

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS



**“REGULACIÓN GENÉTICA DE LA HOMEOSTASIS DE
HIERRO EN TARWI (*Lupinus mutabilis* S.) COMO PUNTO
DE PARTIDA PARA OBTENER ALIMENTOS
BIOFORTIFICADOS”**

Presentada por:

MIGUEL ANGEL VERA VEGA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

Lima - Perú

2024

PDCIB Miguel Angel vera vega

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

INDICE DE SIMILITUD

1 %

FUENTES DE INTERNET

1 %

PUBLICACIONES

1 %

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTE QUE CONTIENE COINCIDENCIAS

1

www.scielosp.org

Fuente de Internet

1 %

1%

★ www.scielosp.org

Fuente de Internet

Excluir citas

Activo

Excluir bibliografía

Activo

Excluir coincidencias < 1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS

**“REGULACIÓN GENÉTICA DE LA HOMEOSTASIS DE
HIERRO EN TARWI (*Lupinus mutabilis* S.) COMO PUNTO
DE PARTIDA PARA OBTENER ALIMENTOS
BIOFORTIFICADOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

MIGUEL ANGEL VERA VEGA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
PRESIDENTE

Dr. Gastón Zolla Benites
ASESOR

Dr. Jorge Jiménez Dávalos
CO-ASESOR

Dra. Rosa Espejo Joya
MIEMBRO

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara
MIEMBRO

Dra. Gabriela del Pilar Burgos Zapata
MIEMBRO EXTERNO

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 TARWI Y SU IMPORTANCIA	3
2.2 SITUACIÓN ALIMENTARIA EN EL PERÚ Y EL MUNDO	5
2.2.1 Importancia del hierro en la dieta alimentaria	5
2.2.2 Anemia y deficiencia micronutricional	7
2.3 BIODIVERSIDAD VEGETAL Y BIOFORTIFICACIÓN DE HIERRO	8
2.4 HOMEOSTASIS DE HIERRO	9
2.4.1 Absorción y asimilación de hierro en plantas	9
2.4.2 Transporte de hierro al interior de la planta	12
2.4.3 Almacenamiento de hierro en la planta	16
2.5 HIERRO Y SU COMPETENCIA CON OTROS MICRONUTRIENTES	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS ACCESIONES DE TARWI	20
3.2 IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS TRANSCRIPTOS ASOCIADOS A LA HOMOESTASIS DE HIERRO A PARTIR DE UNA DATA TRANSCRIPTÓMICA PREVIA HECHA EN TARWI	22
3.3 MECANISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA HOMOESTASIS DE HIERRO BAJO CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE ESTE MICRONUTRIENTE	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
4.1 EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS ACCESIONES TARWI	26
4.1.1 Caracterización micronutricional y morfológica de las semillas	26
4.1.2 Evaluación de la variancia ambiental (V_e)	29
4.1.3 Selección de las accesiones de tarwi	31
4.2 IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS TRANSCRIPTOS ASOCIADOS A LA HOMOESTASIS DE HIERRO EN TARWI	33
4.2.1 Identificación de las proteínas implicadas en los mecanismos de absorción, transporte y almacenamiento de hierro en tarwi	33
4.2.2 Caracterización <i>In silico</i> de las proteínas implicadas en la homeostasis de hierro en tarwi	35
4.3 VALIDACIÓN DE LOS GENES ASOCIADOS A LA HOMEOSTASIS DE HIERRO POR MEDIO DE EXPRESIÓN GENÉTICA	45
V. CONCLUSIONES	51
. VI. RECOMENDACIONES	52
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Requerimiento diario de hierro según la edad y el sexo.....	6
Tabla 2	Descripción de las 45 accesiones de tarwi utilizados en la tesis.....	20
Tabla 3	Reglas para la determinación de la secuencia consenso.....	23
Tabla 4	Lista de genes involucrados en la ruta de homeostasis de hierro en <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
Tabla 5	Análisis de correlación del contenido micronutricional (Fe, Zn, B, Cu y Mn) y rasgos morfológicos (LA, AS y P100S) estudiados en tarwi.....	28
Tabla 6	Estimación de la variabilidad ambiental (<i>Ve</i>) asociada al contenido micronutricional y rasgos morfológicos de las semillas de tarwi.....	30
Tabla 7	Caracterización de los transcritos asociados a los mecanismos de absorción, transporte y almacenamiento de hierro en tarwi.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Componentes nutricionales, nutraceuticos y antinutricionales en tarwi.	5
Figura 2	Mecanismo de absorción de hierro en plantas.....	12
Figura 3	Mecanismo de transporte y almacenamiento de hierro en plantas.....	17
Figura 4	Caracterización micronutricional (A) y morfología (B y C) de las accesiones de tarwi, en donde Fe: hierro, Zn: zinc, B: boro, Cu: cobre, Mn: manganeso, LS: largo de semilla, AS: ancho de semilla y P100S: peso de cien semillas.....	27
Figura 5	Análisis de componentes principales de las accesiones tardías y precoces de tarwi. (A) Gráfico Biplot de la distribución de las accesiones de tarwi para PC1 vs PC2 (B) Gráfico de correlación del análisis de componentes principales para las concentraciones de hierro, zinc, boro, cobre, manganeso, largo de semilla, Ancho de semilla y el peso de 100 semillas.....	31
Figura 6	Selección y caracterización de las tres accesiones tardías de tarwi. A) análisis cluster y selección en base al P100S, criterios micronutricionales y el coeficiente de variación micronutricional ($CVM \leq 10\%$). y B) caracterización del contenido de Fe, Zn, B, Cu, Mn, LS, AS y P100S.....	32
Figura 7	Selección y caracterización de las tres accesiones precoces de tarwi. A) análisis cluster y selección en base al P100S, criterios micronutricionales y la variación de micronutrientes ($MCV_{micronutriente} \leq 10\%$) y B) caracterización del contenido de Fe, Zn, B, Cu, Mn, LS, AS y P100S.....	33
Figura 8	Análisis filogenético y de motivos conservados de las proteínas y enzimas asociadas al posible mecanismo de absorción de hierro en tarwi.	38
Figura 9	Análisis filogenético y de motivos conservados de las proteínas asociadas al posible mecanismo de transporte de hierro en el tallo de tarwi.....	41
Figura 10	Análisis filogenético y de motivos conservados de las proteínas asociadas al posible mecanismo de transporte y almacenamiento de hierro en la hoja de tarwi.....	44

