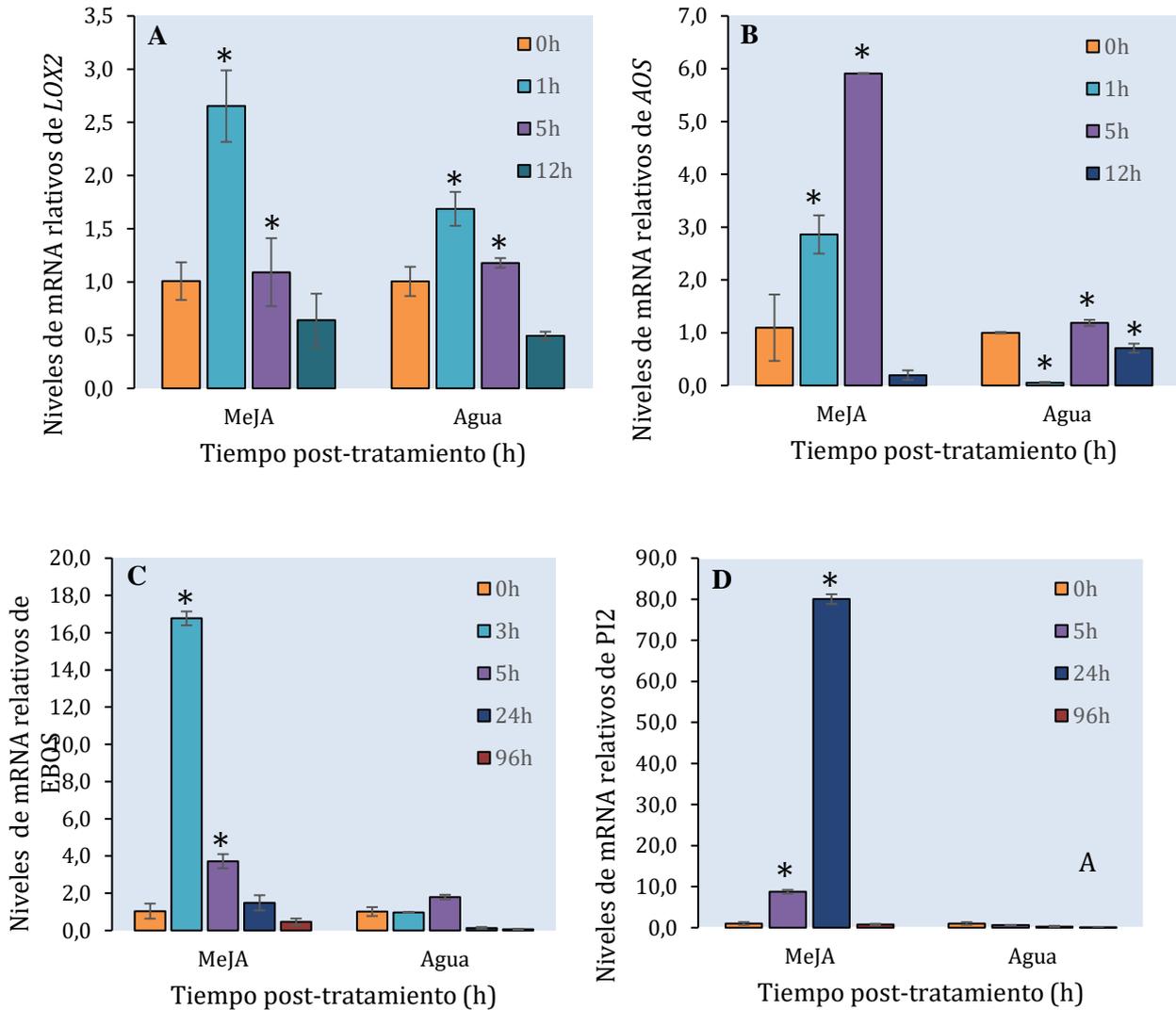


Figura 8 Expresión relativa de los genes A) *LOX2*, B) *AOS*, C) *EBOS* y D) *PI2* tras el tratamiento con MeJA (100 μ M) en semilla germinada de chocho. Significancia estadística respecto al control a la hora 0 está representada con un asterisco.

DISCUSIÓN

8.1 Determinación de alcaloides totales en ejes embrionarios de semillas de chocho

Los alcaloides son compuestos químicos que sirven para la defensa de las plantas contra herbívoros. En el chocho, la presencia de estos metabolitos es un rasgo constitutivo, no obstante, se ha demostrado en diversos estudios que éstos pueden también ser inducidos por el ambiente y daños mecánicos o heridas que simulan un evento de herbivoría (Wink, 1983). Asimismo, la literatura reporta que la aplicación exógena jasmonatos es un conocido activador de la biosíntesis de alcaloides en plantas, tales como *Nicotiana*, *Catharanthus roseus* (Abouzeid et al., 2017; Aerts et al., 1994), *Camellia japonica* (Frick, 2017), *Vinca minor* (Abouzeid, 2017) y *Cinchona ledgeriana* (Aerts, 1994). En estos casos, el tratamiento con JA, provoca la acumulación de precursores, aumento de las actividades enzimáticas (Aerts, 1994) y activación de genes biosintéticos y factores de transcripción tales como el *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH), *APELATA 2/Ethylene-Responsive Factor* (AP2/ERF) y WRKY, que regulan la ruta de síntesis de alcaloides mediante el reconocimiento de motivos GCC y elementos *G-box* en los promotores de los genes biosintéticos (Frick, 2017).

A partir de esta información, se puede inferir que la síntesis de QA en *Lupinus* puede estar regulada por la vía del Ácido Jasmónico de maneras similares a las que ocurren en otras plantas (Frick, 2017). Y es por ello, que en este estudio se propuso determinar si la aplicación de MeJA en semilla de chocho germinado, es capaz de elicitar la biosíntesis de estos metabolitos con un subsecuente aumento del nivel de alcaloides totales en los ejes embrionarios.

Los resultados demuestran que el nivel de alcaloides encontrado en ejes embrionarios de semillas tratadas con MeJA y Agua no son estadísticamente diferentes entre sí, dentro de los primeros 9 días post-tratamiento (Figura 4). Se esperaba que el MeJA sí prenda la biosíntesis de alcaloides en la semilla, no obstante, no se observaron diferencias significativas

respecto al control. Esto indicaría que la efectividad del MeJA como estrategia de protección contra el ataque de *D. platura*, no recae sobre su capacidad de elicitar mecanismos de metabolismo secundario, sino otro tipo de estrategias de defensa.

Los resultados observados se podrían explicar primeramente por la ubicación de la maquinaria de biosíntesis de alcaloides en las plantas. El chocho en este caso concentra la biosíntesis de estos metabolitos en las partes áreas jóvenes y verdes de la planta, justamente porque las enzimas de la ruta metabólica se encuentran ubicadas en los cloroplastos, lugar donde también se da la formación del aminoácido lisina, que es el precursor de todos los QA (Wink, 1987) (Anexo 2). Esto también se corrobora, con estudios de expresión en *L. angustifolius* que demuestran que los transcritos de la enzima L/ODC (Lisina Ornitina Decarboxilasa) que cataliza el primer paso de la ruta de biosíntesis de QA (Anexo 2), es alto en las hojas jóvenes, y apenas detectable en las hojas maduras, cotiledones, hipocótilos y raíces (Frick, 2017), de manera que la semilla no tendría un rol importante como órgano productor de alcaloides.

Hasta el momento, no hay investigación sobre la biosíntesis de QA en semillas chocho (Frick, 2017), pero basado en esta evidencia, se concluye que ésta se da principalmente en los brotes jóvenes, seguido de una traslocación de los metabolitos a través del floema a toda la planta, en especial aquellos órganos importantes para la reproducción (Wink, 1987, 1988). De esta manera, se estima, que de los QA que se acumulan en la semilla, la mitad son sintetizados en este órgano, mientras el resto vienen de la traslocación desde otros tejidos (Frick, 2017). Es por ello que sí existe evidencia de la inducción de alcaloides en *L. polyphyllis*, *L. angustifolius* y *L. albus* mediante el daño mecánico, un tratamiento que puede ser simulado con la aplicación exógena de jasmonatos, no obstante los niveles de alcaloides aumentaron en los tejidos en estudio que fueron hojas (Wink, 1983) y tallos de los brotes superiores (Chludil, 2009), órganos donde justamente se ubica la maquinaria de biosíntesis.

A diferencia del chocho, en *Nicotiana*, *Cinchona*, y *Catharanthus* sí se observa cambios en el perfil de alcaloides en la semilla tras la aplicación de jasmonatos, sin embargo, esto funciona dado que la maquinaria de biosíntesis en estas plantas sí se ubica en estos órganos. Por ejemplo, los genes biosintéticos de nicotina en tabaco se activan en las raíces, desencadenando la síntesis de metabolitos en las mismas para luego translocarlos a las partes aéreas a través del xilema (Shoji, 2000).

Adicionalmente, dado que la maquinaria de biosíntesis está en los cloroplastos, la producción de alcaloides se rige bajo un ciclo luz-dependiente (Wink, 1987a, 1988). En este estudio, los ensayos se realizaron en oscuridad, recreando las condiciones aplicadas por Sotelo (2017), necesarias para el estadio larval de *D. platura*. De esta manera, la falta de acceso a la luz probablemente también impidió la estimulación de la ruta de biosíntesis.

Por último, los resultados observados también se podrían explicar por el hecho de que los compuestos nitrogenados como los QA, no son productos finales inertes del metabolismo, sino más bien son dinámicos, y experimentan un alto grado de transformación a través de estrategias optimizadas a lo largo de la evolución (Wink, 1987, 1985). Este fenómeno es especialmente evidente durante la germinación y desarrollo de brotes, cuando el nitrógeno constituye como un nutriente limitante, lo cual la planta lo solventa con la degradación de moléculas nitrogenadas como los alcaloides, y reutilización del nitrógeno liberado (Wink, 1987).

Es por ello que la síntesis de alcaloides *de novo* en la semilla de chocho sería poco factible al ser un proceso energéticamente costoso. La mayoría de los alcaloides en su lugar son metabolizados para su uso durante la germinación (Wink, 1987, 1985) reduciendo los niveles totales hasta un 80% en esta etapa (Wink, 1987), considerándose así como moléculas con roles menores de transporte y almacenamiento de nitrógeno (Wink, 1987a, 1985). La

síntesis continua *de novo* más bien se establece cuando el brote genera hojas, y termina con la floración y maduración del fruto (Wink, 1985), más no en la semilla germinada.

En este estudio, también se observó un ligero aumento significativo de los alcaloides desde el día 0 al día 1, 4 y 9 (Figura 4), probablemente porque en fases tempranas de la germinación, los alcaloides de los cotiledones se suelen translocar hacia las raíces y epicotilos en crecimiento (Wink, 1985).

8.2 Determinación del gen normalizador para estudios de expresión genética en *L. mutabilis*

Para poder concluir de manera robusta acerca de patrones de expresión determinados por qRT-PCR, es indispensable la normalización precisa de los datos crudos respecto a genes de referencia estables y confiables (Taylor, 2016). Hasta el momento, este estudio consiste en la primera validación de genes de referencia estables en *L. mutabilis* para la normalización de datos de qRT-PCR. Se examinaron 3 genes constitutivos candidatos, previamente reportados como los más estables para *L. angustifolius* (Taylor, 2016), la especie más cercana al chocho andino, de entre las especies domesticadas (Naganowska et al., 2003). Y mediante el uso de 4 algoritmos para el cálculo de la estabilidad, se puntuó al gen *UBC* como el mejor gen de referencia seguido del gen *PTB* y *HEL*.

Tanto en *L. mutabilis* como en *L. angustifolius*, se encontró que el gen *UBC* es el gen candidato más prometedor y estable para su uso en estudios de expresión como gen calibrador, lo cual probablemente se debe a que se tratan de especies emparentadas. No obstante, el segundo gen más estable para *L. mutabilis* fue el gen *PTB*, en contraste con el gen *HEL* para *L. angustifolius* lo cual recalca la importancia de evaluar los genes de referencia adecuados para cada especie, independiente de qué tan emparentadas se encuentren. Tomar esto en consideración es importante, porque a menudo en estudios de qPCR se utiliza más de un gen

normalizador para la calibración de los resultados (Taylor, 2016), y por ende no es óptimo asumir que los mejores genes candidatos de una especie son los mismos para otra.

Adicionalmente, si bien el ranking de los genes candidatos puede coincidir entre especies, los índices de estabilidad calculados por los 4 algoritmos pueden diferir. En este caso, los valores alcanzados para *L. mutabilis* para el gen *UBC* fueron mayores, a excepción del calculado por el método BestKeeper, lo cual recalca que la expresión de genes constitutivos no es consistente entre especies y debe ser evaluado de manera independiente.

En este estudio se analizó la influencia de diversos factores sobre la estabilidad de los genes candidatos. Y el haber demostrado que el gen *UBC* no se ve afectado de manera significativa por ninguno de los mismos, permite utilizar el mismo gen calibrador en futuros estudios de expresión de *L. mutabilis* que utilicen como material vegetal otras variedades y otros órganos de diferentes estados fenológicos, así como material vegetal expuesto a dos importantes elicitores, como lo son el MeJA y el SA, que prenden dos de las vías principales de defensa vegetal (Turner, 2002; War, 2012).

De entre los factores probados, el factor Estado Fenológico fue el que mayor variación causó sobre la expresión de los genes candidatos. Probablemente, las diferencias observadas resultan de que cada órgano tiene un transcriptoma único y dinámico cuya información cambia en el tiempo junto con la planta y su desarrollo, de manera que entre órganos y estados fenológicos se generan mayores diferencias en los patrones de expresión (Taylor, 2016). Por ende, para hacer del estudio uno más robusto, se recomienda la validación de los genes candidatos dentro de una mayor variedad de órganos y estados de desarrollo. Se recomienda especialmente incluir órganos que espacialmente en la planta se encuentren distantes. Esto con el motivo de que en la especie emparentada *L. angustifolius*, está reportado que el factor órgano sí afecta de manera significativa a los niveles de expresión de los genes estudiados, y que las mayores diferencias se encontraron entre los órganos más alejados entre sí (ej.: flores vs raíces;

vegetativo vs. reproductivo) (Taylor, 2016). Adicionalmente, en caso de considerarse otro factor experimental distinto al uso de un elicitor de defensa (ej.: tratamiento de vernalización (Taylor, 2016), se recomienda reevaluar la estabilidad de los genes candidatos tras el tratamiento de elección. En este caso, el gen *UBC* al no verse afectado por las condiciones experimentales (tratamiento con MeJA), se convierte en un excelente gen para la normalización de los resultados.

Esta es la primera investigación que evalúa genes candidatos de referencia para estudios de expresión específicos en *L. mutabilis*. El usar primers homólogos en lugar de heterólogos, ciertamente es un acercamiento más efectivo, ya que se desarrollan primers específicos, que logran amplificar la secuencia *target* sin mayores procesos de optimización. Adicionalmente, mediante el uso de archivos de RNSAeq, es posible encontrar nuevos genes de referencia alternativos más estables a los estudiados, sin tener conocimiento previo del genoma. Esto resultó especialmente ventajoso para el chocho andino, una especie que no cuenta con un genoma secuenciado ni caracterizado.

8.3 Estudio de expresión de genes de defensa asociados a la vía del Ácido Jasmónico

Con el fin de elucidar los mecanismos de defensa inducidos por el MeJA en semilla germinada de chocho, se cuantificó a nivel de ejes embrionarios la expresión de dos genes de respuesta de la vía del JA (*EBOS* y *PI2*), y 2 genes marcadores de la síntesis de la hormona (*LOX2* y *AOS*) con el fin de corroborar la activación de esta ruta de defensa y la posterior inducción de los genes de respuesta de interés.

Según los resultados, el primer gen de síntesis de JA, *LOX2*, aunque no presenta diferencias significativas respecto al control, sí evidencia un aumento en su expresión hacia la hora 1, la cual se reduce de manera progresiva hasta la hora 12. De esto se puede inferir que la expresión de este gen es inmediata y que probablemente el pico de expresión se encuentre en un intervalo menor al de 1 hora. (Figura 8A). La expresión de *LOX2* desencadenaría entonces

la activación de la ruta de síntesis del JA, y la correspondiente expresión de los genes *downstream* como lo es el gen *AOS*, el cual demostró tener un pico de expresión a la hora 5 y una subexpresión completa para la hora 12. (Figura 8B). La activación temprana de estos dos genes de síntesis marcadores sirven como control positivo para corroborar el estado activo de la ruta metabólica de síntesis del JA (Turner, 2002).

Según la literatura, esta acumulación de JA y por ende de los transcritos de los *JA-responsive genes*, está regulada por una retroalimentación positiva, en donde los mismos productos de la ruta metabólica amplifican la señal al aumentar progresivamente los niveles de JA (Turner, 2002; Wasternack, 2013). En la planta modelo *Arabidopsis* se ha demostrado que esto sucede gracias a que en presencia de un estímulo (herida/herbivoría/elicitador), se acumula JA y su forma activa JA-Ile, que promueve la interacción entre los represores JAZ y SCF^{COII}, un complejo ubiquitina ligasa, que por ubiquitinación termina por inducir la degradación de estos represores en el proteasoma. De esta manera, varios factores de transcripción de genes *target* así como MYC2 que se encontraban reprimidos por las proteínas JAZ y otros correpresores (ej.: TOPLESS (Hickman, 2017)), quedan liberados y activan la transcripción de los *JA-responsive genes* más tempranos, entre ellos los de síntesis (Chico, 2008) (Anexo 19).

Gracias a este *feedback* la expresión de *LOX2* y *AOS* es rápida. Por ejemplo, en estudios de cDNA *microarrays* en *Arabidopsis*, se reporta que un estímulo de daño mecánico es capaz de inducir un pico de expresión de *LOX2* y *AOS* a la hora 1 y una significativa acumulación de JA entre la hora 2 (Reymond et al., 2000) y 3 (Caarls et al., 2017). De igual manera sucede con plantas tratadas con MeJA, donde se reportan picos de expresión para los genes de síntesis de JA hacia la hora 1 (Hickman, 2017). Por lo tanto, los tiempos en donde se observan los picos de expresión de los genes de síntesis estudiados concuerdan con la literatura, y esto es explicado por la manera en que se regula esta ruta metabólica.

Así como existe una regulación positiva de la biosíntesis del JA, existe también una regulación negativa. Ésta viene dada en gran parte por los represores JAZ, en especial JAZ1 cuya síntesis *de novo* es inducida por la misma acción de MYC2, restaurando así su represión y un subsecuente apagado de la ruta metabólica (Vaca et al., 2010). Es por ello que los *JA-responsive genes*, se apagan también de manera temprana, y de manera progresiva dentro de un periodo aproximado de 10 horas en adelante (Reymond, 2000). Este fenómeno lo observamos también en los resultados (Figura 8), donde se demuestra la represión de todos los genes en estudio. Sin embargo, los datos no son congruentes en cuanto a que no se observa una represión progresiva como en *Arabidopsis*, sino que los genes se apagan drásticamente tras alcanzar el pico de expresión.

Una explicación a la represión temprana de los genes de AJ, podría estar asociada a la manera en que actúa la ISR en las plantas, ya que ésta se basa en la activación más fuerte y rápida de los mecanismos basales de defensa tras la exposición a patógenos, o ataques de herbívoros, o en este caso la aplicación del elicitor MeJA. De esta manera, la activación y represión temprana podría estar sucediendo en pro de la fabricación de los precursores de las estrategias de defensa (factores de transcripción, enzimas, etc.) para una reacción más rápida de la planta durante un futuro ataque o estímulo. Probablemente, la aplicación de MeJA pudo haber contribuido en la sensibilización de la planta para reaccionar de manera más rápida, un fenómeno que se conoce como *priming* y que puede ser inducido de manera biológica, o química con la aplicación de bajas dosis de elicitores. Esto es importante porque en plantas con este tipo de pre tratamiento se evidencia una mayor resistencia contra los ataques de herbívoros u otro tipo de estrés (Pozo, 2004).

Adicionalmente, se puede hipotetizar que la represión rápida de los genes de defensa podría estar asociado con el tipo de tejido vegetal con el que se trabajó. Primeramente, se debe establecer que las semillas durante su maduración almacenan conjugados de auxinas como el

Ácido Indol Acético (IAA), a manera de reserva para las plántulas jóvenes (Bialek et al., 1992). Es por ello que las auxinas son abundantes en las semillas en germinación ya que son necesarias para el crecimiento y la diferenciación de tejidos (Haiwei et al., 2016). Por ejemplo, en el fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), otra leguminosa, se sabe que la síntesis de IAA a partir de los conjugados es detectable tempranamente desde el segundo día de germinación, punto desde el cual la plántulas empiezan a ganar peso fresco y a acumular auxinas a una tasa constante (Bialek, 1992). Es por lo tanto, este estímulo de la gran cantidad de auxinas la que podría contribuir también a la rápida represión de los *JA-responsive genes*.

De manera más específica, los genes de respuesta de auxinas se regulan de forma similar a los del JA. En presencia de la hormona, los represores de la vía de auxinas Aux/IAA se marcan por complejos ubiquitina ligasas (SCF^{TIR1}) para degradarse en el proteasoma, liberando factores de transcripción como los ARFs para la inducción de los genes de respuesta (Chico, 2008) (Anexo 20). Recientemente, se publicó que estos ARFs además de prender genes de respuesta a auxinas, también son capaces de inducir la expresión del gen que codifica para el represor JAZ1, de manera independiente de la vía del JA (Grunewald et al., 2009). Esto indicaría que, en comparación con órganos vegetativos, la expresión de JAZ1 en semillas en germinación se da de manera más amplificada, tanto por la retroalimentación negativa de MYC2 en la vía del JA, y la inducción del gen por el estímulo alto de auxinas. De esta manera, se para de manera drástica la síntesis y acumulación de JA, y por ende la síntesis de proteínas asociadas a estrategias de defensa de esta hormona. Adicionalmente, el JA también se sabe que induce la formación de IAA por inducción directa de genes de síntesis de auxinas como YUCCA8 y YUCCA9 (Hentrich et al., 2014), lo cual a la larga desencadenaría la producción de más represores JAZ.

De esta forma, la semilla se enfocaría en acumular JA suficiente para prender los genes de defensa y acumular sus productos, para luego apagar estos mecanismos de manera rápida y

enfocarse en el crecimiento y germinación, ya que es un proceso metabólicamente costoso. Esto ya ha sido estudiado en *Arabidopsis* en la cual se determinó que las proteínas JAZ se activan para promover el crecimiento y éxito reproductivo al evitar una respuesta metabólica desenfrenada.

Esto explicaría por qué en los ensayos reportados por Sotelo (2017), aunque se observa una protección de la semilla tratada con MeJA, no hay una inhibición completa de la capacidad de *D. platura* para generar daño. El número de mordidas y galerías sigue aumentando, aunque en una menor tasa que las semillas no tratadas (Figura 2), ya que la señal de síntesis y acumulación de JA no se mantiene constante, sino que se apaga de manera temprana. No obstante, aunque corta, la expresión de esta vía es suficiente para acumular productos de interés en la semilla que le brindan de protección.

Uno de estos productos de interés son los inhibidores de serinas proteasas, conocidos también como inhibidores de proteinasas (PI). Éstos forman parte del metabolismo secundario de las plantas, y sus genes son de los principales inducidos tras daño mecánico y herbivoría (Zhang, 2004). Los PI-2 específicamente se inducen fuertemente por tratamiento con hormonas vegetales como el Ácido Abscísico y JA, lo cual se ha validado en plantas como tomate, papa y tabaco (Zhang, 2004).

En este estudio, se demostró que la aplicación de MeJA, en semilla germinada de *L. mutabilis* indujo la expresión de el gen *PI2* a partir de la hora 5 con un mantenimiento del nivel elevado de expresión hasta la hora 12. Este es un resultado interesante, ya que en comparación con otras legumbres como la soya, el chocho posee niveles de inhibidores de proteinasas bajos (Martínez-Villaluenga et al., 2006; Valdebouze et al., 1980), y a menudo las fabáceas que poseen alcaloides quinolizidínicos como el chocho, ya no tienden a acumular otros compuestos de defensa como los PI (Wink, 1987). En este caso, la aplicación de MeJA logró inducir la expresión de esta ruta de defensa, la cual bajo condiciones naturales no se expresaría.

Si bien efectivamente no se reporta a los inhibidores de proteinasas como parte de las proteínas más abundantes en chocho, ya existen estudios que reportan la identificación de ciertas proteínas de este tipo, como la *Birk serine proteinase inhibitor* (BBI) en *L. albus*, que cuenta con dos sitios activos como las típicas proteínas PI-2, con la diferencia que inhibe dos tripsinas, en lugar de la combinación clásica tripsina/quimiotripsina (Duranti et al., 2008). Más estudios deben realizarse para la caracterización de la proteína codificada por el gen *PI2* predicho en *L. mutabilis*.

Hasta el momento, no hay reportes del efecto de los PI en *D. platura*, pero este mecanismo de defensa parece ser el más importante al observarse una expresión del gen que se mantiene en el tiempo. El mecanismo de acción contra esta plaga debe ser estudiado a fondo ya que los insectos poseen estrategias para sobrellevar el efecto de estos inhibidores (Zhu-salzman & Zeng, 2015).

Finalmente, también se encontró la inducción de la expresión del gen *EBOS*, que codifica para la E-(β)-ocimeno sintasa homóloga de *Arabidopsis*. Se estudió este gen ya que el E-(β)-ocimeno es uno de los componentes más comúnmente liberados en las mezclas volátiles emitidas en respuesta a la herbivoría o daño mecánico, además de que también sirve de señal para la atracción de depredadores y parasitoides de plagas (Arimura, 2003).

Según la literatura, los transcritos del gen *EBOS* en *Arabidopsis* y *Medicago truncatula*, una legumbre modelo, aumentan tanto tras el daño mecánico como con el tratamiento con JA y MeJA (Arimura, 2003; Gomez et al., 2005; Navia-Gine et al., 2009). Los reportes en *Arabidopsis* indican que existe un pico de expresión del gen *EBOS* tras las 16h post-tratamiento con JA (Arimura, 2003), mientras en este caso obtuvimos un pico de expresión a las 3h.

Aunque estos datos no son congruentes, se explican analizando los patrones de expresión del gen *EBOS* en *M. truncatula*. En esta especie la expresión del gen tras un tratamiento con *EBOS* induce un pico de expresión del gen a las 3 horas (Gomez, 2005) como

en nuestro caso. Probablemente, la manera en que *L. mutabilis* responde al MeJA con relación a la producción de volátiles, se asemeja más a *M. truncatula* que a *Arabidopsis* ya que pertenecen a la misma familia de las fabáceas. Es por ello también que el chocho más que mantener la producción de volátiles durante muchas horas como en *Arabidopsis*, sólo acumula los transcritos durante un periodo corto de horas, lo cual se ha visto en *M. truncatula* donde la producción de terpenos volátiles es transitoria (Navia-Gine, 2009). Esto se puede observar en la Figura 8C donde se observa la expresión del gen y su rápida represión.

Cabe recalcar que tanto en *Arabidopsis* como en *M. truncatula* la expresión del gen *EBOS* es mucho mayor tras un tratamiento con JA o MeJA en comparación con otros estímulos como el daño mecánico y la herbivoría (Arimura, 2003; Navia-Gine, 2009). Por lo tanto, el uso de MeJA como elicitador de este mecanismo de defensa resulta ventajoso y de mayor eficacia que la inducción que el insecto *D. platura* pueda causar por sí solo.

Si bien el terpeno en estudio es de los más importantes, la expresión del gen *EBOS* por sí sola puede que no explique el espectro de compuestos volátiles emitidos por *L. mutabilis*. Por ejemplo, en la legumbre modelo *M. truncatula* está reportada la actividad de al menos 4 sintasas de monoterpenos que se inducen tras la aplicación de MeJA (Gomez, 2005). De entre las cuatro, la sintasa de monoterpenos 1 (Tps1) es la que posee mayor actividad, con una acumulación grande de transcritos desde la hora 1.5 hasta la hora 6 post-tratamiento (Gomez, 2005). Por ende esta enzima, al menos en leguminosas, parece tener mayor relevancia en la producción de volátiles de defensa que la *EBOS*, es de las que más tempranamente responde. Esta enzima es una β -cariofileno sintasa (Navia-Gine, 2009; Stefan et al., 2008), cuyo sesquiterpeno producido actúa como una fitoalexina antimicrobiana y como un *antifeedant* de insectos (Gomez, 2005). Se ha demostrado que éste volátil en maíz atrae al nemátodo *Heterorhabditis megidis* (War, 2012), lo cual llama la atención porque se han hecho estudios

del uso de nemátodos del género *Heterorhabditis* como control biológico de *D. platura*, obteniendo buenos resultados (Celeita, 2010).

Se deben realizar pruebas funcionales para identificar los volátiles producidos por estas enzimas ya que a menudo se trata de enzimas multiproductos que generan varios volátiles en diferentes proporciones (Stefan, 2008), lo cual hace de éste un buen mecanismo de defensa.

CONCLUSIONES

- La aplicación de MeJA sobre semilla germinada de chocho andino I-450 no elicitó la biosíntesis de alcaloides en el eje embrionario, respecto a semillas no tratadas.
- El ensamble de transcriptomas de *L. mutabilis* sirvió como herramienta efectiva para el diseño de primers homólogos y específicos para 3 genes candidatos de referencia para qPCR (*UBC*, *PTB* y *HEL*), 2 genes de síntesis de JA (*LOX2* y *AOS*) y 2 genes de respuesta de la ruta metabólica (*EBOS* y *PI2*).
- El gen *UBC* fue el gen candidato normalizador más estable seguido del gen *PTB* y *HEL* respecto a los 5 factores de variación estudiados: Órgano, Variedad, Tratamiento, Tiempo post-tratamiento y Estado Fenológico.
- La aplicación de MeJA prende la ruta del Ácido Jasmónico al aumentar los niveles de expresión de los genes de síntesis de la hormona en menos de 1 hora para el gen *LOX2* y la hora 5 para el gen *AOS*. Luego se induce la expresión de genes de respuesta tales como el *EBOS* y *PI2* desde la hora 3 y 5 respectivamente.
- El efecto de MeJA sobre la semilla germinada de *L. mutabilis* brinda protección contra *D. platura* gracias a la inducción de la vía del JA y un efecto colaborativo de los mecanismos de respuesta de volátiles e inhibidores de proteinasas.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda aumentar el número de niveles de los factores estudiados en los ensayos de los genes candidatos de referencia, y considerar otros tipos de órganos, variedades, y estados fenológicos.
- Secuenciar los productos de los genes de la vía del JA estudiados, y realizar pruebas funcionales mediante clonación para corroborar que las secuencias predichas efectivamente codifican para las proteínas y enzimas respectivas.
- Comprobar mediante qRT-PCR que existe una mayor inducción del gen que codifica para el represor JAZ1 en semilla germinada, en comparación con otros órganos como hojas adultas.
- Hacer un conteo de las pupas pasados los 14 días de desarrollo de la larva de *D. platura* en presencia de una semilla de *L. mutabilis* tratada con MeJA y Agua, y observar si existe relación entre el aumento de expresión del *PI2* y una disminución de la tasa de empupamiento.
- Evaluar la expresión de otras sintasas de terpenos en especial la Terpeno sintasa 1 (Tps1) homóloga de *Medicago truncatula*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abouzeid, S., Beutling, U., Surup, F., Abdel Bar, F. M., Amer, M. M., Badria, F. A., ... Selmar, D. (2017). Treatment of Vinca minor Leaves with Methyl Jasmonate Extensively Alters the Pattern and Composition of Indole Alkaloids. *Journal of Natural Products*, 80(11), 2905-2909. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00424>
- Aerts, R. J., Gisi, D., De Carolis, E., De Luca, V., & Baumann, T. W. (1994). Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in Catharanthus and Cinchona seedlings. *The Plant Journal*, 5(5), 635-643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1994.00635.x>
- Altschup, S. F., Gish, W., Pennsylvania, T., & Park, U. (1990). Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science, 403-410.
- Andersen, C., Jensen, J., & Ørntoft, T. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15), 5245-5250.
- Arimura, Æ. G., Gershenzon, J., Takabayashi, Æ. J., & Takabayashi, J. (2003). Functional identification of AtTPS03 as (E) - b -ocimene synthase : a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in Arabidopsis thaliana, 745-751. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0924-0>
- Baldeón, M. E., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., Fornasini, M., Sujetos, E. N., & Diabetes, C. O. N. (2012). Hypoglycemic effect of cooked lupinus mutabilis and its purified alkaloids in subjects with type-2 diabetes. *Nutr Hosp.*, 27(4), 1261-1266. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5761>
- Barlóg, P. (2002). Effect of magnesium and nitrogenous fertilisers on the growth and alkaloid content in Lupinus angustifolius L. *Aust. J. Agric. Res.*, 53, 671-676.
- Bektas, Y., & Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5(804), 1-17.
- Bialek, K., Michalczuk, L., & Cohen, J. D. (1992). Auxin Biosynthesis during Seed Germination in Phaseolus vulgaris1, 509-517.
- Bioinformatics, B. (2018). FASTQC. Recuperado a partir de <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/download.html>

- Birner, J. (1969). Determination of total steroid bases in *Solanum* species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(2), 258-259. <https://doi.org/10.1002/jps.2600580231>
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N. R., Vries, M. De, & Zeilmaier, T. (2017). *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid, 114(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.1701101114>
- Caicedo, V., & Peralta, I. (2000). *Potential zonification, production systems and artisanal processing of Andean lupine (Lupinus mutabilis Sweet) in Ecuador*. Quito, Ecuador.
- Caicedo V., C., Murillo I., A., Pinzón Z., J., Peralta I., E., & Rivera M., M. (2010). *Plegable Divulgativo no. 169. INIAP-450 Andino: Variedad de chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*. Quito, Ecuador.
- Celeita, J. (2010). *Susceptibilidad de Delia platura (Meigen, 1826) (Diptera: Anthomyiidae) a Steinernema spp y Heterorhabditis*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Chico, J. M., Chini, A., Fonseca, S., & Solano, R. (2008). JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling, 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.003>
- Chludil, H., Vilariño, M., Franco, M., & Leicach, S. (2009). Changes in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* Alkaloid Profiles in Response to Mechanical Damage. *J. Agric. Food Chem*, 57, 6107-6113. <https://doi.org/10.1021/jf901232c>
- Compeau, P. E. C., Pevzner, P. A., & Tesler, G. (2011). How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. *Nature Biotechnology*, 29(11), 987-991. <https://doi.org/10.1038/nbt.2023>
- Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., & Sessa, F. (2008). The major proteins of lupin seed : Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 624-633. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.002>
- Falconí, C. E. (2012). *Lupinus mutabilis in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance*. Wageningen University.
- Falconi, C., Visser, R., & Heusden, S. (2015). Influence of plant growth stage on resistance to anthracnose in Andean lupin (*Lupinus mutabilis*). *Crop & Pasture Science*, 66, 729-734.
- Foley, R. C., Jimenez-lopez, J. C., Kamphuis, L. G., Hane, J. K., Melsner, S., & Singh, K. B.

- (2015). Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic , protein and comparative genomic approaches. *BMC Plant Biology*, 15(106), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0485-6>
- Frankowski, K., Wilmowicz, E., Kućko, A., Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., & Kopcewicz, J. (2015). Profiling the BLADE-ON-PETIOLE gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(11), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1972-y>
- Frick, K. M., Kamphuis, L. G., Siddique, K. H. M., Singh, K. B., & Foley, R. C. (2017). Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in Lupins and Prospects for Grain Quality Improvement. *Front. Plant Sci*, 8(87), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00087>
- Ganzera, M., Krüger, A., & Wink, M. (2010). Determination of quinolizidine alkaloids in different *Lupinus* species by NACE using UV and MS detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5), 1231-1235. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.05.030>
- Ghorbanpour, M. (2014). Seed Alkaloids Content and Antioxidant Enzymes Activity in Black Henbane as Influenced by Ammonium Nitrate Application and Water Deficit Stress. *Journal of Medicinal plants*, 13(49), 75-86.
- Gill, H. K., Goyal, G., & Gillett-kaufman, J. L. (2016). *Seedcorn maggot* , *Delia platura* (*Meigen*) (*Insecta* : *Diptera* : *Anthomyiidae*) 1.
- Gomez, S. K., Cox, M. M., Bede, J. C., Inoue, K., Alborn, H. T., Tumlinson, J. H., & Korth, K. L. (2005). Lepidopteran Herbivory and Oral Factors Induce Transcripts Encoding Novel Terpene Synthases in *Medicago truncatula*, 127, 114-127. <https://doi.org/10.1002/arch.20037>
- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inze, D., Gheysen, G., & Goossens, A. (2009). Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO reports*, 10(8), 1-6. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.103>
- Guerra, P. C., Keil, C. B., Stevenson, P. C., Mina Chala, D. F., Samaniego Arguello, S. T., Peralta I., E., ... Chancellor, T. C. B. (2017). Larval performance and adults attraction of *Delia platura* (Diptera: Anthomyiidae) in a native and an introduced crop. *Journal of Economic Entomology*, 110(1), 186-191.
- Haiwei, S., Yongjie, M., Xiaofeng, L., Feng, C., Ying, Q., Wenyu, Y., & Kai, S. (2016). The roles of auxin in seed dormancy and germination. *Hereditas (Beijing)*, 38(4), 314-322. <https://doi.org/10.16288/j.ycz.15-464>

- Hatzold, T., Elmadfa, I., Gross, R., Wink, M., Hartmann, T., & Witte, L. (1983). Quinolizidine Alkaloids in Seeds of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem*, *31*, 934-938.
- Hentrich, M., Bottcher, C., Duchting, P., Cheng, Y., Zhao, Y., Berkowitz, O., ... Pollmann, S. (2014). The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression, *74*(4), 626-637. <https://doi.org/10.1111/tpj.12152>.The
- Hickman, R., Verk, M. C. Van, Dijken, A. J. H. Van, Mendes, P., Vroegop-vos, I. A., Caarls, L., ... Wees, S. C. M. Van. (2017). Architecture and Dynamics of the Jasmonic Acid Gene Regulatory Network, *29*(September), 2086-2105. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00958>
- Integrated DNA Technologies. (2018). Oligo Analyzer. Recuperado a partir de <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- Karara, H. (1987). An Efficient Method for the Extraction of Alkaloids from Bitter Lupin Seed. *Fat Sci. Technol.*, *89*(11), 442-446.
- Levine, B. J., & Fischbach, H. (1955). The Determination of Protoveratrine. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, *44*(12), 713-716.
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, *25*(4), 402-408.
- Lomas, L., Mazon, M., & Peralta, E. (2012). *Damage quantification and alternatives for the control of the seed fly (Delia platura Meigen) in Andean lupine (Lupinus mutabilis Sweet)*. Paute, Ecuador.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2006). Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of a -galactosides. *Food Chemistry*, *98*, 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.074>
- Mina, D., Struelens, Q., Carpio, C., Rivera, M., Rebai, N., Rebaudo, F., & Dangles, O. (2017). Lupin Pest Management in the Ecuadorian Andes: Current Knowledge and Perspectives. *Outlooks on Pest Management*, *28*(7), 250-256. <https://doi.org/10.1564/v28>
- Minitab. (2017). Minitab 18.
- Moncayo, L., Barrera, V., Caicedo, C., Peralta, E., & Rivera, M. (2000). Sistemas de

producción de chocho en la sierra ecuatoriana. En *Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en Ecuador* (pp. 5-18).

Naganowska, B., Wolko, B., & Kaczmarek, Z. (2003). Nuclear DNA Content Variation and Species Relationships in the Genus *Lupinus* (Fabaceae), (2000).
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg145>

Navia-Gine, W. G., Yuan, J. S., Mauromoustakos, A., Murphy, J. B., Chen, F., & Korth, K. L. (2009). *Medicago truncatula* (E) - b -ocimene synthase is induced by insect herbivory with corresponding increases in emission of volatile ocimene. *Plant Physiology et Biochemistry*, 47(5), 416-425.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.008>

Neil, R., Miller, G., Sergio, G., Alves, C., & Sluys, M. Van. (2017). Plant immunity : unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses, 681-687.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcw284>

Ortega-David, E., & Rodriguez-Stouvenel, A. (2014). Food Processing & Technology Bioprocessing of Lupin Cotyledons (*Lupinus mutabilis*) with *Rhizopus oligosporus* for Reduction of Quinolizidine Alkaloids. *J Food Process Technol*, 5(5).
<https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000323>

Pérez, P., Lagunes, L., López, J., Ramos, J., & Aranda, E. (2013). Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus silvestres*. *Bioagro*, 25(2), 101-108.

Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.

Pichersky, E., Chen, F., Ro, D., Petri, J., Gershenzon, J., & Tholl, D. (2004). Characterization of a Root-Specific Arabidopsis Terpene Synthase Responsible for the Formation of the Volatile, 135(August), 1956-1966. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044388.1956>

Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), 308.

Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28.

Pozo, M. J., Ent, S. Van Der, & Loon, L. C. Van. (2004). Transcription factor MYC2 is

involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*, 511-523.

Pozuelo, J. M., Lucas, M. M., Lorenzo, D., Fernández-Pascual, M., Maldonado, S., & Felipe, D. R. (2001). Immunolocalization of alkaloids and X-ray microanalysis of elements in lupin seeds. *Protoplasma*, 218(1-2), 104-111. <https://doi.org/10.1007/BF01288366>

Przysiecka, Ł., Książkiewicz, M., Wolko, B., & Naganowska, B. (2015). Structure, expression profile and phylogenetic inference of chalcone isomerase-like genes from the narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) genome. *Frontiers in Plant Science*, 6(April), 1-20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00268>

Qiagen. (2018). CLC Genomics Workbench. Recuperado a partir de <https://www.qiagenbioinformatics.com>

RefFinder. (2018). Recuperado a partir de <http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>

Reinhard, H., Rupp, H., Sager, F., Streule, M., & Zoller, O. (2006). Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.079>

Resta, D., Boschin, G., Agostina, A. D., & Arnoldi, A. (2008). Quantification of Quinolizidine Alkaloids in Lupin Seeds, Lupin-Based Ingredients and Foods, 533-535.

Reymond, P., Weber, H., Damond, M., & Farmer, E. E. (2000). Differential Gene Expression in Response to Mechanical Wounding and Insect Feeding in *Arabidopsis*, 12(May), 707-719.

Romeo, F. V., Fabroni, S., Ballistreri, G., Muccilli, S., Spina, A., & Rapisarda, P. (2018). Characterization and antimicrobial activity of alkaloid extracts from seeds of different genotypes of *Lupinus* spp. *Sustainability (Switzerland)*, 10(3), 6-10. <https://doi.org/10.3390/su10030788>

Ruijter, J., van der Velden, A., & Ilgun, A. (2014). LinRegPCR.

Samaniego, S. T., Guerra, P., Peralta I., E., Báez Cevallos, F. J., & Mazón, N. (2015). Evaluación de tres microorganismos entomopatógenos para el control de la mosca de la semilla (*Delia plantura* Meigen) en el cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), en Ecuador. En *Quinoa: V Congreso mundial, II Simposio Internacional de Granos Andinos: libro de resúmenes* (1ra ed., pp. 1-10). Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy - EDIUNJU.

- Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer, H., & Elmadfa, I. (1982). Composition and Protein Quality of *Lupinus Mutabilis*. *J. Nutr.*, *112*, 70-76.
- Seob, J., Yang, L. Æ., & Choi, D. (2007). Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*, 1053-1063. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0311-1>
- Shoji, T., Yamada, Y., & Hashimoto, T. (2000). Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant & cell physiology*, *41*(7), 831-839. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd001>
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology*, *7*(33).
- Sotelo, A. (2017). *Uso de Activadores de Defensa para el Manejo de Delia platura (Meigen) (Díptera: Anthomyiidae) en semillas de chocho, Lupinus mutabilis (Sweet)*. Universidad Central del Ecuador.
- SRA Toolkit Development Team. (2018). NCBI SRA Toolkit. Recuperado a partir de <http://ncbi.github.io/sra-tools/>
- Sreevidya, N., & Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Materials. *Journal of AOAC International*, *86*(6), 1124-1127.
- Stefan, G. A., Massimo, G., Ma, V., Bossi, S., Schulze, B., Leitner, M., ... Boland, W. (2008). Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula* : concerted action of jasmonate , ethylene and calcium signaling, 453-464. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0631-y>
- Tamrakar, R., Yamada, T., Furuta, I., Cho, K., Morikawa, M., Yamada, H., ... Minakami, H. (2007). Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC infectious diseases*, *7*, 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-128>
- Taylor, C. M., Jost, R., Erskine, W., & Nelson, M. N. (2016). Identifying stable reference genes for qRT-PCR normalisation in gene expression studies of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L). *PLoS ONE*, *11*(2), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148300>
- Thakur, M., & Singh, B. (2013). Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochemistry*, 1-10.

- Tsaliki, E., Lagouri, V., & Doxastakis, G. (1999). Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus* ssp . *Graecus*). *Food Chemistry*, *65*, 71-75.
- Turner, J. G., Ellis, C., & Devoto, A. (2002). The Jasmonate Signal Pathway, 153-165. <https://doi.org/10.1105/tpc.000679.S154>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3 — new capabilities and interfaces, *40*(15), 1-12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vaca, M., Guadalupe, I., Erazo, S., Tinizaray, K., Chico, M. E., Cooper, P. J., & Hay, P. (2010). High prevalence of bacterial vaginosis in adolescent girls in a tropical area of Ecuador. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *117*(2), 225-228. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2009.02397.x>
- Valdebouze, P., Bergeron, E., Gaborit, T., & Delort-Laval, J. (1980). Content and distribution of trypsin inhibitor and hemagglutinins in some legume seeds. *J. Plant Sci.*, *60*, 695-701.
- Vandesompele, K., De Preter, F., Pattyn, B., Poppe, N., Van Roy, A., De Paepe, F., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, *3*(7).
- Wang, Z., Rahman, A. B. M. M., Wang, G., & Ludewig, U. (2015). Hormonal interactions during cluster-root development in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Journal of Plant Physiology*, *177*, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.10.022>
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores, *7*(10), 1306-1320.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates : biosynthesis , perception , signal transduction and action in plant stress response , growth and development . An update to the 2007 review in *Annals of Botany*, 1021-1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wink, M. (1983). Wounding-Induced Increase of Quinolizidine Alkaloid Accumulation in Lupin Leaves. *Z. Naturforsch*, *38*, 905-909.
- Wink, M. (1987). Chemical ecology of quinolizidine alkaloids. *American Chemical Society*, *58*(7-8), 455-8. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-1987-0330.ch047>
- Wink, M. (1987). Quinolizidine Alkaloids: Biochemistry, Metabolism, and Function in

Plants and Cell Suspension Cultures. *Planta Medica*, 509-514.

Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 225-233. <https://doi.org/10.1007/BF00303957>

Wink, M., & Witte, L. (1985). Quinolizidine Alkaloids as Nitrogen Source for Lupin Seedlings and Cell Cultures. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 40(11-12), 767-775. <https://doi.org/10.1515/znc-1985-11-1204>

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST : A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.

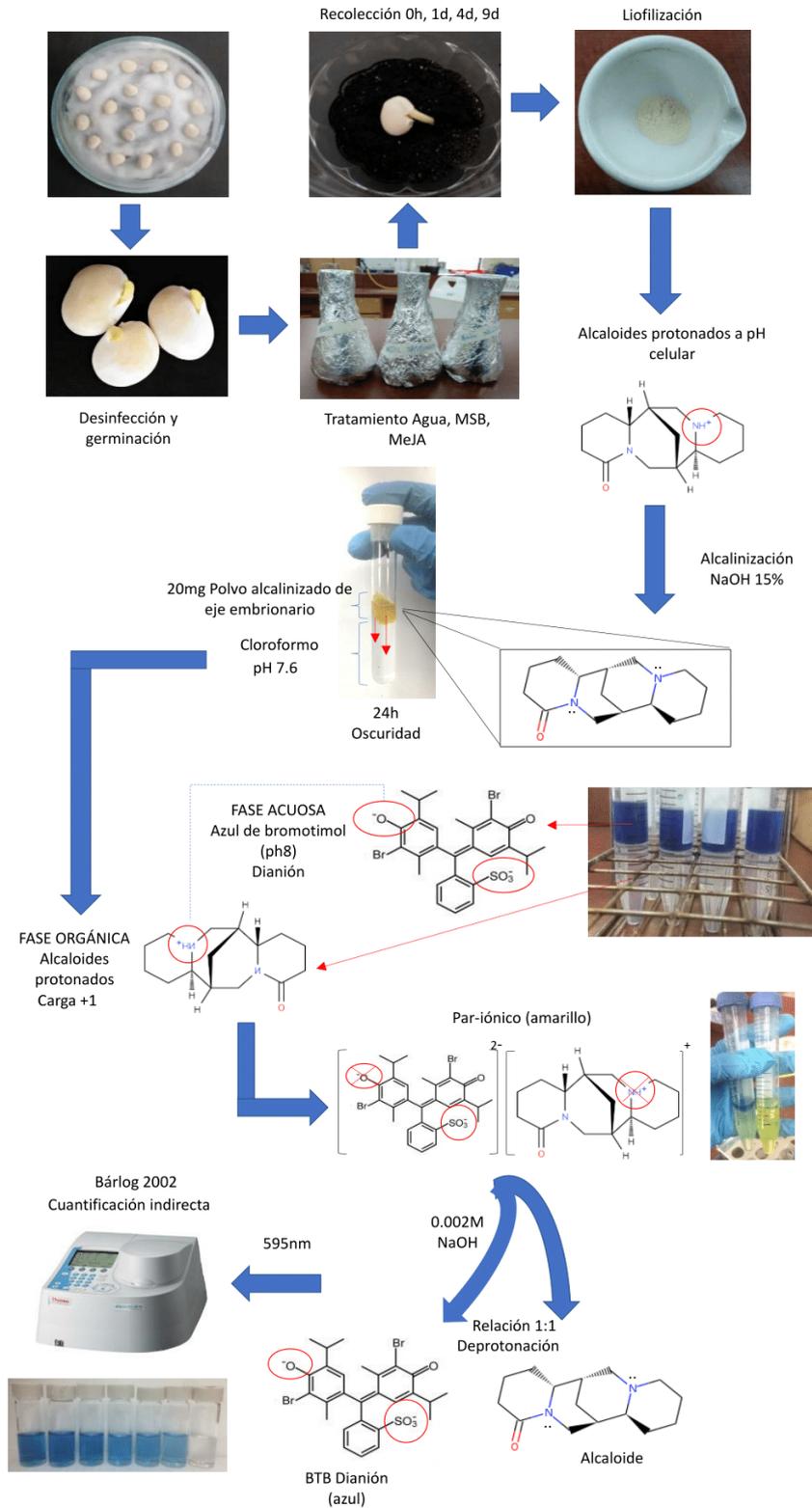
Zhang, H., Xie, X., Xu, Y., & Wu, N. (2004). Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene, 42, 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.006>

Zhu-salzman, K., & Zeng, R. (2015). Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors, (October 2014), 1-20. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020816>

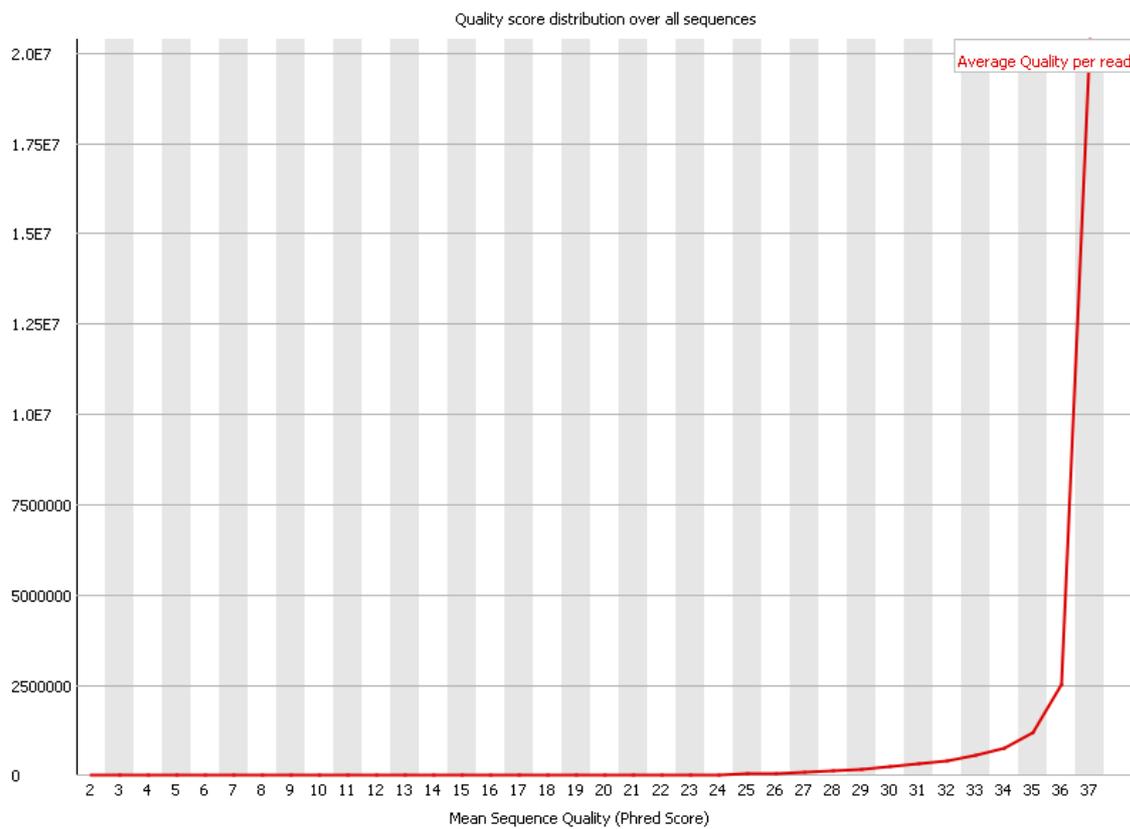
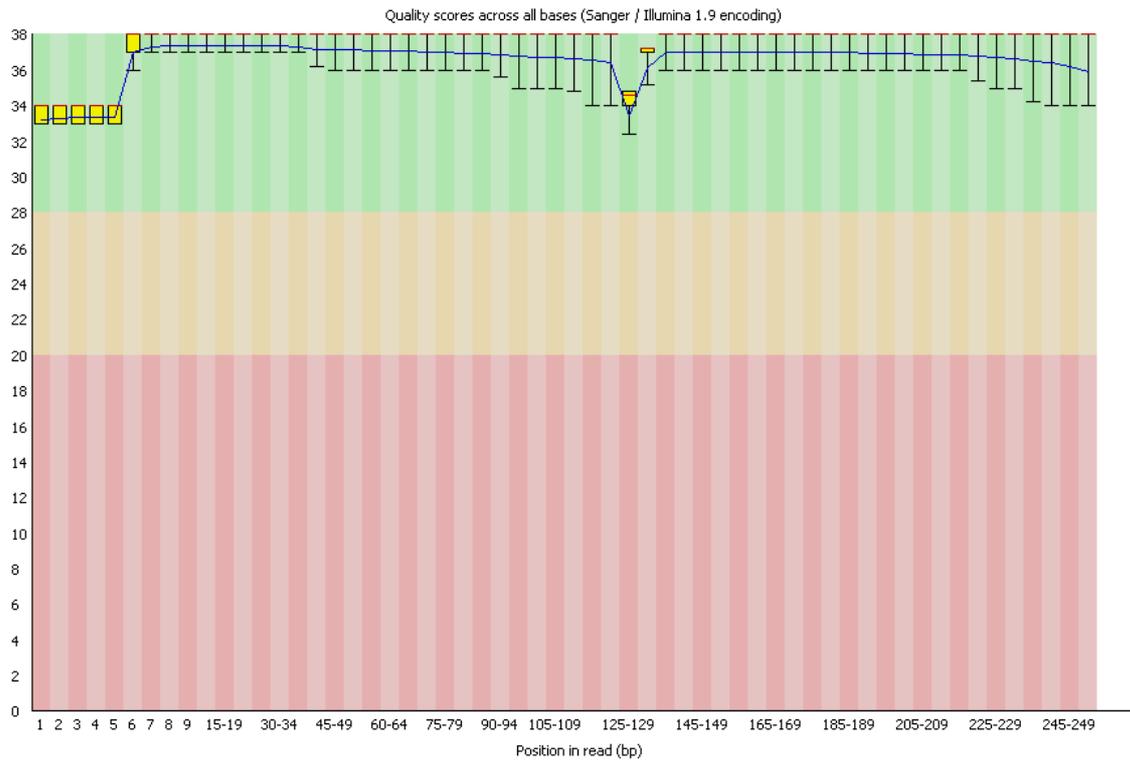
Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, 31(13), 3406-3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

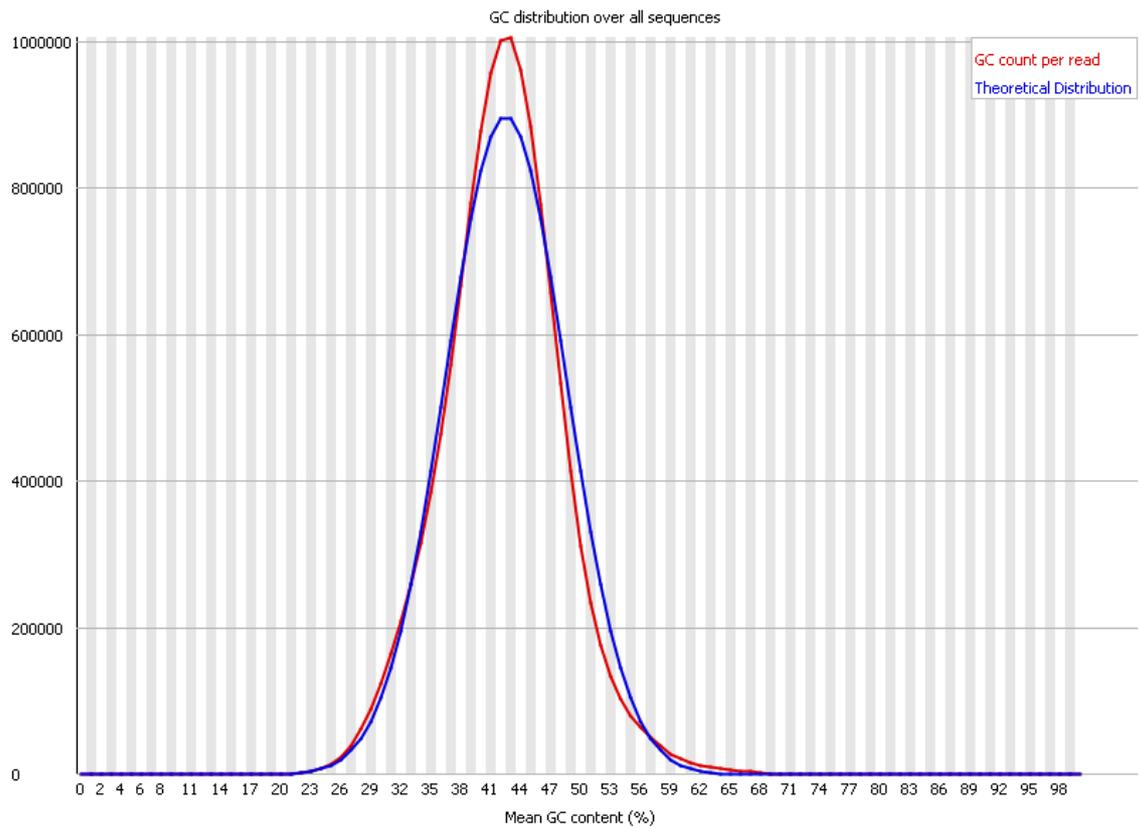
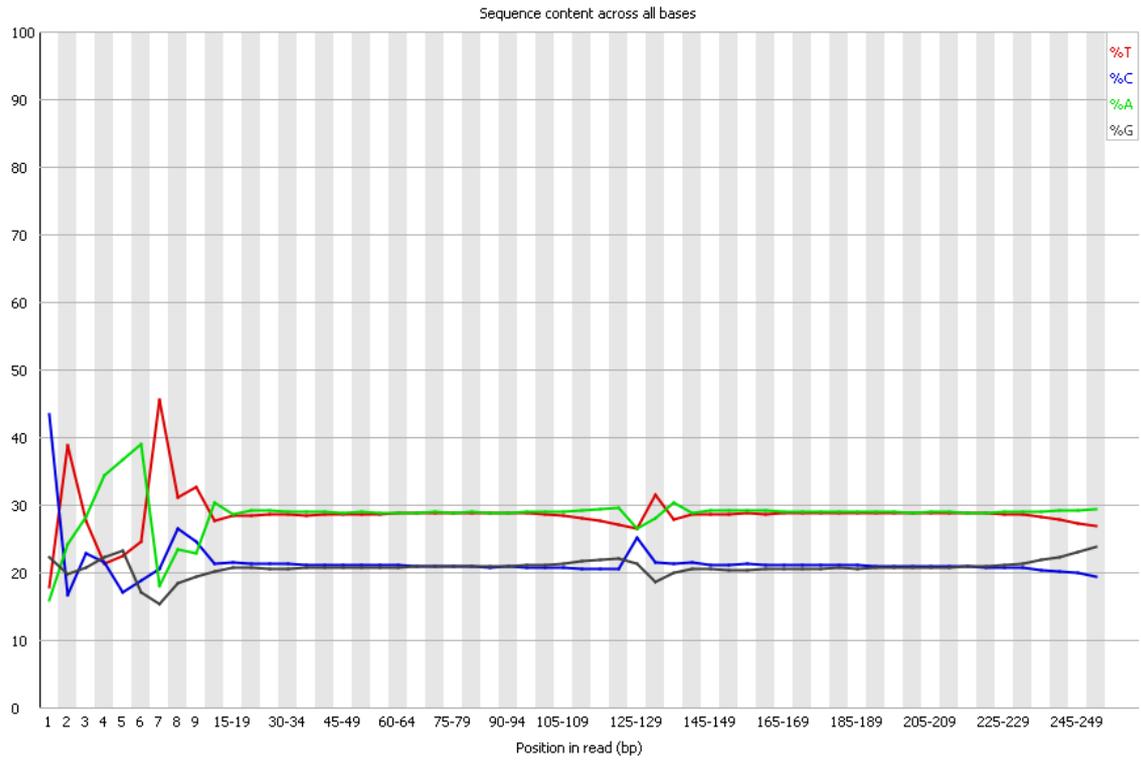
ANEXOS