Figura 11	Nivel de expresión en hoja, tallo y raíz de los genes relacionados con la estrategia I (AHA2 y FRO2) y la estrategia II (NAS1 y SAMS3) en la adquisición de hierro para el cultivar “Andenes” y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente.....	47
Figura 12	Nivel de expresión de las proteínas de transporte de larga distancia asociadas a la homeostasis de hierro en hoja, tallo y raíz en el cultivar “Andenes” y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente.....	48
Figura 13	Nivel de expresión de las proteínas de transporte de corta distancia asociadas a la homeostasis de hierro en hoja, tallo y raíz en el cultivar “Andenes” y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente.....	49
Figura 14	Nivel de expresión de los genes FRO7 y FER2 en hoja, tallo y raíz en el cultivar “Andenes” y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Tabla resumen del contenido de micronutrientes y características morfológicas de las semillas de las accesiones precoces y tardías de tarwi seleccionadas.....	84
Anexo 2	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína AHA2.....	85
Anexo 3	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína FRO2.....	86
Anexo 4	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína NAS1.....	87
Anexo 5	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína SAMS3.....	88
Anexo 6	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína YSL1.....	89
Anexo 7	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína FRD3.....	90
Anexo 8	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína OPT1.....	91
Anexo 9	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína OPT3.....	92
Anexo 10	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína OPT7.....	93
Anexo 11	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína YSL3.....	94
Anexo 12	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína FER2.....	95
Anexo 13	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína NRAMP1.....	96
Anexo 14	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína NRAMP3.....	97
Anexo 15	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína TIC21.....	98

Anexo 16	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína VIT1.....	99
Anexo 17	Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína FRO7.....	100

RESUMEN

Debido al cambio climático y al crecimiento poblacional se requiere consumir alimentos con buena calidad nutricional para evitar enfermedades como la anemia, siendo la selección de especies con potencial alimenticio una de las alternativas más sustentables y sostenibles. Dentro de estas especies, el tarwi es una excelente opción por tener altas concentraciones de hierro en la semilla, pese a crecer en suelos marginales. Esta característica del tarwi revelaría un eficiente mecanismo de absorción, transporte y almacenamiento de hierro, el cual puede ser utilizado para generar cultivares biofortificados a bajo costo, siendo esta la finalidad de la tesis. Para ello, primero se identificaron seis accesiones con concentraciones apropiadas de Fe, Zn, B, Cu y Mn para una dieta saludable sin afectar las características físicas de las semillas, las cuales fueron: T05, T08, T25, P14, P16 y P21. Luego, con herramientas bioinformáticas se identificaron y caracterizaron funcionalmente a 16 proteínas asociadas a la absorción, transporte y almacenamiento de hierro. Finalmente se evaluaron los cambios de expresión de los genes, de las correspondientes proteínas analizadas *in silico*, con la accesión T25 y el cultivar Andenes (control) revelando que los genes AHA2, FER2, NAS1, YSL1, NRAMP1, NRAMP3, VIT1 y TC21 son críticos para mejorar la adaptabilidad y las concentraciones de hierro a nivel de semillas en tarwi por su elevada expresión bajo deficiencia de hierro.