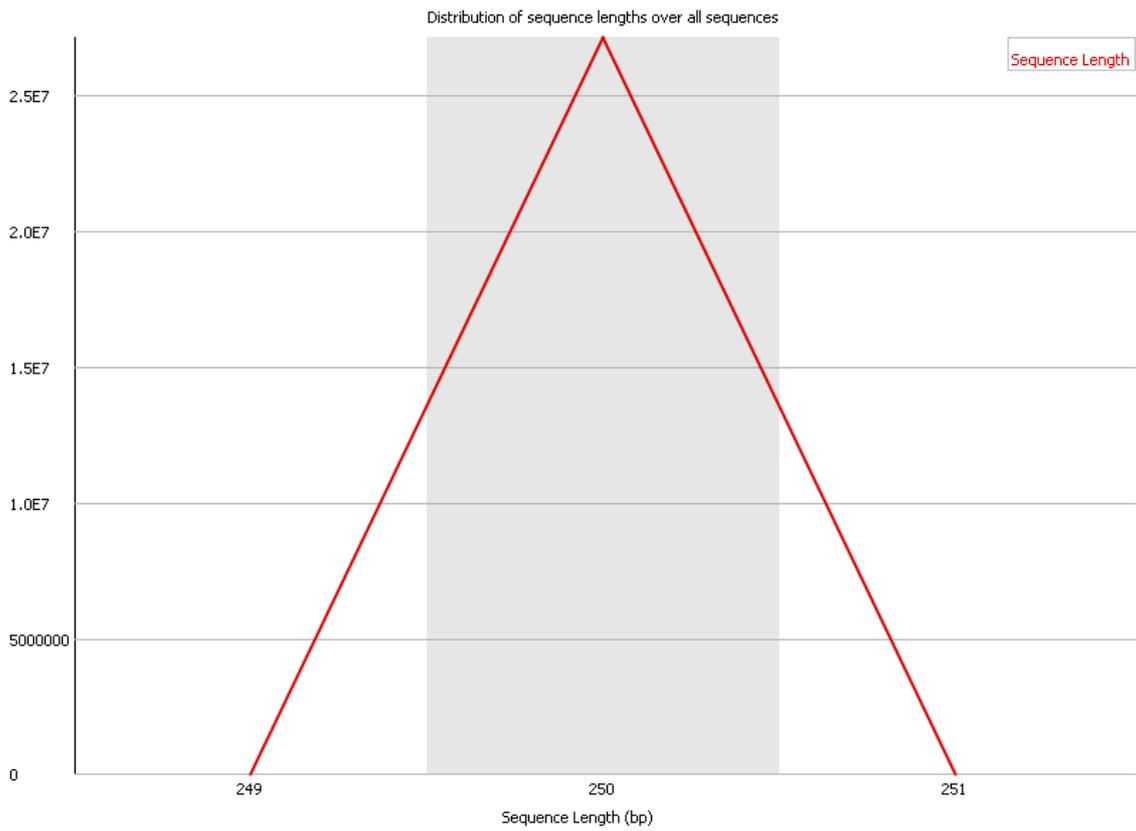
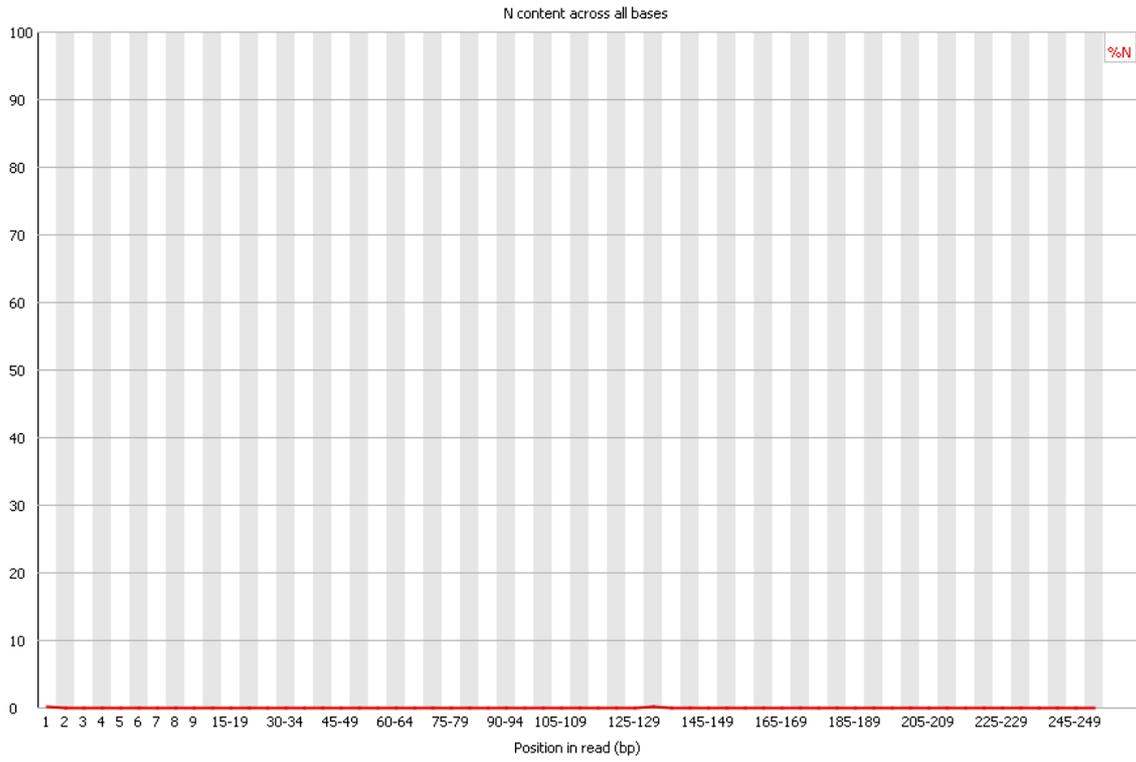
Anexo 1 Protocolo de cuantificación de alcaloides

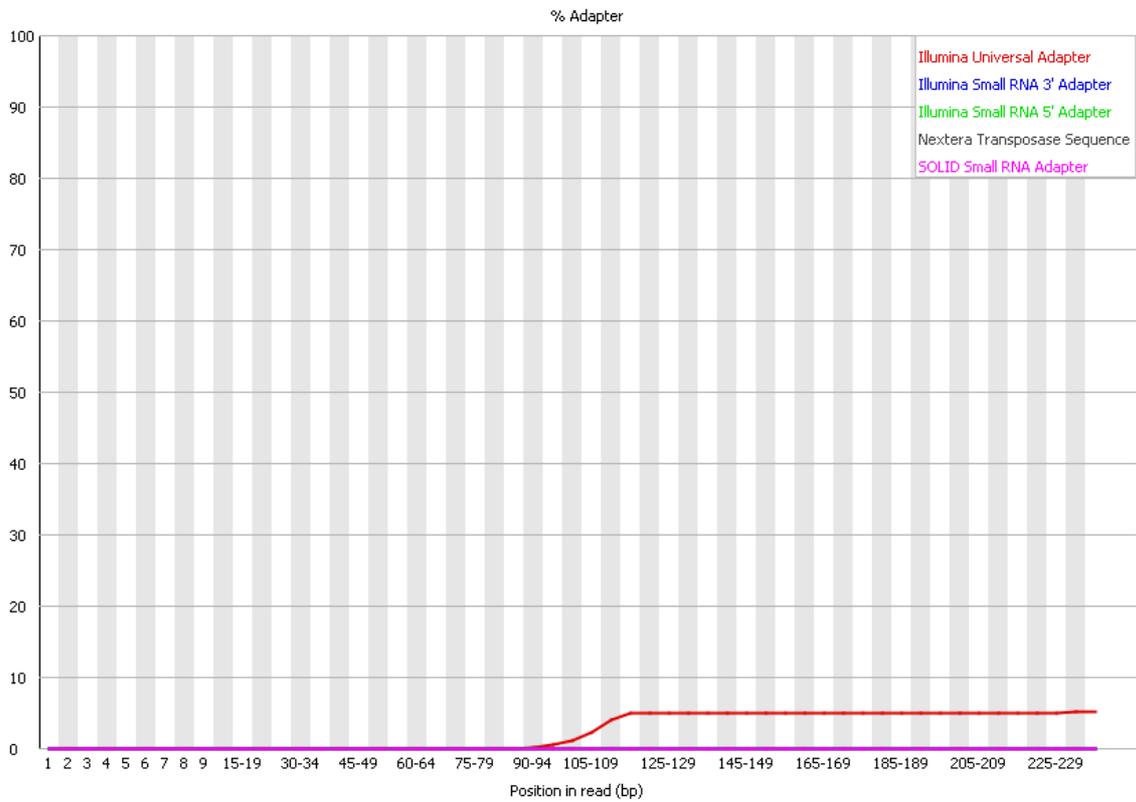
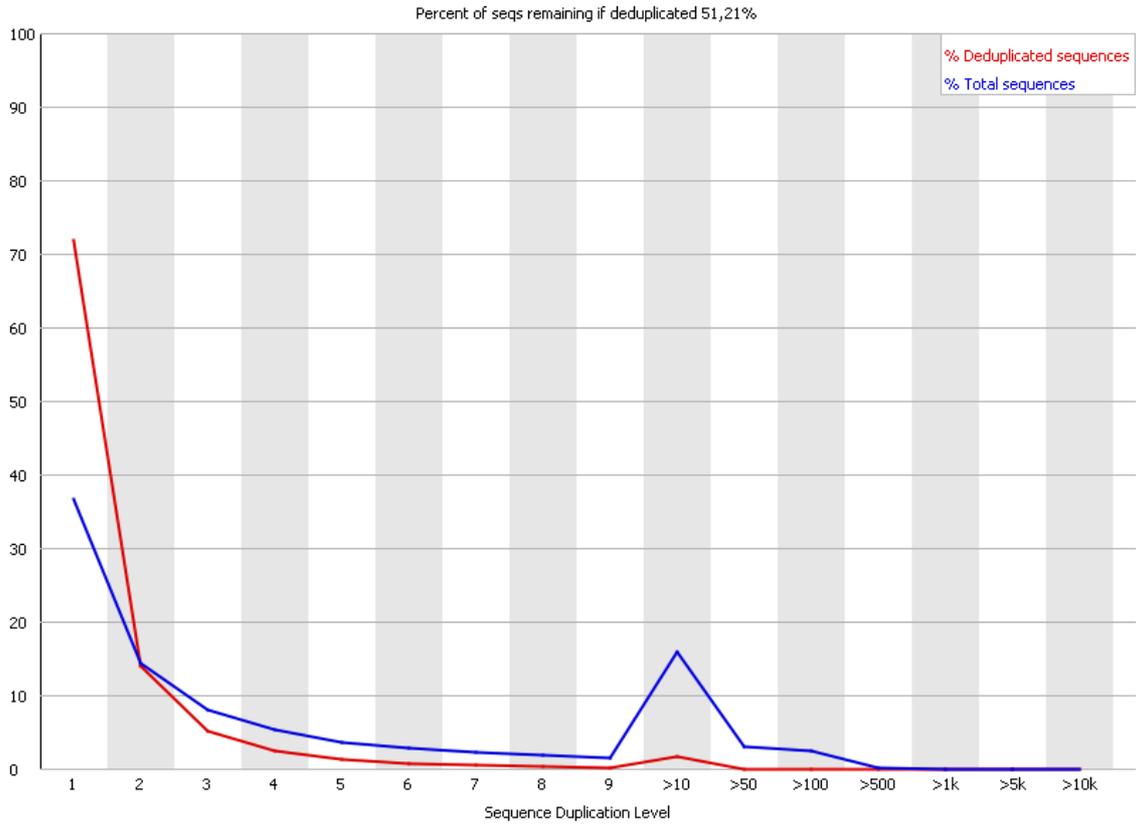


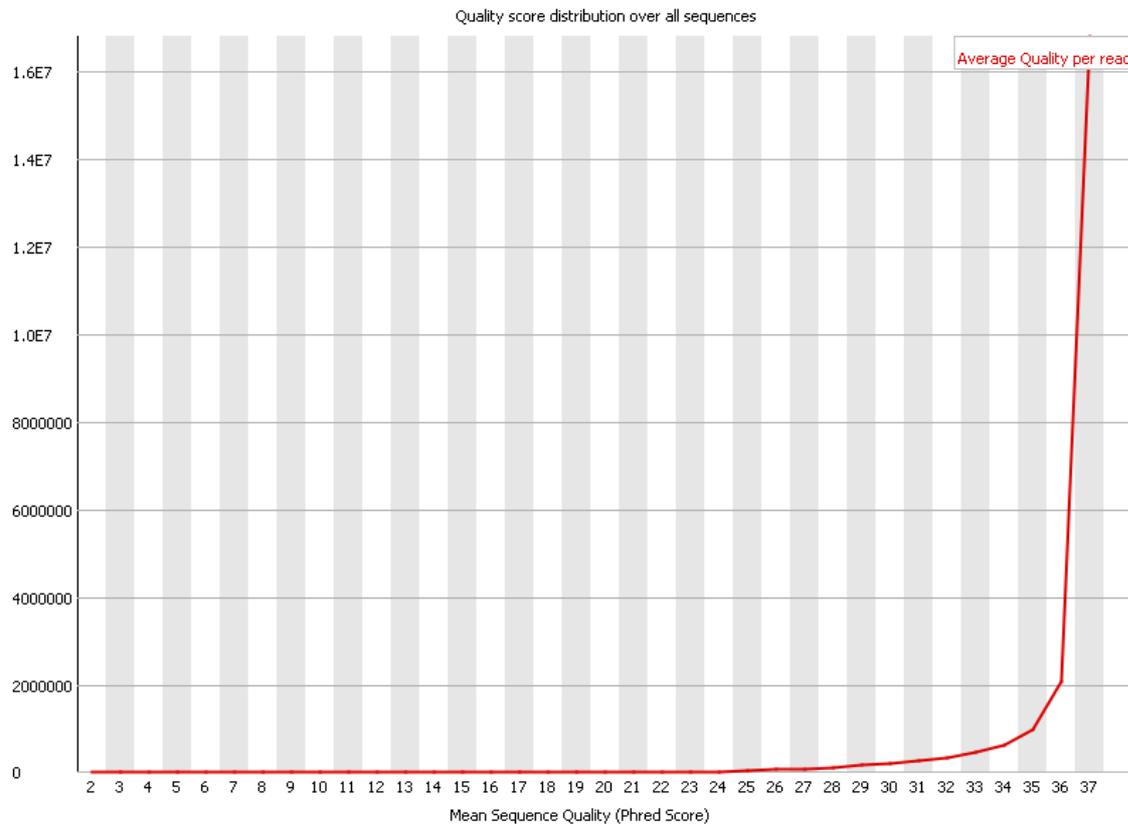
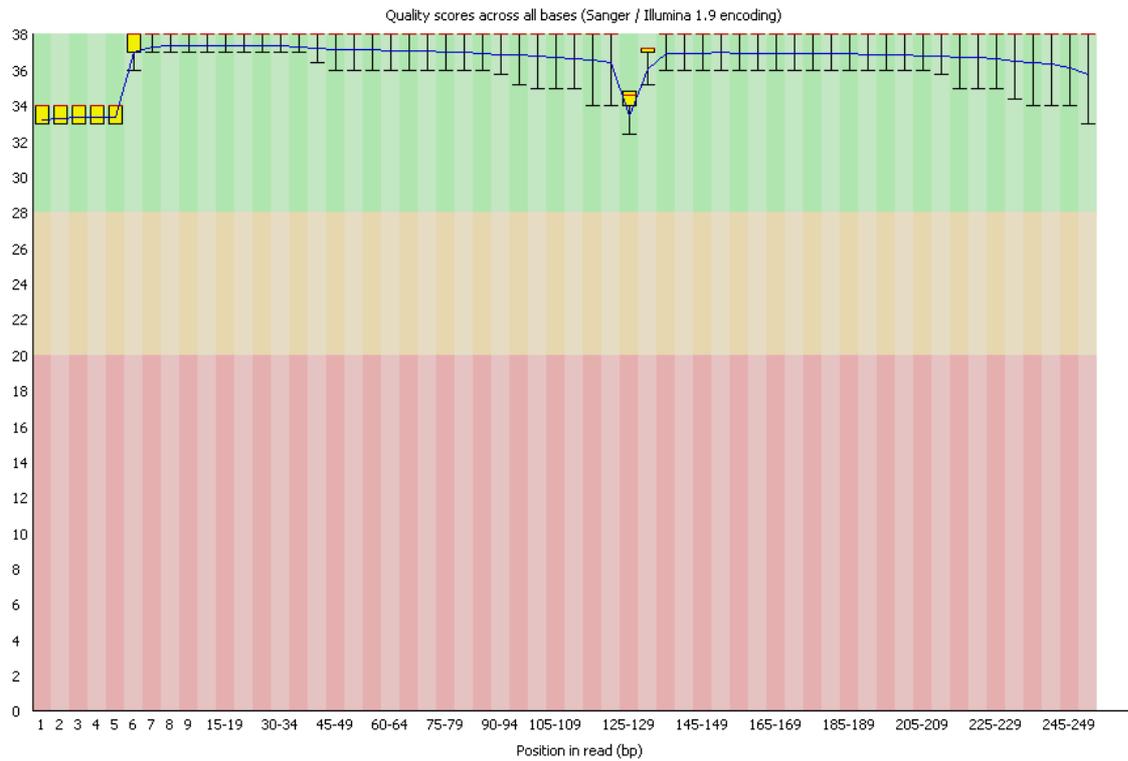
Anexo 2 Parámetros de calidad FASTQC para el archivo de secuenciamiento SRR3423049

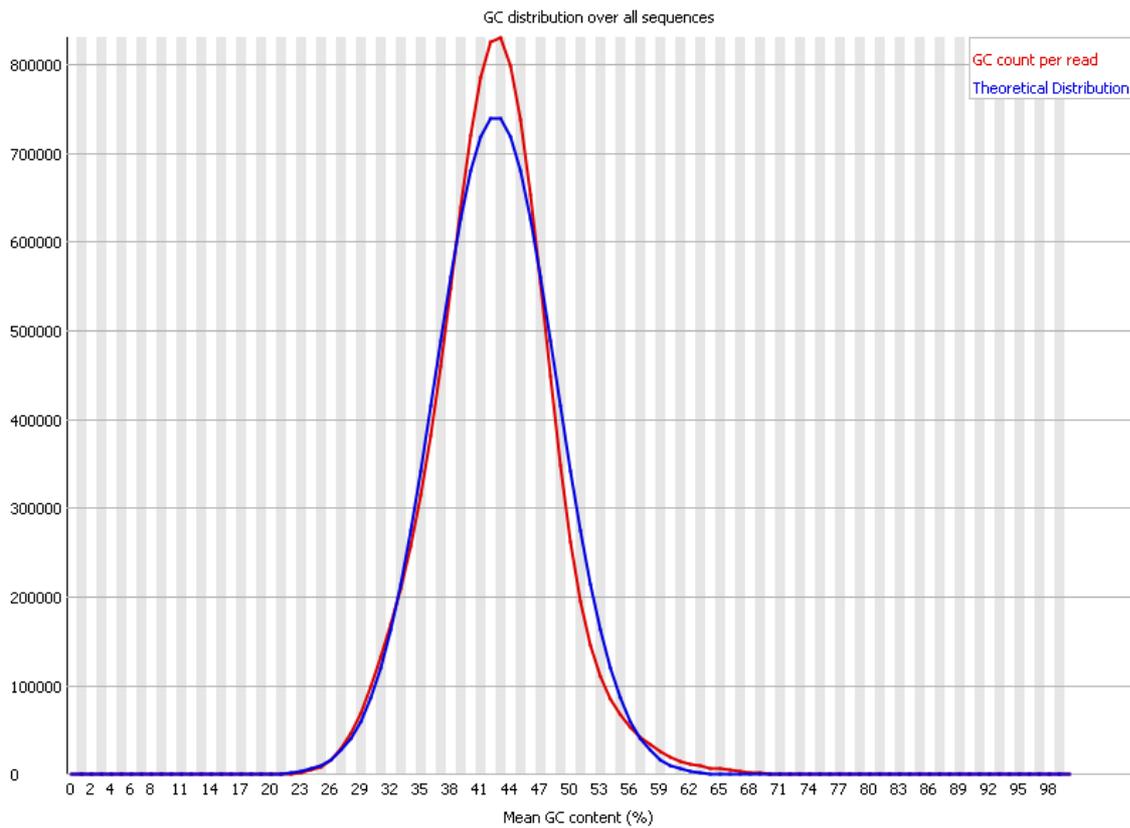
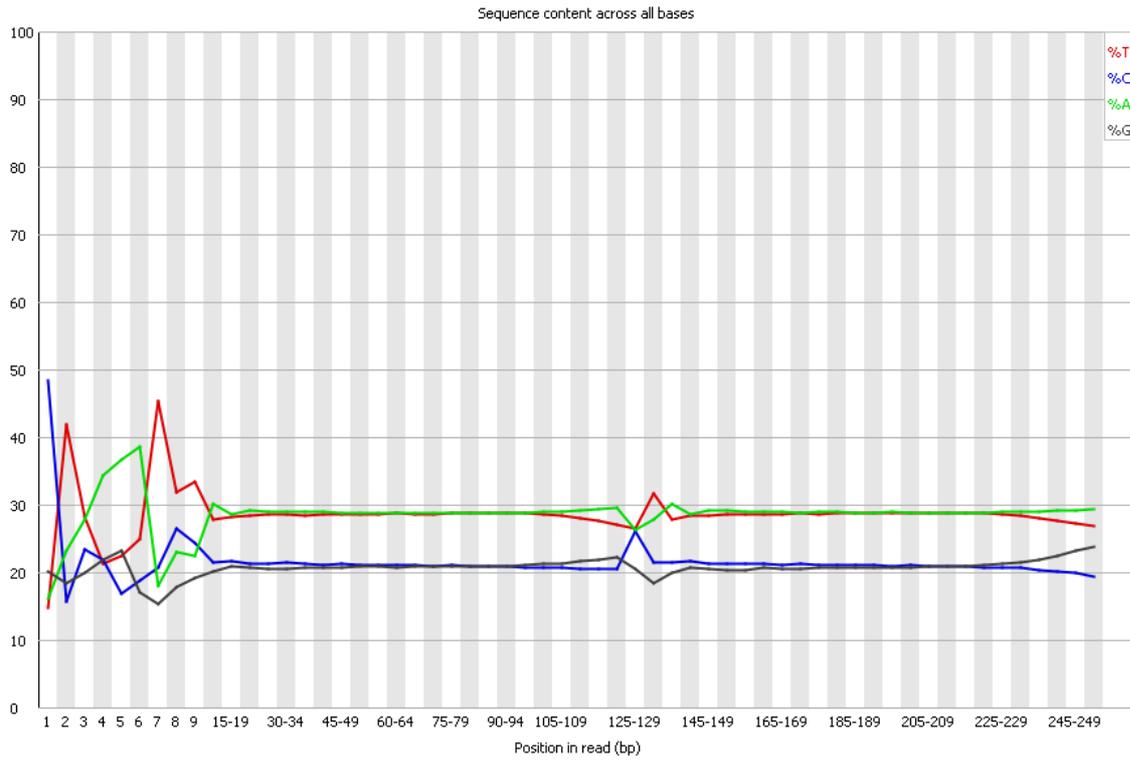


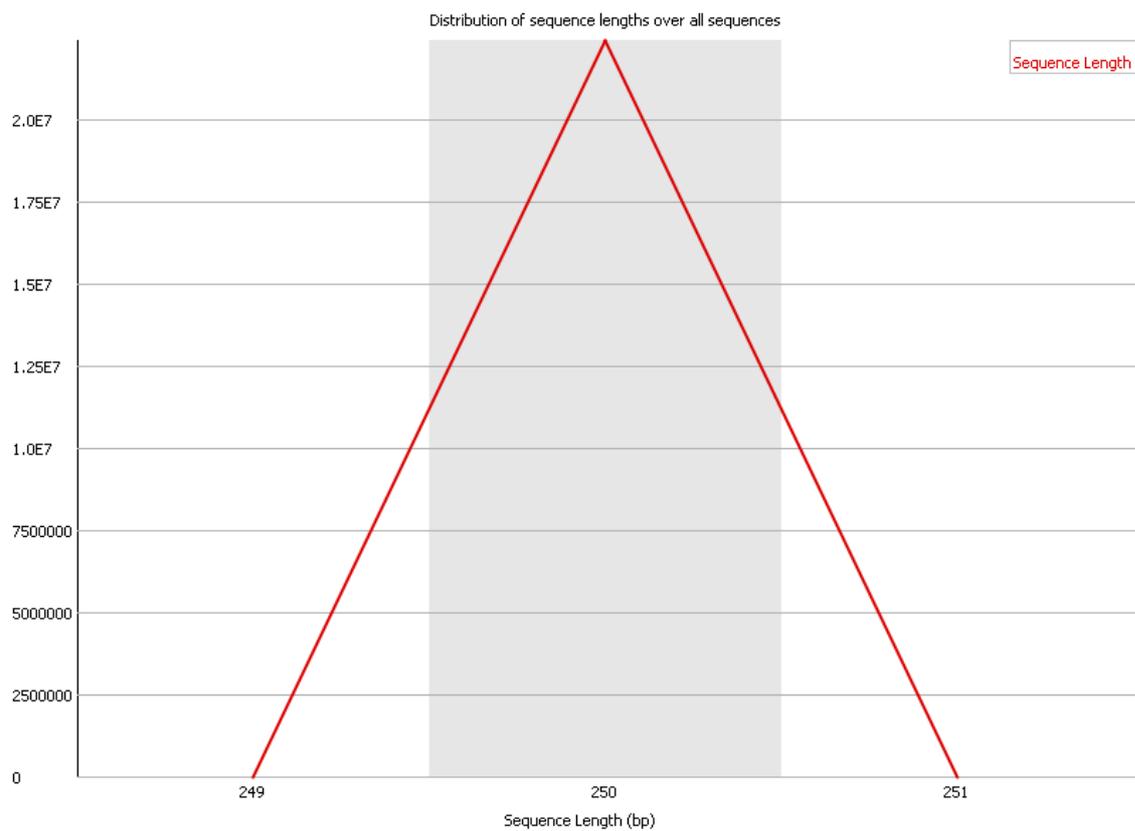
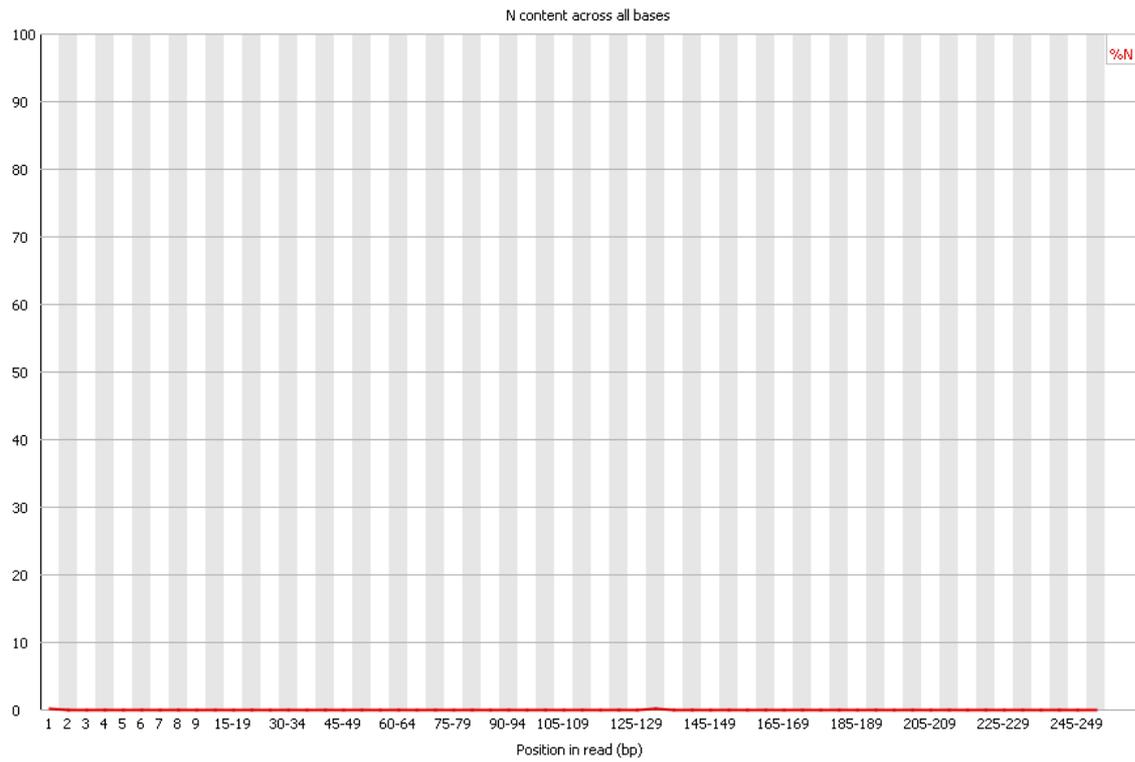


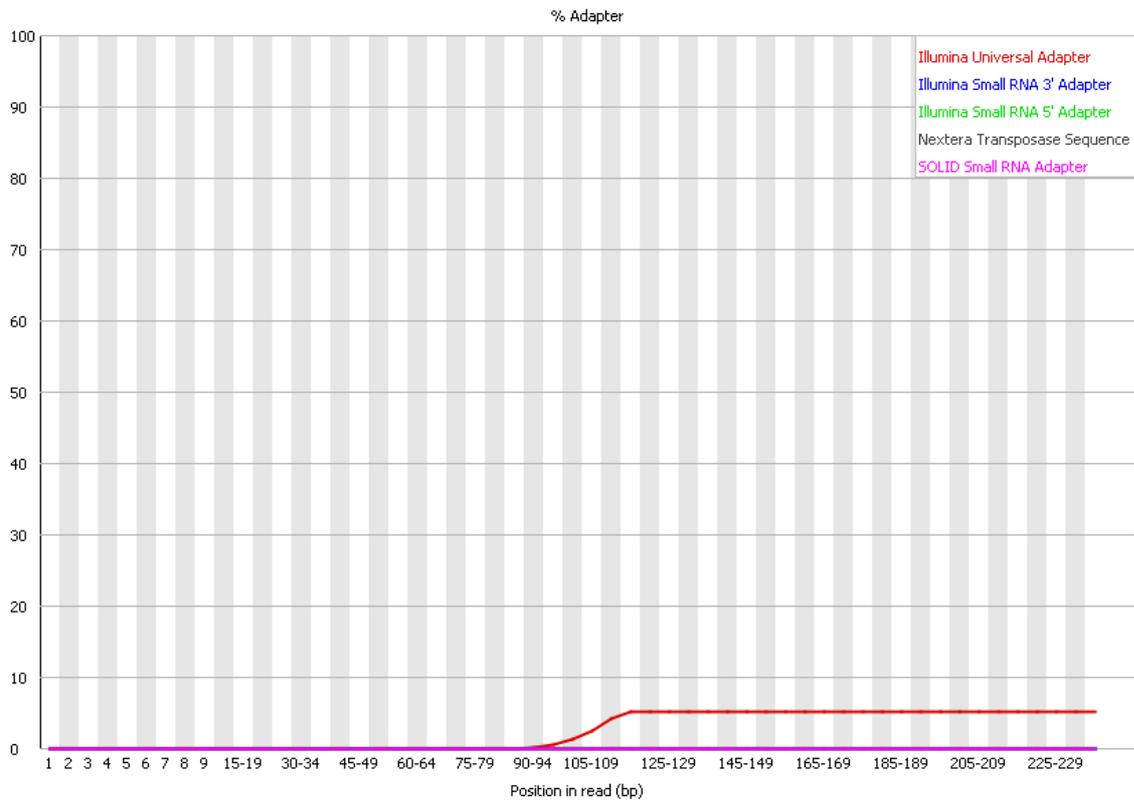
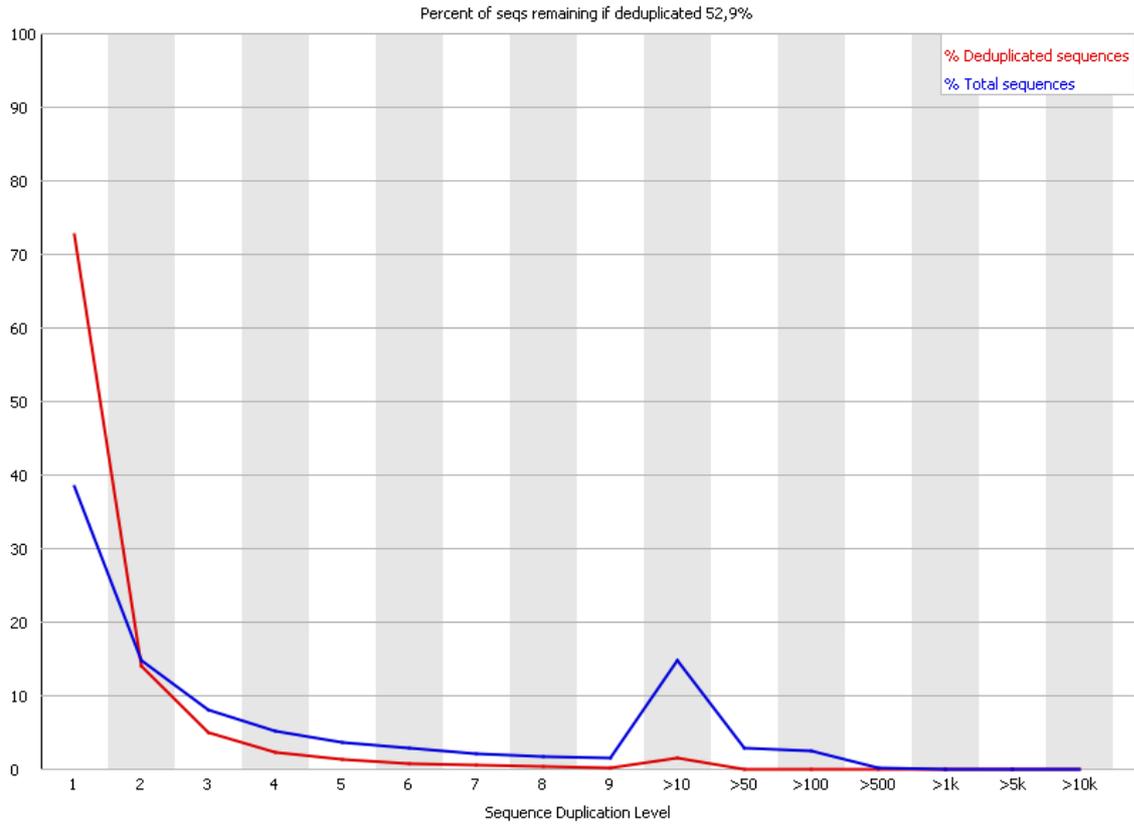




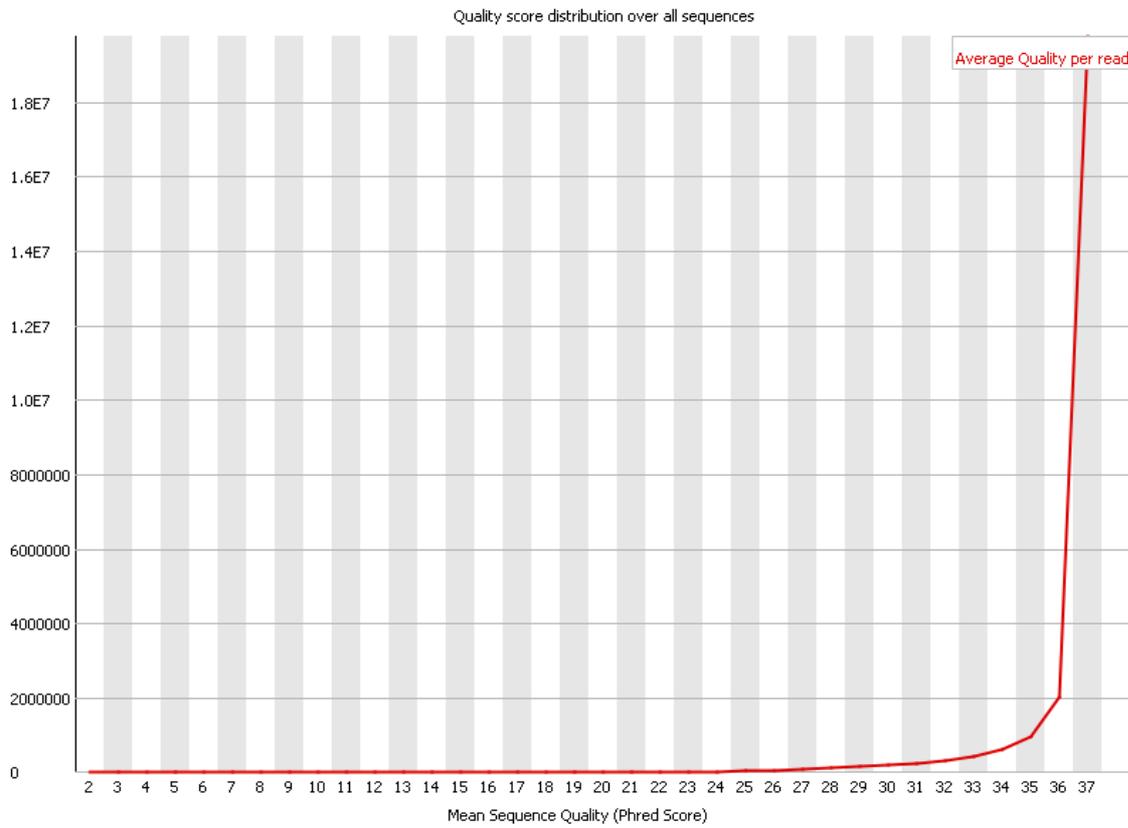
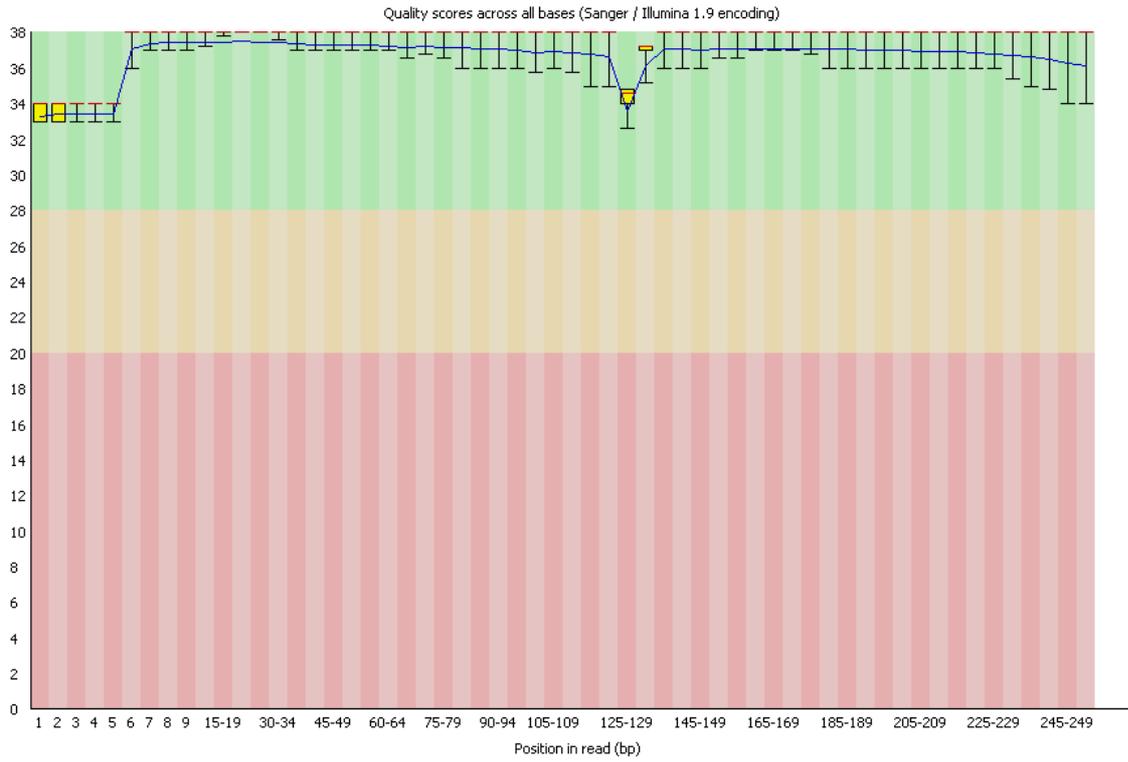
Anexo 3 Parámetros de calidad FASTQC para el archivo de secuenciamiento SRR3423050

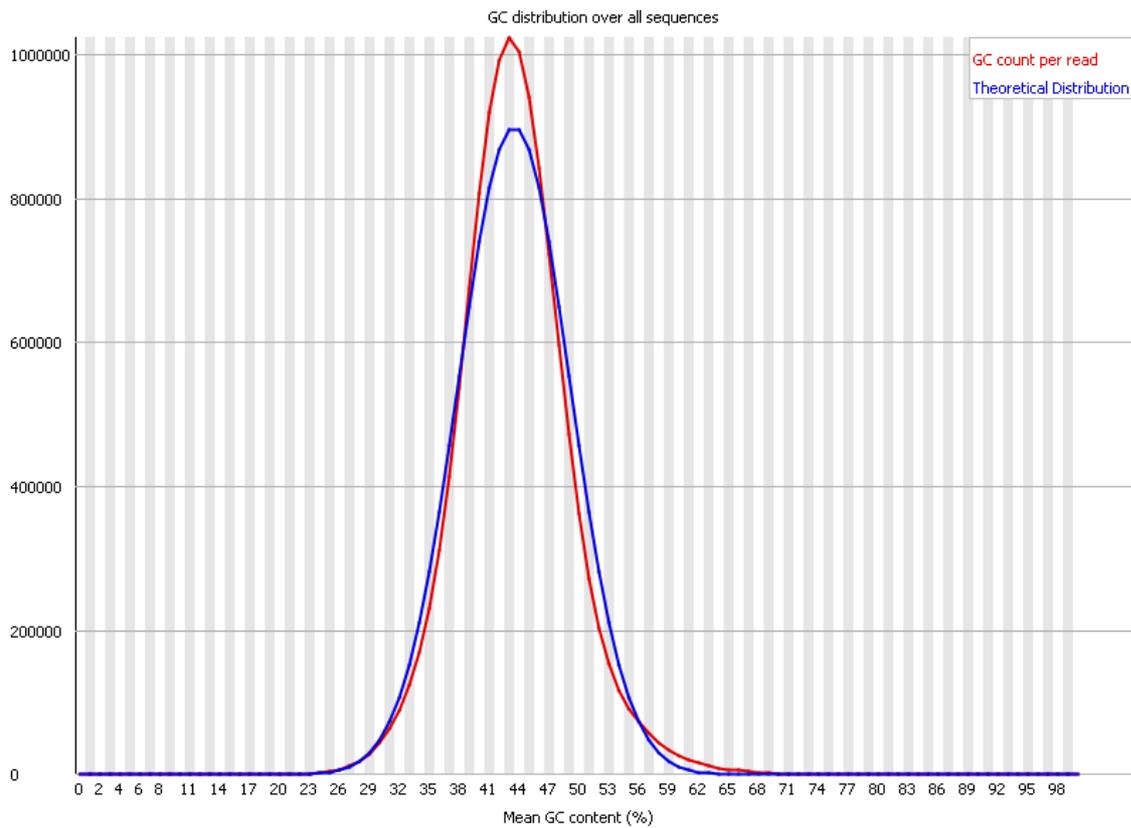
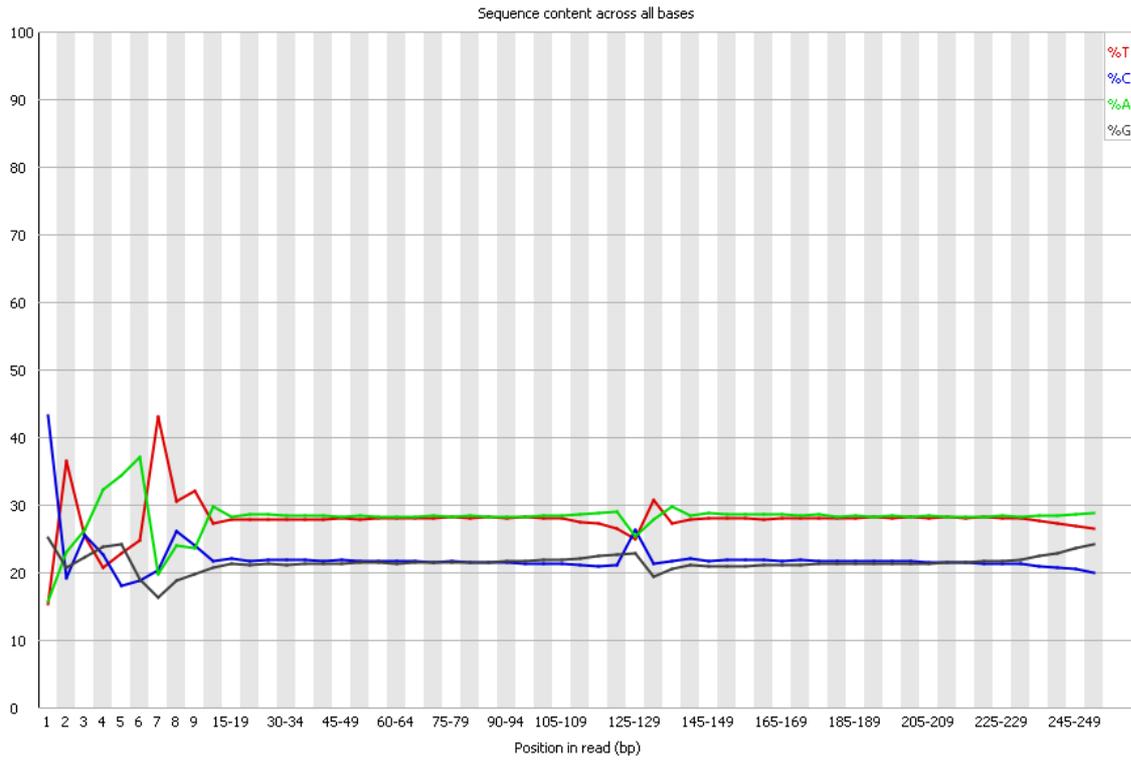