Palabras claves: *Lupinus mutabilis*, hierro, biofortificación, expresión genética

ABSTRACT

Due to climate change and population growth, consuming foods with good nutritional quality is necessary to avoid diseases such as anemia. Among the alternatives to combat anemia, selecting species with food potential is one of the most sustainable alternatives, tarwi being an excellent option. Despite growing in marginal soils, this species has a high concentration of iron in seeds, which would indicate that it has an efficient mechanism of absorption, transport, and storage of this mineral is critical for generating biofortified cultivars at low cost, being the purpose of this thesis. First, six accessions with appropriate concentrations of Fe, Zn, B, Cu and Mn for a healthy diet without affecting the physical characteristics of the seeds were identified: T05, T08, T25, P14, P16 and P21. Then, using bioinformatics tools, 16 proteins associated with iron absorption, transport and storage were identified and functionally characterized. Finally, gene expression changes of the corresponding proteins analyzed in silico were evaluated with the accession T25 and the cultivar Andenes (control), revealing that the genes AHA2, FER2, NAS1, YSL1, NRAMP1, NRAMP3, VIT1 and TC21 are critical for improving adaptability and iron concentrations at the seed level in tarwi due to their high expression under iron deficiency.

Keywords: *Lupinus mutabilis*, iron, biofortification, genetic expression

I. INTRODUCCIÓN

La población mundial podría alcanzar los 9 100 millones de personas para el 2050 y para ese momento la producción de alimentos deberá mantenerse al menos en un 70 % (FAO, 2016). En la actualidad, se busca incrementar no solo la producción, sino también la calidad nutritiva de los alimentos, debido a los problemas graves de salud que pueden ocasionar la deficiencia de estos en el ser humano (Finkelstein et al., 2017).

El consumo de alimentos con cantidades inadecuadas de nutrientes puede propiciar enfermedades crónicas muy relevantes a nivel mundial y entre ellas tenemos a la anemia. Esta enfermedad crónica se debe principalmente a la ingesta de alimentos bajos en hierro (Medlineplus, 2020) y afecta al 27% de la población mundial, siendo las mujeres y niños los más vulnerables (Jeng y Chen, 2022). En el Perú, los niños menores de tres años son los más afectados por esta enfermedad con porcentajes de prevalencia en costa, sierra y selva de 48.8, 44.6 y 33.9 %, respectivamente (Díaz-Rodríguez et al., 2022). Esta enfermedad crónica es muy grave porque afecta las habilidades cognitivas en los niños y productivas en los adultos, reduciendo la capacidad competitiva laboral (Haas y Brownlie, 2001). Pese a que la anemia está asociada generalmente a un consumo de alimentos bajos en hierro (Piskin et al., 2022), cabe resaltar que existen afecciones crónicas que alteran la permeabilidad del intestino delgado, impidiendo la absorción de hierro y entre ellas tenemos: la enfermedad inflamatoria intestinal (Malesza et al., 2022) y la gastritis (Noto et al., 2022), recomendando para estos casos una suplementación de hierro vía intravenosa (Bischoff et al., 2022). Por ende, es indispensable impulsar una cultura de consumo de alimentos más saludables desde las primeras etapas de vida, con el objetivo de combatir de forma efectiva estas afecciones y, en paralelo, la anemia.

Una alternativa de bajo costo para combatir la anemia es identificar, dentro de nuestra agrobiodiversidad, especies vegetales con alto contenido de hierro, siendo el tarwi (*Lupinus mutabilis* S.) una excelente opción. Esta especie se caracteriza por su alto contenido de proteínas (41-51%), ácidos grasos (14-24%) (Chirinos-Arias, 2015), calcio (0.12%), fósforo (0.6%) y hierro (78.45 ppm) (Ortega-David et al., 2010 Alcibíades y Granara, 2015).

Estos antecedentes incrementan el interés por estudiar los mecanismos genéticos que permiten a esta especie mantener la calidad nutritiva bajo condiciones de suelos marginales. Estos mecanismos genéticos contribuyen a mantener las concentraciones de hierro necesarias para un buen funcionamiento de los procesos biológicos bajo deficiencia de concentraciones inadecuadas de este mineral en el suelo (Curie y Briat, 2003). El conocimiento de las estrategias asociadas a la homeostasis de hierro en tarwi a nivel vegetativo es esencial, porque nos permitirá identificar a los genes con alta expresión asociados a la absorción y/o acumulación de hierro de forma más eficiente en esta planta y esto servirá como punto de partida para generar cultivares biofortificados cuyo consumo reduzca la incidencia de anemia en el Perú.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 TARWI Y SU IMPORTANCIA