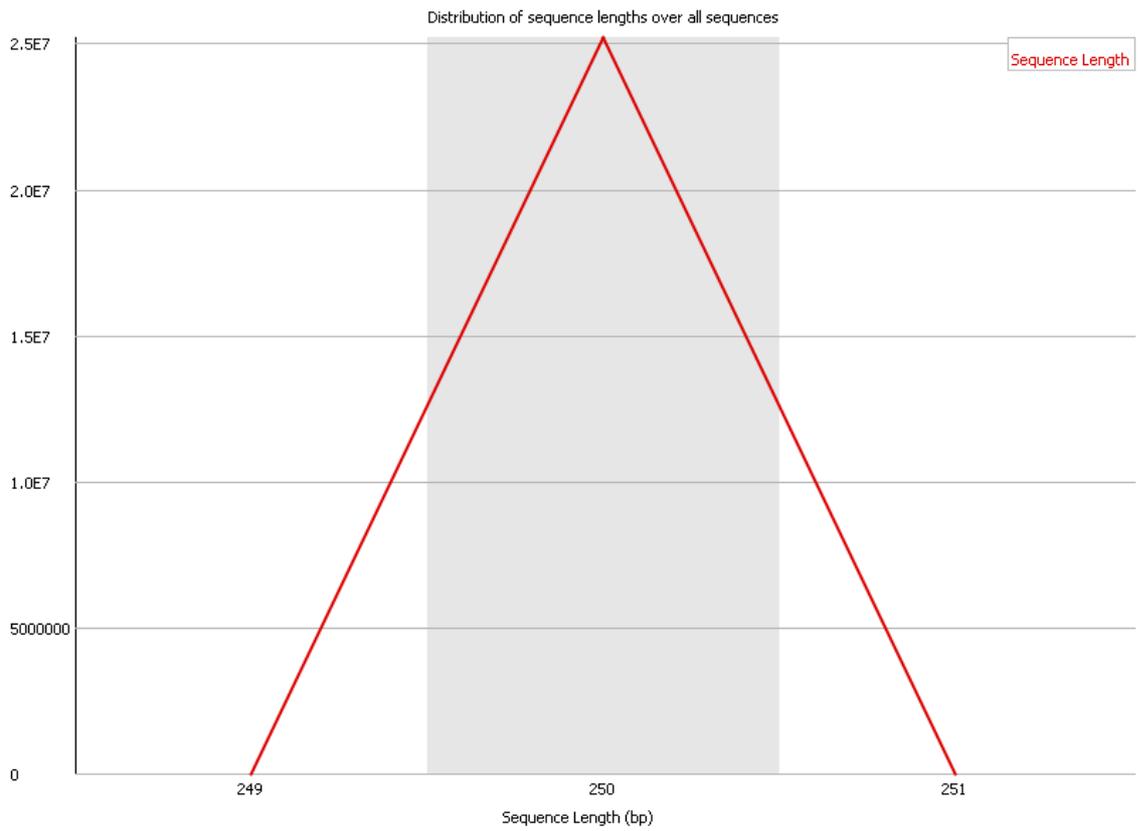
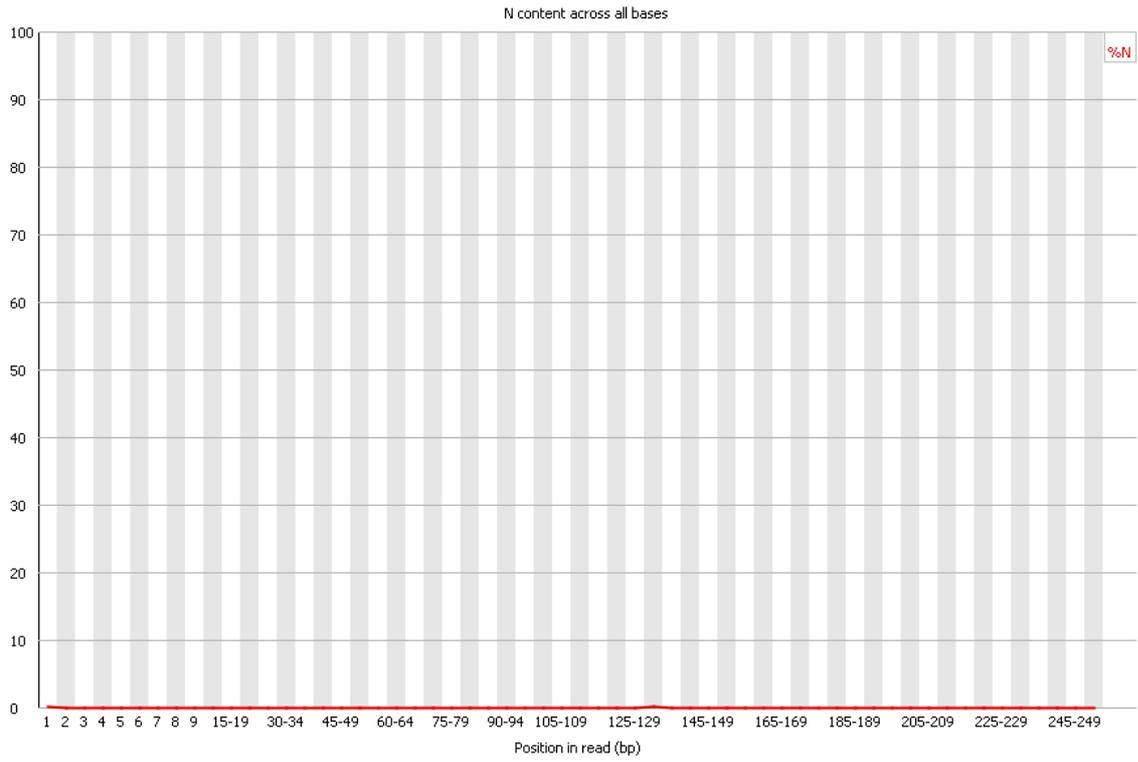


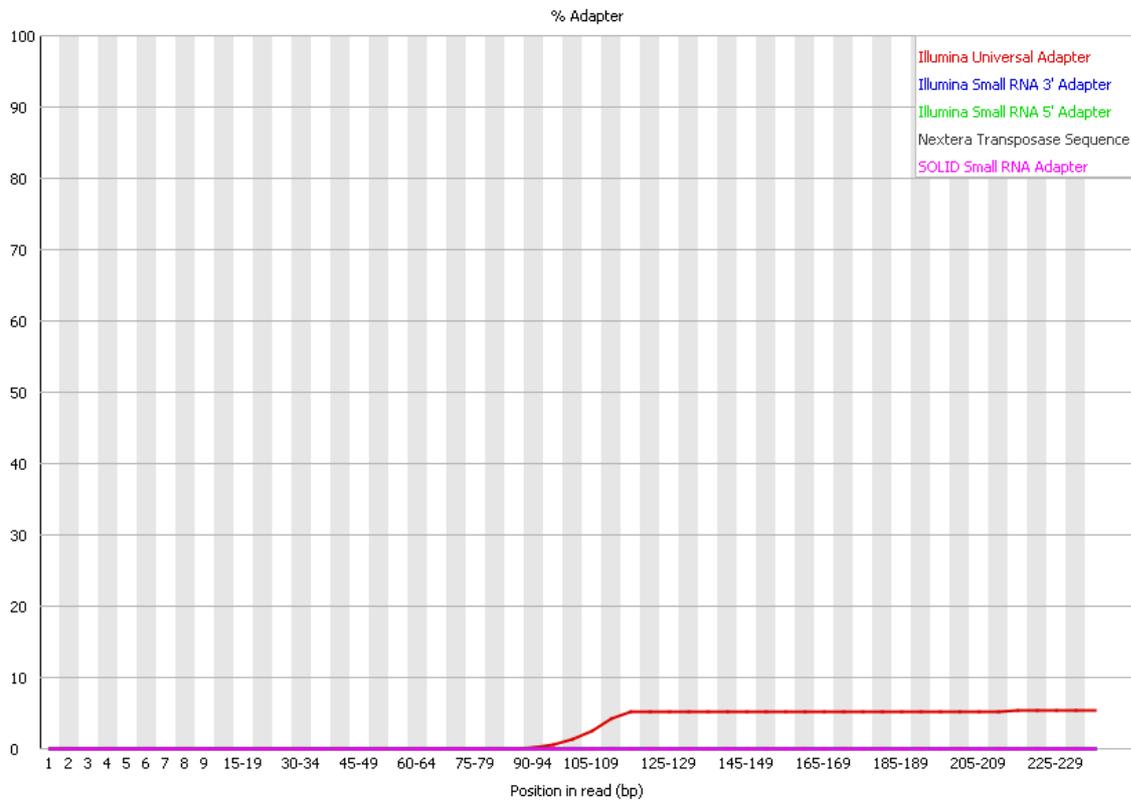
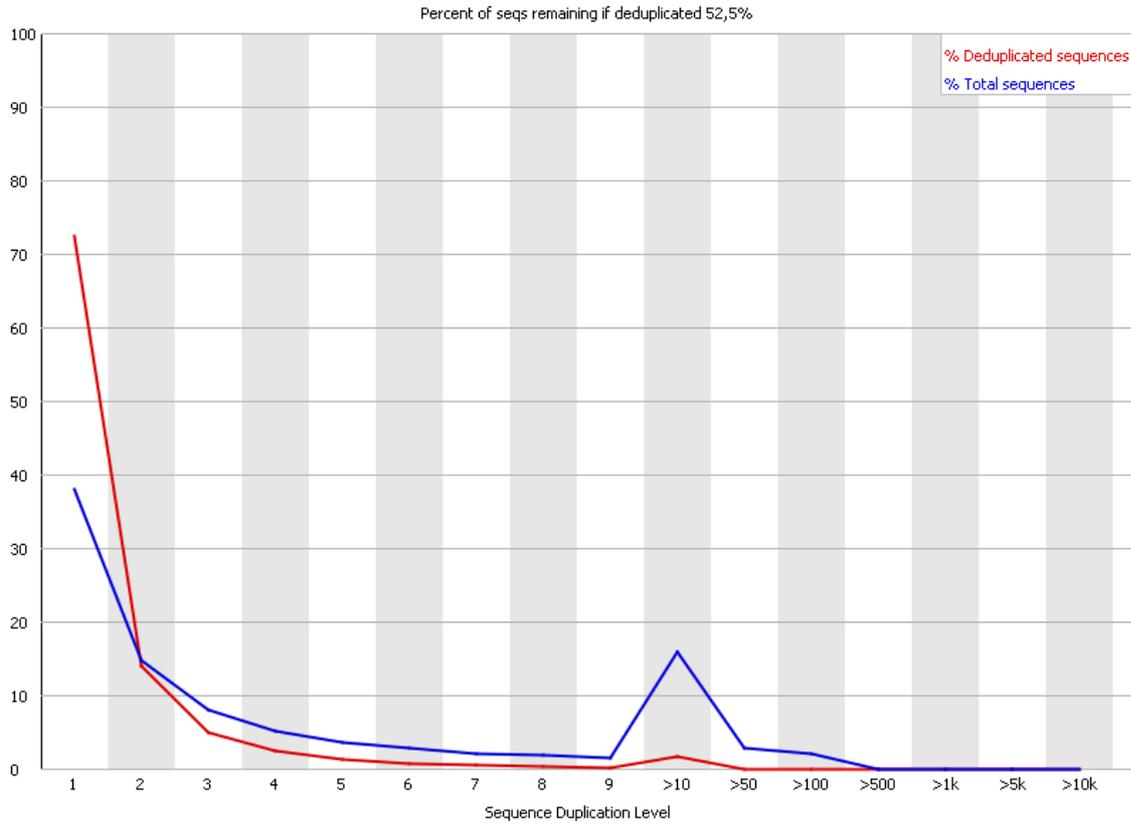


Anexo 4 Parámetros de calidad FASTQC para el archivo de secuenciamiento SRR3423051

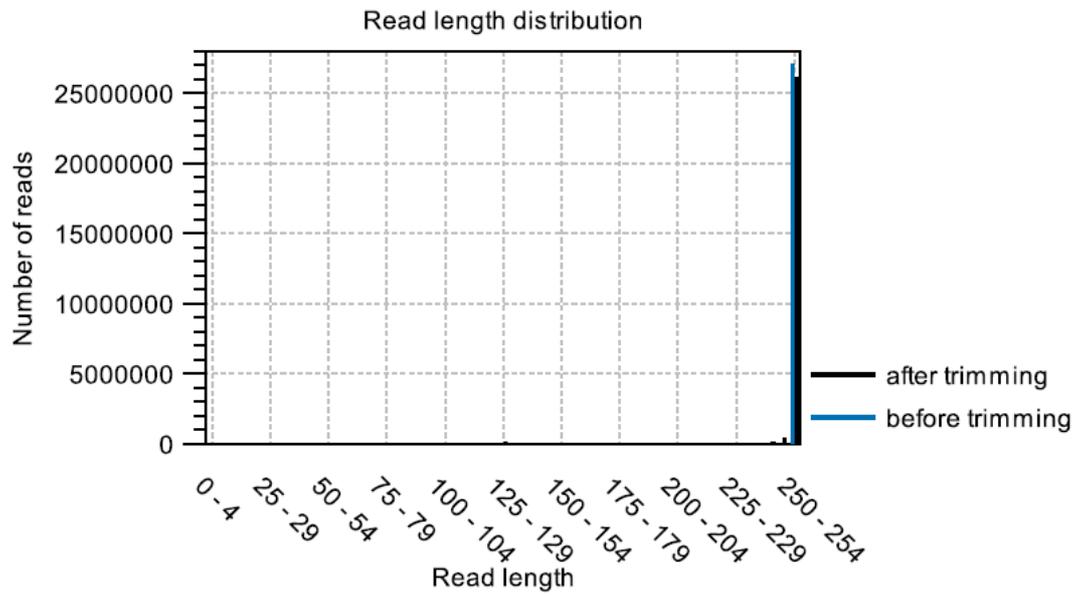




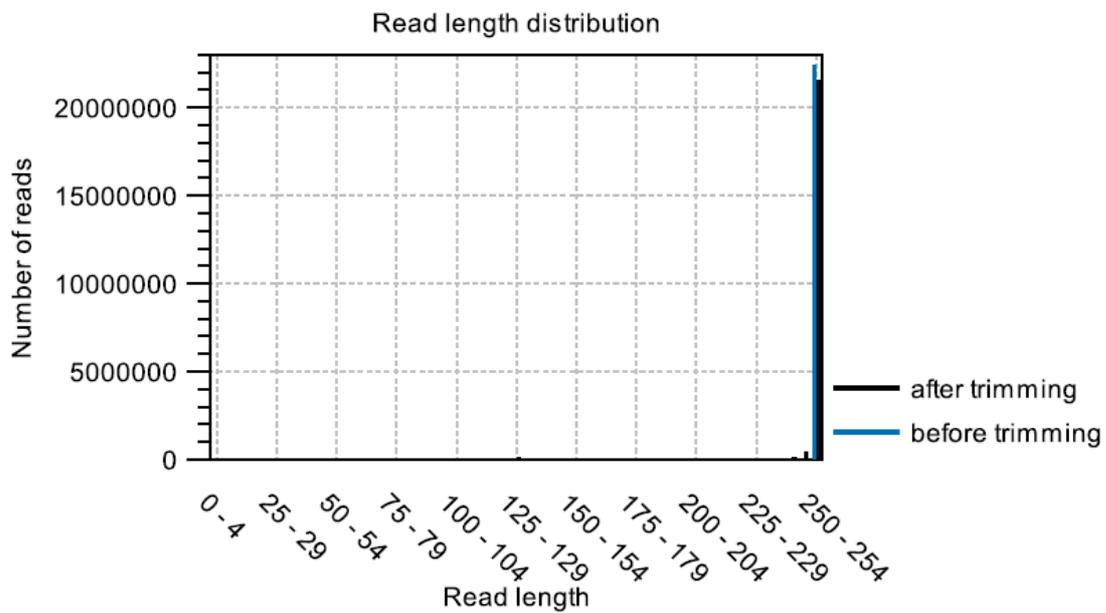




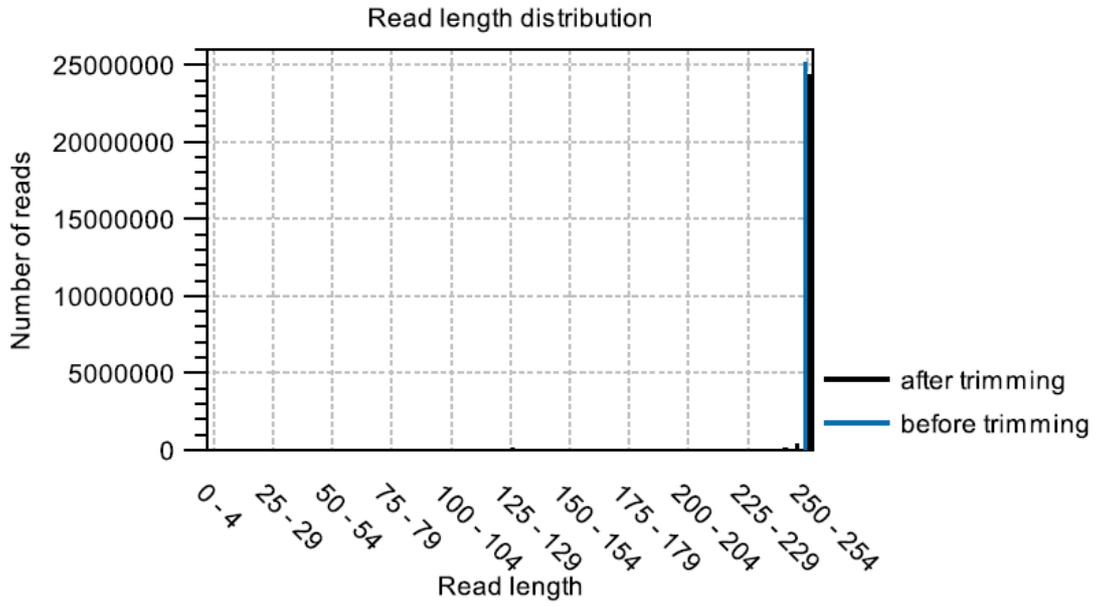
Anexo 5 Tamaño de secuencias antes y después del recorte de calidad de la librería SRR3423049



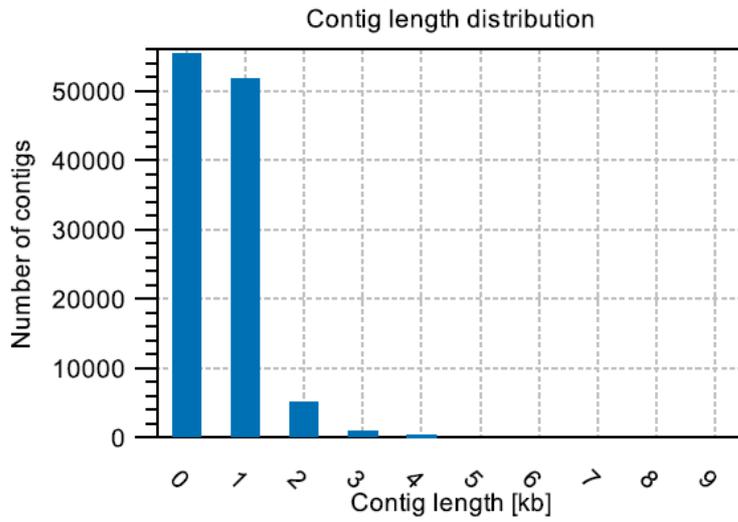
Anexo 6 Tamaño de secuencias antes y después del recorte de calidad de la librería SRR3423050



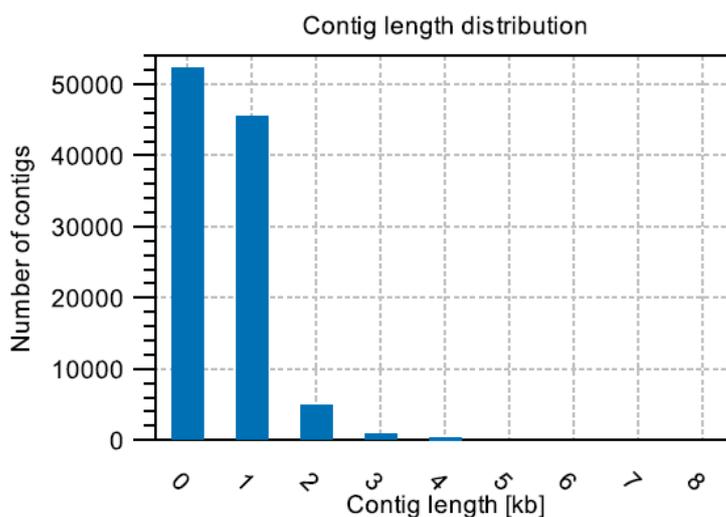
Anexo 7 Tamaño de secuencias antes y después del recorte de calidad de la librería SRR3423051



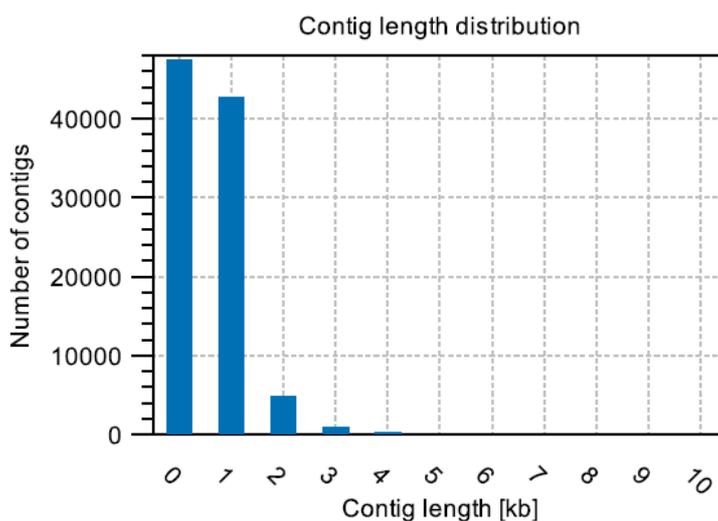
Anexo 8 Distribución de contigs de la librería SRR3423049 acorde al tamaño



Anexo 9 Distribución de contigs de la librería SRR3423050 acorde al tamaño



Anexo 10 Distribución de contigs de la librería SRR3423051 acorde al tamaño



Anexo 11 Transcritos homólogos para los genes en estudio y sus parámetros BLAST

Gen	Assembly	# Contig	E-value	Bit score	Identity (%)
<i>UBC</i>	SRR3423051	3519	5.42e-160	547.71	97
<i>PTB</i>	SRR3423051	889	0.00	1101.34	96
<i>HEL</i>	SRR3423049	18779	0.00	3562.94	96
<i>LOX2</i>	SRR3423049	2708	0.00	986.48	58
<i>AOS</i>	SRR3423050	2207	0.00	663.68	64
<i>EBOS</i>	SRR3423051	5323	3e-112	331	45
<i>PI2</i>	SRR3423050	8199	1.08e-9	43.90	32

Anexo 12 Secuencias de los transcritos de mayor homología. Subrayado se encuentra la región homóloga dentro del transcrito y sobre las cuales se diseñaron los primers.

Assembly: SRR3423051

No. Contig: 3519

Gen de homología: *UBC*

Secuencia:

5'

TTCTTCAGAATGAATTGAACTGCGAGATCGGACGAAGTTCAATTCATTCTGAAGAAGATAATTT
TACATTTTGAGCATAATATCCACTATGCAGGCTTCTAGGGCAAGGCTTTTCAAGGAGTACAAAG
AGGTGCAACGAGAGAAATCAGCTGATCCCGATATTACTCTTGTCTGTGATGATTCCAACATTTTT
AAATGGAATGCACTTATCAAGGGACCCTCAGAGACTCCTTTTGAGGGAGGTGTCTTTCAGCTTG
CCTTTTCTGTTCCAGAGCAGTATCCTCTACAACCACCCCAAGTCCGATTTTTGACCAAAATATTI
CACCCAAATGTGCATTTTAAGACAGGGGAGATTTGTCTAGATATCTTGAAAAATGCTTGGAGCC
CAGCTTGGACGCTTCACTGTATGTAGGGCTACCTGAATTACAATTCGATGGCCTGTCAGGTTT
GGGATGGGCCATCAAAGCAATTATAGCCCTACATACAGACTGAAGCGTCCAAGCTGGGCTCCA
AGCATTTTTCAAGATATCTAGACAAA 3'

Assembly: SRR3423051

No. Contig: 889

Gen de homología: *PTB*

Secuencia:

5'

GGTTGAAGAGGTAGACATCGATTCCCTTCTATGTTATATATGATTTGGGGATGATATAATATTTG
GGATGATATGATATTTGGGAAAGAGTGAAGGAATCGATGTCTACCTCTTCAACCCAACAGCACC
AGTTCGGTTACACACAAACGCCGTCAAAGGTTCTTCATCTCCGTAACCTTCCATGGGAATGCAC
CGATGATGAACTTGTTTCATCTTTGTAACCCTTTTGGTAAAATCGTTAACACCAAATGCAATGTG
GCGCCAATCGCAACCAGGCTTTTGTGAATTCGCAGATCTAAATCAAGCCATTTCAATGGTTTCA
TACTATGCTTCATCTTCGGATCCGGCTCAGGTTTCGAGGCAAAACCGTTTACATTCAATATTCTAA
TAGACATGAAATTGTTAACAATAAAAAGCCCTGGAGATATCCCCGAAATGTCTTGCTGGTAACC
ATTGAAGGTGTGGAAGCTGGAGATGTGAGCATTGATGTTATCCACTTGGTGTTTTCTGCATTTGG
TTTTGTACACAAAATTGCTACATTTGAGAAGACCGCAGGTTTCCAGGCTCTGATTCAGTACACTG
ATGCTGATACTGCTGCTGCGGCAAGGAATGCACTGGATGGAAGAAGCATCCCTAGATACCTGCT
TCCGGAGCATGTTGGTTCTTGTCAATTTGCGTATTTCACTACTCTGCACATAGAGATCTCAATATCA
AATTTCAATCTAATCGCAGCANN 3'

Assembly: SRR3423049

No. Contig: 18779

Gen de homología: *HEL*

Secuencia:

5'

CTGTTGTTCCATCAGAAGGCCAAACCATTAGCTAAATAGCCTTCGGCATCACATGTAGATTCTTCT
TTAGAGCAACCCAAGGGCTCATAACTAGTAGATGCTTCTTCGGATACAGAGCTGGAACCTTGTTT
GCCTTCTGATGGAACAACAGTTGATATAAGTGATATAGAGCACCATAGCATGGAGGAGAATGTT
GCTAAGTCCAACCTGCCAGTTTTAGATGTTGAAAAAGATTATACTGAAGGAGAGGCTGTAGATA
TAGAGCTTGGTGATTTCTTCTTGAGGGTGTGCCATCTAAGGAAACATTACCTCCTGATATTTG
CAAGTACAAATGCAAGAAAAAACCAAGAGACAATATGAGAAGAATCTGGATAAGCTAGAAGG
CATTTGGAAGAAGGGGGACCCCAAAAGATTCCAAAGGCTGTGCTTCACCAACTATGCCAGAA
ATCAGGGTGGGAAGCTCCAAAATACCATAAAATTCTTGGCAGGGGAAAGAGTTTCTCCTACAGT
GTAAGCATACTGCGTAAAGCTAGTGGGAGGGGCAAGAACCAGAAAAGCTGGGGGACTGGTCACT
CTTAATCTTCCAGATCAGAATGAAACATTTGAATCTGCTGAGGATGCACAGAATAGAGTGGCAG
CATATGCTTTGTTCCAACCTGTTTCTGATATTCAGTTTCAATTTCCCAATTTTCAGAGCCTTATGCTT
TGCTTGTTAAGAAGTGGATGGAAGGGGAATCATTAACCAAGTTAGAAGACAGTGAGAAAGATC
ATAGGTCTGGTTTTGTGGATTCGTTATTAACCGTGATGGTTTTGGTGGCAGCCGAGTCTGTTGAA

TTTTTCAGATTATAGGCTTCCACATAACTTTGATGGACAGTATGAAAAGAAACATTCAATCCTTGC
 CAATCATCAGCCATTTCCCCAGAGAGAAACCTATAGCAAGGAAATGGAGAGTACTTGTGGAGG
 CAAGCGCAAGATAATAAAATGAGAACACAAAGATACCAGGATATGTTGAAAATTAGAGCTAGA
 CTTCTTATTGCTGCACTGAAGGGTGTATATTTGCAAATGCTGAAGGAGTATGACGTTCTTGTGT
 TTGTGGGGAAACGGGCTCTGGAAAGACAACCTCAGGTTCCACAATTTATATTGGATGACATGATT
 GAATCAGGACGTGGTGGACACTGTAATATTGTATGTACACAACCAAGGCCAATAGCGGCTATTT
 CCGTGGCTGAAAGAGTAGCGGATGAGCGGTGTGAACCTTCACCAGGTTTCCAGATGGTTCTGTGAC
 TGGTTATCAAGTTCGCCTTTATAGTGGCAGGAGTGAGAAAACAAGGCTTCTGTTTTGTACAACA
 GGCATCCTGCTGAGAAAATTGATGGGGAAACCGAAACTTGACTGGCATCACTCATATCATAGTTG
 ATGAAGTTCATGAGAGGTCTCTACTGGGGGATTTTCTTCTAATAGTTTTGAAGAATCTTATCGAG
 AAGCAGTCCTTTGAAGTTGTACAAAACCTGAAGGTCATTGTAATGTCTGCGACTGTTGATTCAA
 GTTTATTTTCAAGATACTTTGGTCATTGTCTGTAGTTACAGCAGAAGGCAGAACTCATCCAGTG
 ACAACACACTTTCTTGAGGATATATATGATCAGATAAGTTATCGTCTTGCTTCAGATTCTCCAGC
 TTCTTTAGCAAATGACTCATTTCCCAAAGAACAGAATTTTCAGAGAGGTTACTGTGACAAATAGC
 CGGGTGAAGAAGAGTCTTGCCTTATCTGCTTGGGGTGTGAATCCATGCTTTCTGAAGAACACA
 TCAATCCACATTTTGTACAAGTTATTATCAATCATAACAGTGAACAAGCCAGAAAAATCTGAA
 ACGATTGAATGAGGATGTCATTGATTATGATCTACTTGAAGATCTAATATGTTTTATAGATGATA
 CTTGCGGTGAGGGTGCCATCCTTGTGTTCTTACCTGGAGTGTCTGAAATAAACCTTTTACATGAT
 AATTTGGCTGCTTCATACCAATTTGGCGGGCCATCTTCTGAATGGATTATCCCTTACATTCATC
 AGTCCCATCAAGTGAACAGAAAAGGGTGTTTTTACGACCTCCAGGAAATATACGTAAGGTTGTA
 ATAGCCACAAATATAGCAGAGACCAGCATAACAATAGATGATGTCATATATGTAATTGACTGTG
 GAAAACATAAGGAGAGCCGATATAATCCGCAGAAGAAATTATCTAGCATGGTTGAAGATTGGA
 TATCTCAAGCAAATGCAAGGCAGCGTCTGTTAGAGCTGGACGTGTCAAACCTGGAATTTGCTT
 TTGCCTGTACACACGTCATAGGTTTGAAGACTCATGCGTCTTATCAGGTTCCAGAGATGCTTC
 GGATGCCATTAGTTGAATTATGTCTGCAGATTAAGCTGCTGTCTCTTGGTTATATCAAGCCATTT
 TTGTCTGAGGCTATAGATCCTCCCAAGGTTGAAGCAATGAGTTCAGCAATATCCTTATTGTACG
 AGGTCGGTGTCTCTGGAAGGGGATGAAACGTTGACACCTCTCGGGCATCATCTGGCAAAGCTTCC
 TGTGATGTATTAATCGGAAAGATGATGCTTTATGGTGCAATATTTGGTTGCTTGTGCGCCTATTC
 TTTCAATTTCTGCATTTCTAAGCTACAAGTCTCCATTTGTGTATCCAAAGGATGAGAGGCAAAAT
 GTTGAAGAGCAAAATTAACCTTTGTTGAAGGATAAGCTTGTATGGGCCTGGTGTGCAAATGACA
 TTGATCAGCAATCTGATCACCTATTAATGATGACTGCCTACAAAAGATGGGAGAGGATTTTTAC
 TGAG 3'

Assembly: SRR3423049

No. Contig: 2708

Gen de homología: *LOX2*

Secuencia:

5'

ATCTAAGTTTGTGGCATAAAGCATCTTTGCTGCTTCTATAATCTATATGTATTTGGGTTAGAGTGT
 GCAAAGTGGA AAAAATACTTTATATACTGATGAGGAGTGAAGTTAGACAAGGCTATTGCTTATCT
 AAGCAATAGCCTTGTGTAACCTCACTCCTCATCAGTATATAAAGTATTTTCCACTTTGCACACT
 CTAACCCAAATACATATAGATTATAGAAGCAGCAAAGATGCTTATGCCACAACTTATCTATCA
 AATTCAAATCCTTCACCTAGTTGTGTCGCTCACATACTTAAAAAGACATGCCTCCATGGCTCTAG
 CTATTATCCTTCTTTTCAGGTTGGGTCAAGGCCATGGTTCCAAAACAAAAGAAGTGAACAAG
 GCCAGAAATGGGTGCAAAAATAGCAGTAATAAAAATAAAAGCTGTGGCTGTGAGTGAAGAAGGA
 GAAACGAATACAATAGAGGTTAAAGCTACCATAACTGTTTCCAGGAAACAGTTGGTGGATTTTCT
 CAGGTTTGGGTTTAGACCGAGGAGCCGATGATATTACCGATTTACTGGTAAATCATTGCTCTTG
 GAGCTTGTTAGTACCACGCTTAATCCCAAGACGAAGGAAGAGAAAAGAAAGCATCAAAGGTTTC
 GCGCACAGGAGATTTCAATTAGGAAACAAAGTGAAGTACGAGGCTAAATATGAAGTCCCACGT
 AGCTTTGGTGAGATTGGAGCCATTTTTGTGGAAAATGAGCATCACAAAGGAAATGTTTATCACTG
 ATGTTGTGTTTGAAGGCTTCCCCACTGGTCCAGTTCATATATCATGCAACTCTTGGGTTCACTCC
 AAATTTGATAACCCTGCCAAGAGGGTTTTCTTCTTCAACAAGTCGTATTTGCCATGCAAAAACACC
 GGAAGGATTGAAGAGAATAAGGGGAGAGAAATTGGCAGAATTGAGAGGGAATGGAGAAGGTA
 AAAGGAAGAAGTTCGAGACCATATATGATTACGATGTATAACAACGATCTTGGAAATCCAGATA
 GTAACATCAAACCTTAAGAGACCAGTCTGGGTGGCAAAAACAAATCCTTATCCTCGCCGTTGTAG
 AACCGGAAGACCTCGCACCAAGACAGATCCATTGTCTGAGGAAAGAAGTACCCGATGATGATGT
 TCCAAGAGATGAATGTTTCTCAGAAATAAAGCAGCTAACGTTTTCTGCAAAGGCTGTATACTCG
 GTGTTGCATGGTCTGGTTCCATCTCTGCAGACATCTTCATTGACAAGGAACGTGGGTTTCCCGT

CTTCTCAGCCATAGATAACTTATTTTCATGAAGGGGTTCACTTGCCTATGTTAAAAGGCAAAGGT
 CTTATTAGGAGCATTTTACCAAGATTAGTTAAGGTTATTAAGGAAATCAATATCCTCCGTTTTGA
 GACTCCACCAACAATGGATAGGGACAGATTCTTTTGGTTTAGAGATGAAGAATTTTCAAGACAG
 ACCCTTGCAGGCCTTAACCCATGTTGCATTGAACTCGTCACGGAATGGCCATTGAAAAGCAAAC
 TTGACCCTGAGATATATGGCCCAGTGAATCTGCAATCACCCTGAAACAGTTGAGCAGGAAAT
 CAAAGGATTCATGACTCTTGAAGAGGCCATAAAACAGAAGAAATTGTTTCATCCTGGACTACCAT
 GATTTGTTATTGCCAGTAGTAGAGAAAGTTAGAGAAGTTGAAGGTACAACCCTGTATGGATCTA
 GGACATTGTTCTTCTAAACAAGGATAGCACATTGAGGCCGCTAGCTATTGAGCTCACTCGGCC
 ACCGATTAATGGAAAAGCCGAGTGAAGGAAGTGTTCACCTGCTTGGCACTCTACCAGTGTT
 TGGCTTTGGAGGCTTGCCAAAGCTCATGTCTTGGCCACGACTCTGGTTACCATCAACTCGTTAG
 TCACTGGCTAAGAAGTCAATTGTGCTACAGAACCCTATATCATCGCAGCAAACAGGCAATTAAGT
 GCAATGCATCCAATCTATAGGCTTTTGCATCCACATTTTAGGTACACAATGGAGATCAATGCTCT
 TGCTCGTGAGGCATTGATAAATGCAAATGGAACCATAGAGACCTGCTTTAGTCCTGGGAAGTAT
 TCCATCCTACTAAGTTCAATTGCTTATGACAAGCAGTGGCAATTTAACTTGCAAGGCCTTCTGCT
 TGACCTTATCAATAGAGGATTGGCCGTTGAGGATCCTAATTCTCCTCATGGTTTAAAGCTAACCA
 TAGAAGATTATCCTTAGTCCAATGATGGCCCTCGTCTTTGGGACATAAATCAAAGGATGGGTGCT
 AGATTATGTGAACCATTACTACTCAGAGCCAGGTCAGTTGACTCAGACGAAGAAGTACAAGC
 ATGGTGGGAAGAGATCCGAACCGTAGGCCATGGTGACAAGAAGGATGAACCATGGTGGCCTGT
 TTTGAAAACAAAGAAGATTTGGTTGAAATTTTGACCACTATTGTGTGGATAACATCAGGGCAC
 CATGCGGCTGTGAACCTTTGGCCAATACCATTATGCAGGGTATTTCCCTAACAGGCCACCATGG
 CAAGACGCAACATGCCTACAGAGGACCCTTCAGACCCAGAATGGGATTTTTTCATGCAAAAACC
 GGAAGCGACGCTGTTGAATACCTTCCCATCTCAAATTCAGGCCACAACCTGTAATGACAGTGTTG
 GATATATTGTCCACTCACTCACCCGATGAAGAATATCTTGGGGAAACCTTAGAGCCAGCTTGGG
 CAGAGGATCCAATAGTCAAAGCTGCATTTGAAAAGTTTAAAGGGGAAGTTGATGGAGCTGGAAG
 GTATAGTTGATGAAAGAAATGCAGATAGGACGCGGAAGAACAGATATGGTGCTGGAGTTGTGC
 CTTATGAGCTTCTGAAGCCGAATTCAGAGCCAGGAGTACTGGAAAGGGAGTCCATATAGCAT
 TTCTATTGAGAATGTTAGCATAAAATGTATCAAGGTAATTTACCAGCATATCCAGGTTGAAA
 TCCATAATATGCAGGCACAACCGCATGGGTACATATGTTACATTTTAGCTTATACAACACTCAG
 AAGTGAGATATTCTTGTACTGAAGAACTTTTTAATTGGCCACATAACATTTATGCATGAAAACG
 AGTCTCGGGTTGTAACACCCAGCTTTAACATGCGACCCCTCAAAGTTGTTAGGTTTTTTAAATA
 GTGATGTAATATTGTTAAGTAGTTATGTGATATTTTATTGTTAATTATCACTGTGATTACAATTAT
 AAAAAGTGTAATTACATTTTAAAATACATCACTATTTAAAAAACCTA 3'

Assembly: SRR3423050

No. Contig: 2207

Gen de homología: AOS

Secuencia:

5'

CTCGATTTCCATGATGGAGGTCATTTTCAAATTTCAAGTGGTCTCTCCACTCTATAAATAAGAG
 GTCCAAGAATCATAGGAATCACTCATGAAAATATCAACATTATCTTCTCCATTTTTATCAACACT
 TGTAAGTTCTAACCCAAAAATGGCTTCATTGACTTGTGTATCTTCTCATTTCCTCCAAGTAAAT
 TCCCATCAGCTAAAAAACCTTCCAACCGTTCTTCCACATGCACATTCAAATCAACAGCACCGAT
 CAAAGCCACACTCTCTGAAACGTCGTCGTTTTTCATCACTTCCACCAACACCAAAAACCCACCCAA
 CTTCCATTACGTGAAATCCCTGGAGATTATGGCTTCCCTATTGTGGGTCCCATCAAAGACCGTCT
 CGAATATTTCTACAGCCAAGGTGGTTCGTGATGCCTTTTTCACTTCCCGTGTTCAGAAATATCAAT
 CAACCGTTTTTCGCGCCAACATGCCACCGGGTCTTTTCAATTTCTTCTAATCCCAACGTCGTCGTTT
 TACTCGACGGTAAAAGCTTCCCCATTCTCTTCGACGTTACCAAAGTAGAGAAAAAAGACTTATT
 CACCGGAACTTTTCATGCCCTCTACTAAACTCACCGGCGGTTACAGAATCCTCTCATACCTCGACC
 CTTCTGAACCAAAAACAGAAAAACTCAAAAAGTTAATATTTTTCCACCTTAGATCTCGAAGCAA
 CAACGTCATTCCAGAGTTTCATTCAACCTACACAACCCTCTTCGATTCTCTCGAAAAAGAAGTTT
 TTGCTAACGGAAAAGTGGACTTCGGAGAAAAACATGATCAAACCGCGTTTAACTTTCTAGCTCA
 ATCTCTTACGGTACAAACCCTAAAGACACGAAACTAGGAAGTGACGGTCCGAGAATAATAAC
 TAAATGGGTTTTGTTTCAACTCAGTCCTATTTTAAAGTTAGGACTTCCGAAGCTTCTAGAAGATC
 CCATCTTTCATTTCGTTCCGTTCTCTCCATCACTCGTAAAGAAAGACTACGAGAGACTCTATGAA
 TTCTTTTACGACTCGTCAGGGTTCGTTTTTGAAGAAGCAGAAGCTTAAAGTATTGCAAAAAGAA
 AAGCGTGTACATAATATGTTATTCGCCACGTGTTTTAATACCTTCGGTGGAAATGAAAATCTTTTTT
 CCAACGTCGCTAAAATGGATTGCAACTGCAGGGGTTAAACTTCACGCTCAGTTAGCAGAGGAG
 ATAAGATCCGTCGTTAAATCTAACGGCGGTGAAATAACGATGGCGGTAACGGAAACAAATGCCG

TTGATGAAATCAGTGGTATACGAAGCGTTCGGTATTGATCCACCAGTTCGGTTACAATACGCAA
AAGCGAAAGAGGATTTGGTTATAGAGAACCATGAGAACGCGTTTAAAGTGAAGAAAGGGGAA
ATGTTGTTTGGGTTTCAACCATTTGCGACGAAAGATTGTAAGATATTTGAGAAGGGTGAAGAGT
TTGTTGGAGATAGGTTTGTGGGTGAAGGAGAAAAATTGTTGAAGCATGTGCTTTGGTCTAATGG
ACCTGAAAATGAAAGTCCCTCTGTTAGTAATAAGCAATGTGCTGGTAAGGATTTTGTGGTCTTC
ATTTCTAGACTTTTTGTTATTCACTTGTTTCTTCGGTATGATTCCTTTCAGGTTCAAGTGCAAAAT
TCACCTTTGGGTTCTTCAATTACCATTACCTCTCTTAAGAGGGCAACA ACTTAATGTAAAAAGA
TAAATTATTTGTTGATATGAGTAGATATTTGATGCATATGTGATATGTAAGATTTCCATTATTT
ATTTTAGTTGTTTCTCACCTTACATATCACATATGCATCAAAATATCTACTCATATCAACAAATA
ATTTATCTTTTTTACATTAAGTTGTTGCCCTCTTAAGAGAGGTAATGGTAATTGAAGAACCCAAA
GGTGAATTTTGA 3'

Assembly: SRR34230515323

No. Contig:

Gen de homología: *EBOS*

Secuencia:

5'CTGCATTATATTGAAATAAGTGGATCCCTCCTCTTCAAAAGATTGTGTAACAACCGTTTGGGA
GAACCAGCACCTCTCAAGAGAAAAATGCATCCTTCTCGTAAATGATGCATTGAGTGCATTAT
CTATTTAAATGTTTAAAACATGTTATCAATATATTGACCGTAAAAATTAATAATGCACTCAAT
GCATCATTTACGAGAAAGGATGCATTTTTTCTCTTGAGAGGTGCTGGTTCTCCCAAACGGTTGTT
ACACAATCTTTTGAAGAGGAGGGATCCACTTATTTCAATATAATGCAGGGTGAATCATACAAAG
AGCAAAGTAGAGTGCTAAGGGAAGAAGTTAGGATAATGCTTCCCAAAGTGTAATCATCTTG
ATCAACTTGAGCTCATTGATGTTCTTCAAAGGCTTGGAGTGGCTTATCATTTTTCCAACGAAATA
AGGAACATATTGGACAACATTAGTAACATGGATACACCAAAGGGAACAAGACTTTACATGCC
ACTGCACCTGAATTCAGACTCTTAAGACAACATGGTTATAATATATCTACAGATGTTTTTGTAG
CTTCTTGATGAAGCCGGTAATTTCAAGAAATACCACTCTTTTGGTGCTAAAGATATGTTATCAC
TATATGAAGCTTCATTTCAATTCATTTGAAGATGAAACTATAATGAATGAAGCAAGAGATTTAC
CTTGAATTTCTTAAAGAATATTTGACAAAGAATAAATGTAATCACCTATCACTCCTAACAAGT
CATGCTTTGGAGCTTCCATTACATTGGAGAATTGATAGATGGGAGGCTCAATGGTTCATTGATG
CATACAGAAGAATGGAAAACCGGAATCATTCTATAATTCAGTTAGCTATATCGGATTTCAATAT
CCTTCAAGCCATCTACCAAGAAGAGTTGAAATGTACATCAAGATGGTGGAAAAGAATTTGGGCTT
GCGGAGAAGTTGAATTTTGGCTAGGGATAGGTTGGTACAGAATTATGTTTGGACAATAGGATTA
AATTTAAACCAAATTTTGGAAATTTAGAGTAGTGCAGAAACAAAAGTCAATTCCTAATAACTAC
AATTGATGATATTTATGATGTCTATGGTACATTTGAAGAATTGCAACTCTTACGGGAGCAATTG
ACAGATGGGATCCCAAACCTATTGATAATCTCCACACTACATGAAAATATGCTTTCTTGCAC
CTATAACTCTGTCAACGAATTGGGCTATGAAATCCTAAAAGAGAAGGGTTGTTACATCACTCCA
TACCTAAAGGAAGCATGGACAGATTTATGTAATCATATTTGATAGAAGCAAAATGGTACCATA
AAGAATTTACACCAAGCCTTGAAGAATACATGGAGAATGCATGGATTTCCATAAGTGCACCGCG
CGAAAAGGAAACGGGATCTGTTTCTTTTCGCGCGGTGCACTTATGGAAATCCATG 3'

Assembly: SRR3423050

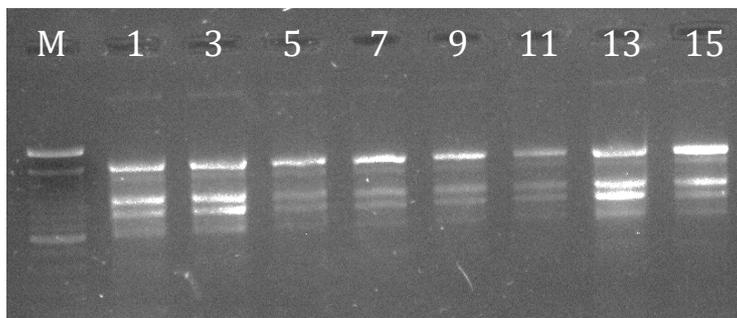
No. Contig: 8199

Gen de homología: *PI2*

Secuencia:

5'
CACGACGCTCTTCCGATCTGGTTGATCATGATCTCCCTCATCTTCTGCGGATCTGTCTAATCTG
GCTAGATTGGGCATAACAGGTCCTCTTAATCTGGTTAGCACGCCTCTTGGTGAAGCCAATACGT
GTGCTCTTCCGATCTATTGGCTTCTCCTTCTTCTTGTGCATAGTCTGTGGTGGAAATGATAATGGGA
GGGAATATGGAAACGGTGGATGATAACAATGTTTACAAATATGCTATGATGCAGCATAACATG
ACATGTCCATCTACAGCTGATGAACACCTCCCTCCTGCATGCAACTGTTGTATTGCATCAACTGG
ATGACTCTTACAACCTCTGATGGAACACTACTATTTGCACTGCTTCTTGAACCTTCAACATATAC
ACAGACACTTTTACTTGTAAATAATCATATCTTATAAATAAATGCTAATGATTGCAACACTTGAGAC
TTCTATGTCTCCCTTACATACATAAATATTAATAAATGGATCATTACTGCTATTTCCAATTCCT
TTCTAGTTCAATGCAAAGA 3'

Anexo 13 Corrida en gel de agarosa 2% de muestras de ARN de chocho andino. Se observan las fracciones 28s (más intensa) y 18s (menos intensa) y otras fracciones más pequeñas del ARN total como los tRNA



Anexo 14 Ct promedio, Tm, Eficiencia PCR y R² para los genes candidatos.

(ES=Early seedling, S=Seedling)

Variedad	Órgano	Tratamiento	Tiempo (h)	Estado fenológico	Gen candidato	Réplica técnica 1			
						C _T	T _m (°C)	E	R ²
I-451	Hoja	Agua	0	ES	UBC	27,40	78,87	2,44	0,96
I-451	Hoja	Agua	0	ES	UBC	25,34	78,87	1,65	0,96
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	UBC	30,33	79,07	1,41	1,00
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	UBC	26,20	79,26	1,52	0,94
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	UBC	26,20	79,05	1,87	0,99
I-450	Hoja	Agua	0	ES	UBC	29,98	79,21	1,51	0,96
I-450	Hoja	Agua	0	ES	UBC	31,21	79,32	2,18	0,89
I-450	Hoja	Agua	0	ES	UBC	26,45	79,19	1,84	0,95
CRIO LLA	Hoja	Agua	0	ES	UBC	26,98	79,20	1,87	1,00
CRIO LLA	Hoja	Agua	0	ES	UBC	27,51	79,11	1,26	0,87
I-451	Hoja	SA	0	ES	UBC	26,57	79,02	1,91	0,99
I-451	Hoja	SA	0	ES	UBC	26,33	79,08	1,73	0,97
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	UBC	26,33	79,20	1,75	0,99
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	UBC	29,97	79,45	1,39	0,89
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	UBC	27,10	78,98	2,05	0,97
I-451	Hoja	Agua	24	ES	UBC	26,24	79,09	1,64	0,96
I-451	Hoja	Agua	24	ES	UBC	25,36	79,23	1,80	0,94
I-451	Hoja	SA	24	ES	UBC	27,04	79,16	1,74	0,96
I-451	Hoja	SA	24	ES	UBC	25,96	79,10	1,63	0,95
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	UBC	27,64	78,98	1,61	1,00
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	UBC	26,50	78,77	1,76	0,95
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	UBC	27,14	78,65	1,47	0,98
I-451	Hoja	Agua	336	S	UBC	30,43	78,96	2,17	0,99
I-451	Hoja	Agua	336	S	UBC	25,82	79,24	1,46	0,94
Promedio para UBC (± desviación estándar)						27,34 ± 1,72	79,09 ± 0,18	1,74 ± 0,28	0,96 ± 0,04
I-451	Hoja	Agua	0	ES	PTB	27,41	77,18	1,91	0,95
I-451	Hoja	Agua	0	ES	PTB	27,75	77,28	2,00	1,00
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	PTB	24,85	77,39	2,20	0,91
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	PTB	25,33	77,40	2,07	0,97
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	PTB	26,42	77,15	2,21	1,00
I-450	Hoja	Agua	0	ES	PTB	25,16	77,35	2,10	0,97
I-450	Hoja	Agua	0	ES	PTB	26,06	77,53	1,97	1,00
I-450	Hoja	Agua	0	ES	PTB	27,85	77,47	1,74	0,93
CRIO LLA	Hoja	Agua	0	ES	PTB	30,30	77,06	1,77	1,00

CRIOLLA	Hoja	Agua	0	ES	<i>PTB</i>	30,68	77,60	1,80	0,98
I-451	Hoja	SA	0	ES	<i>PTB</i>	25,51	77,22	1,91	0,98
I-451	Hoja	SA	0	ES	<i>PTB</i>	25,29	77,26	2,00	0,93
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	<i>PTB</i>	24,69	77,28	1,92	0,96
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	<i>PTB</i>	24,37	77,38	1,81	0,97
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	<i>PTB</i>	24,33	77,49	1,78	0,99
I-451	Hoja	Agua	24	ES	<i>PTB</i>	26,39	77,21	1,73	1,00
I-451	Hoja	Agua	24	ES	<i>PTB</i>	24,39	77,12	1,37	0,99
I-451	Hoja	SA	24	ES	<i>PTB</i>	25,31	77,35	1,81	1,00
I-451	Hoja	SA	24	ES	<i>PTB</i>	25,64	77,41	1,99	1,00
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	<i>PTB</i>	25,85	77,09	1,92	0,96
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	<i>PTB</i>	26,97	77,00	1,85	0,97
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	<i>PTB</i>	29,56	77,11	1,96	1,00
I-451	Hoja	Agua	336	S	<i>PTB</i>	31,10	77,24	1,64	0,97
I-451	Hoja	Agua	336	S	<i>PTB</i>	32,38	76,97	1,58	1,00
Promedio para <i>PTB</i> (\pm desviación estándar)						26,82 \pm 2,35	77,27 \pm 0,17	1,88 \pm 0,19	0,98 \pm 0,03
I-451	Hoja	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	26,98	77,56	1,74	0,99
I-451	Hoja	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	28,20	77,57	1,60	0,78
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	31,79	77,67	1,82	0,99
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	26,18	77,60	1,60	0,97
I-451	Cotiledón	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	27,01	77,70	1,48	0,92
I-450	Hoja	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	26,95	77,57	1,88	0,99
I-450	Hoja	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	27,77	77,58	1,62	0,99
I-450	Hoja	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	34,47	77,42	1,87	0,96
CRIOLLA	Hoja	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	28,03	77,27	1,80	0,88
CRIOLLA	Hoja	Agua	0	ES	<i>HEL</i>	27,98	77,70	1,71	0,96
I-451	Hoja	SA	0	ES	<i>HEL</i>	27,34	77,39	1,51	0,89
I-451	Hoja	SA	0	ES	<i>HEL</i>	28,81	77,43	1,90	1,00
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	<i>HEL</i>	27,26	77,44	1,90	0,99
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	<i>HEL</i>	28,04	77,55	1,68	0,99
I-451	Hoja	MeJA	0	ES	<i>HEL</i>	28,20	77,54	1,34	0,93
I-451	Hoja	Agua	24	ES	<i>HEL</i>	27,62	77,21	1,55	0,98
I-451	Hoja	Agua	24	ES	<i>HEL</i>	33,38	77,00	1,84	0,99
I-451	Hoja	SA	24	ES	<i>HEL</i>	32,05	77,58	1,64	0,92
I-451	Hoja	SA	24	ES	<i>HEL</i>	26,45	77,38	2,20	1,00
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	<i>HEL</i>	26,57	77,35	1,94	1,00
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	<i>HEL</i>	27,79	77,24	1,51	0,93
I-451	Hoja	MeJA	24	ES	<i>HEL</i>	30,97	77,23	1,83	0,94
I-451	Hoja	Agua	336	S	<i>HEL</i>	32,91	77,89	1,82	1,00
Promedio para <i>HEL</i> (\pm desviación estándar)						28,81 \pm 2,45	77,47 \pm 0,20	1,73 \pm 0,19	0,96 \pm 0,05

Anexo 15 Ct promedio para el gen *UBC* entre factores

Muestra	Variedad	Órgano	Tratamiento	Tiempo (h)	Estado fenológico	Gen Candidato	Ct
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	27,40
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	25,34
25	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	30,33
27	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	26,20
29	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	26,20
Ct promedio para <i>UBC</i> entre órganos (\pm desviación estándar)							27,09 \pm 1,95
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	27,40
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	25,34
7	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	29,98
9	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	31,21
11	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	26,45
55	CRIOLLA	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	26,98
57	CRIOLLA	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	27,51
Ct promedio para <i>UBC</i> entre variedades (\pm desviación estándar)							27,84 \pm 2,05
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	27,40
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	25,34
3	I-451	Hoja	SA	0	Early seedling	<i>UBC</i>	26,57
5	I-451	Hoja	SA	0	Early seedling	<i>UBC</i>	26,33
13	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>UBC</i>	26,33
15	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>UBC</i>	29,97
17	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>UBC</i>	27,10
Ct promedio para <i>UBC</i> entre tratamientos 0h (\pm desviación estándar)							27,01 \pm 1,46
43	I-451	Hoja	Agua	24	Early seedling	<i>UBC</i>	26,24
47	I-451	Hoja	Agua	24	Early seedling	<i>UBC</i>	25,36
39	I-451	Hoja	SA	24	Early seedling	<i>UBC</i>	27,04
41	I-451	Hoja	SA	24	Early seedling	<i>UBC</i>	25,96
49	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>UBC</i>	27,64
51	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>UBC</i>	26,50
53	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>UBC</i>	27,14
Ct promedio para <i>UBC</i> entre tratamientos 24h (\pm desviación estándar)							26,56 \pm 0,78
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	27,40
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>UBC</i>	25,34
61	I-451	Hoja	Agua	336	Seedling	<i>UBC</i>	30,43
65	I-451	Hoja	Agua	336	Seedling	<i>UBC</i>	25,82
Ct promedio para <i>UBC</i> entre estados fenológicos (\pm desviación estándar)							27,25 \pm 2,29

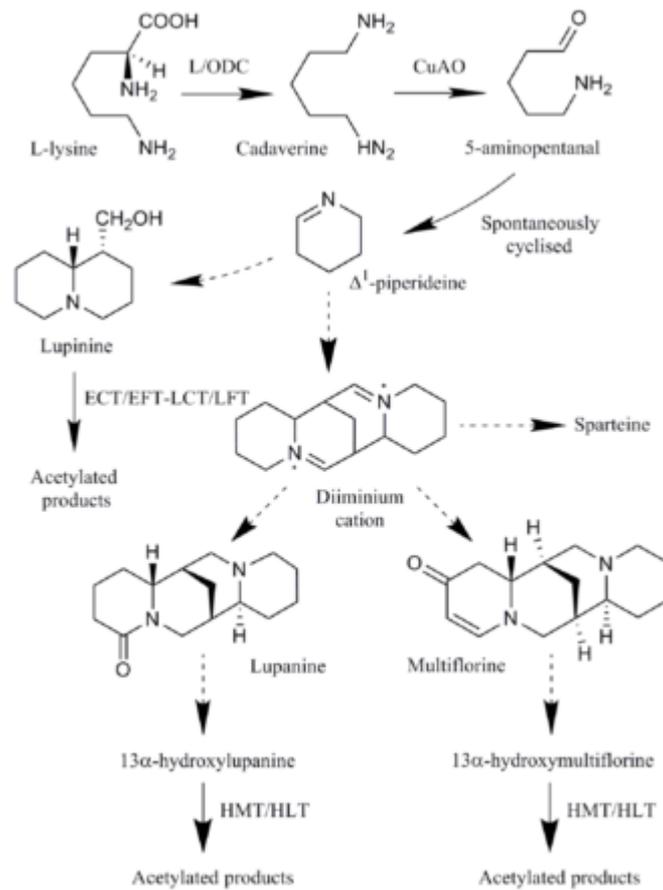
Anexo 16 Ct promedio para el gen *PTB* entre factores

Muestra	Variedad	Órgano	Tratamiento	Tiempo (h)	Estado Fenológico	Gen Candidato	C _T
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,41
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,75
25	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	24,85
27	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	25,33
29	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	26,42
Ct promedio para <i>PTB</i> entre órganos (± desviación estándar)							26,35 ± 1,26
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,41
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,75
7	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	25,16
9	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	26,06
11	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,85
55	CRIOLLA	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	30,30
57	CRIOLLA	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	30,68
Ct promedio para <i>PTB</i> entre variedades (± desviación estándar)							27,89 ± 2,03
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,41
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,75
3	I-451	Hoja	SA	0	Early seedling	<i>PTB</i>	25,51
5	I-451	Hoja	SA	0	Early seedling	<i>PTB</i>	25,29
13	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>PTB</i>	24,69
15	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>PTB</i>	24,37
17	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>PTB</i>	24,33
Ct promedio para <i>PTB</i> entre tratamientos 0h (± desviación estándar)							25,62 ± 1,41
43	I-451	Hoja	Agua	24	Early seedling	<i>PTB</i>	26,39
47	I-451	Hoja	Agua	24	Early seedling	<i>PTB</i>	24,39
39	I-451	Hoja	SA	24	Early seedling	<i>PTB</i>	25,31
41	I-451	Hoja	SA	24	Early seedling	<i>PTB</i>	25,64
49	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>PTB</i>	25,85
51	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>PTB</i>	26,97
53	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>PTB</i>	29,56
Ct promedio para <i>PTB</i> entre tratamientos 24h (± desviación estándar)							26,30 ± 1,65
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,41
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>PTB</i>	27,75
61	I-451	Hoja	Agua	336	Seedling	<i>PTB</i>	31,10
65	I-451	Hoja	Agua	336	Seedling	<i>PTB</i>	32,38
Ct promedio para <i>PTB</i> entre estados fenológicos (± desviación estándar)							29,66 ± 2,46

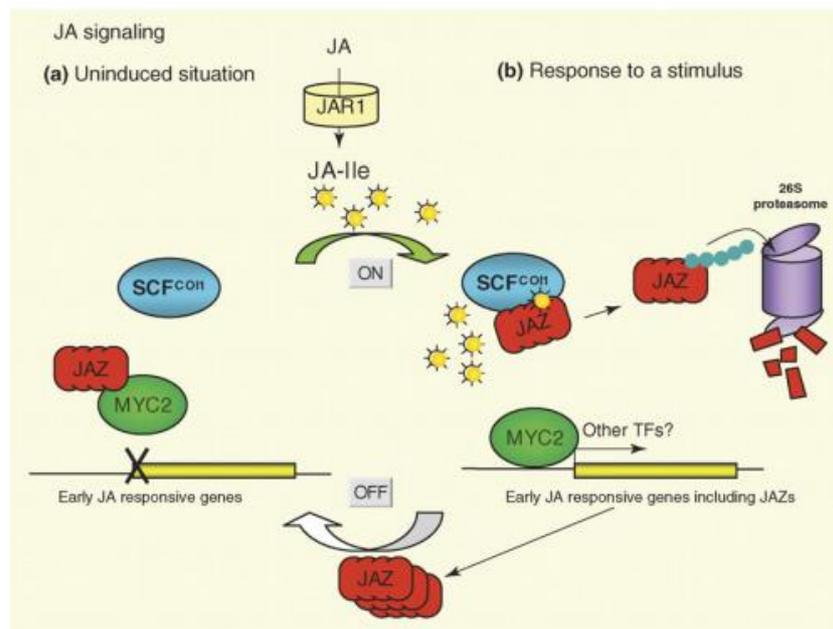
Anexo 17 Ct promedio para el gen *HEL* entre factores

Muestra	Variedad	Órgano	Tratamiento	Tiempo (h)	Estado Fenológico	Gen Candidato	C _T
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	26,98
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,20
25	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	31,79
27	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	26,18
29	I-451	Cotiledón	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	27,01
Ct para <i>HEL</i> entre órganos (\pm desviación estándar)							28,03 \pm 2,22
19	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	-
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	26,98
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,20
7	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	26,95
9	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	27,77
11	I-450	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	34,47
55	CRIOLLA	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,03
57	CRIOLLA	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	27,98
Ct para <i>HEL</i> entre variedades (\pm desviación estándar)							28,63 \pm 2,62
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	26,98
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,20
3	I-451	Hoja	SA	0	Early seedling	<i>HEL</i>	27,34
5	I-451	Hoja	SA	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,81
13	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>HEL</i>	27,26
15	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,04
17	I-451	Hoja	MeJA	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,20
Ct para <i>HEL</i> entre tratamientos 0h (\pm desviación estándar)							27,83 \pm 0,65
43	I-451	Hoja	Agua	24	Early seedling	<i>HEL</i>	27,62
47	I-451	Hoja	Agua	24	Early seedling	<i>HEL</i>	33,38
39	I-451	Hoja	SA	24	Early seedling	<i>HEL</i>	32,05
41	I-451	Hoja	SA	24	Early seedling	<i>HEL</i>	26,45
49	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>HEL</i>	26,57
51	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>HEL</i>	27,79
53	I-451	Hoja	MeJA	24	Early seedling	<i>HEL</i>	30,97
Ct para <i>HEL</i> entre tratamientos 24h (\pm desviación estándar)							29,26 \pm 2,82
21	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	26,98
23	I-451	Hoja	Agua	0	Early seedling	<i>HEL</i>	28,20
61	I-451	Hoja	Agua	336	Seedling	<i>HEL</i>	32,91
Ct para <i>HEL</i> entre estados fenológicos (\pm desviación estándar)							29,36 \pm 3,13

Anexo 18 Ruta de biosíntesis de QA (Frick, 2017)



Anexo 19 Ruta de biosíntesis y regulación del JA (Chico, 2008)



Anexo 20 Ruta de regulación de Auxinas (Chico, 2008)