El tarwi, también conocido como chocho o tarhui es una leguminosa cuyo origen se sitúa en la región andina de Perú, Bolivia y Ecuador (Huaringa-Joaquin et al., 2023). Su valoración como cultivo se remonta desde periodo inca; sin embargo, durante la invasión española fue desplazado, siendo sustituido por otros cultivos (Escobar-Navia et al., 2023, Jacobsen et al., 2023). Actualmente, el tarwi tiene un área cultivada de dos millones de hectáreas a nivel mundial, de las cuales el 60 % son destinados para la producción de grano y el 40 % para forraje, siendo Australia y España, lo mayores productores (Tapia, 2015). En Perú, los departamentos donde se cultiva esta leguminosa son la Libertad, Cuzco, Apurímac, Huancavelica y Puno con rendimiento promedios de 4681, 3087, 2232, 1783 y 1350 toneladas, respectivamente (Puma Quispe, 2023).

En 2023, la productividad de esta leguminosa incrementó en un 2 % gracias a la aceptabilidad del grano como alimento nutritivo, permitiendo su revaloración (Chillitupa Arredondo, 2023). De acuerdo a Mamani (2023), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) define al tarwi como un super alimento capaz de salvaguardar la seguridad alimentaria por su alto potencial nutritivo y nutracéutico (Figura 1). En lo nutritivo esta leguminosa se caracteriza por su alto contenido de proteínas (41 a 51 %) y ácidos grasos esenciales (14 a 24 %), superando incluso a la soya (Rodríguez-Ortega et al., 2023) Además, las concentraciones de hierro (44.67 a 88 ppm) y zinc (35.67 a 52.67 ppm) en las semillas de tarwi superan a lo establecido por HarvestPlus (Fe > 42 ppm y Zn > 28 ppm) para considerarlo a un alimento como biofortificado (Vera-Vega et al., 2022). Además, las concentraciones de boro (16.67 a 34 ppm) presentes en las semillas de tarwi son mayores a las de otros alimentos considerados biofortificados para este mineral (Kuru et al., 2019). Además, es fuente de potasio (1.22 %), magnesio (0.24 %), calcio (0.12 %), fósforo (0.6 %), manganeso (36.72 ppm) y cobre (12.65 ppm), y vitaminas como tiamina, riboflavina y niacina en concentraciones de 0.51, 0.42 y 4.1 mg/100g de alimento, respectivamente (Sequeiros Huachaca, 2022). Respecto a los antinutrientes (Figura 1), el tarwi contiene inhi-

bidores de inhibidores de tripsina y hemaglutininas en muy bajas concentraciones , las que disminuyen aún más durante el proceso de desamargado (Mendoza Ocampo, 2022).

En lo nutracéutico, el tarwi presenta metabolitos como el tamoxifen que es una isoflavona capaz de unirse a los receptores de estrógenos, siendo una alternativa para la prevención del cáncer de mama (Davies et al., 2013), enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y síntomas menopáusicos (Gálvez et al. 2008). Por otro lado, las semillas y hojas de tarwi presentan propiedades antileishmanial (*Leishmania* sp.) y antitripanosomal (*Trypanosoma cruzi*) (Huamán et al., 2013). Por otro lado, esta leguminosa presenta alcaloides quinolizidínicos con propiedades antimicrobianas capaces de controlar cepas bacterianas resistentes causantes de la tuberculosis (Hidalgo et al., 2022).

Estos estudios en tarwi han generado la necesidad de explorar esta leguminosa a nivel genético para identificar genes funcionales o regulatorios asociados a estos rasgos; sin embargo, al no tener un genoma de referencia, los estudios han sido enfocados en analizar la variabilidad genética y expresión global de genes (Taylor y De Angelis, 2020). Las técnicas asistidas por marcadores moleculares fueron utilizadas para explorar la diversidad genética inter e intra poblacional en tarwi (Guilengue et al., 2019), siendo las secuencias intercaladas entre Microsatélites (ISSR) y Secuencias Simples Repetidas (SSR) las más utilizadas para este tipo de estudio (Gulisano et al., 2019).

Recientemente, Ramos (2021) y Hidalgo (2021) realizaron estudios de expresión global en tarwi bajo floración y estrés hídrico, secuenciando el transcriptoma por medio de la técnica de ARNseq y utilizando herramientas bioinformáticas para su anotación y análisis. Respecto a los estudios de Ramos (2021) se identificaron genes asociados a la biosíntesis de fenolpropanoides, interconversiones de pentosas y glucuronato, entre otros; mientras que Hidalgo (2021) determinó genes funcionales asociados a canales y transportadores, detoxificación, síntesis de fosfolípidos, osmolitos y fotosíntesis, y además genes regulatorios relacionados a hormonas, modificación de cromatina y factores de transcripción.

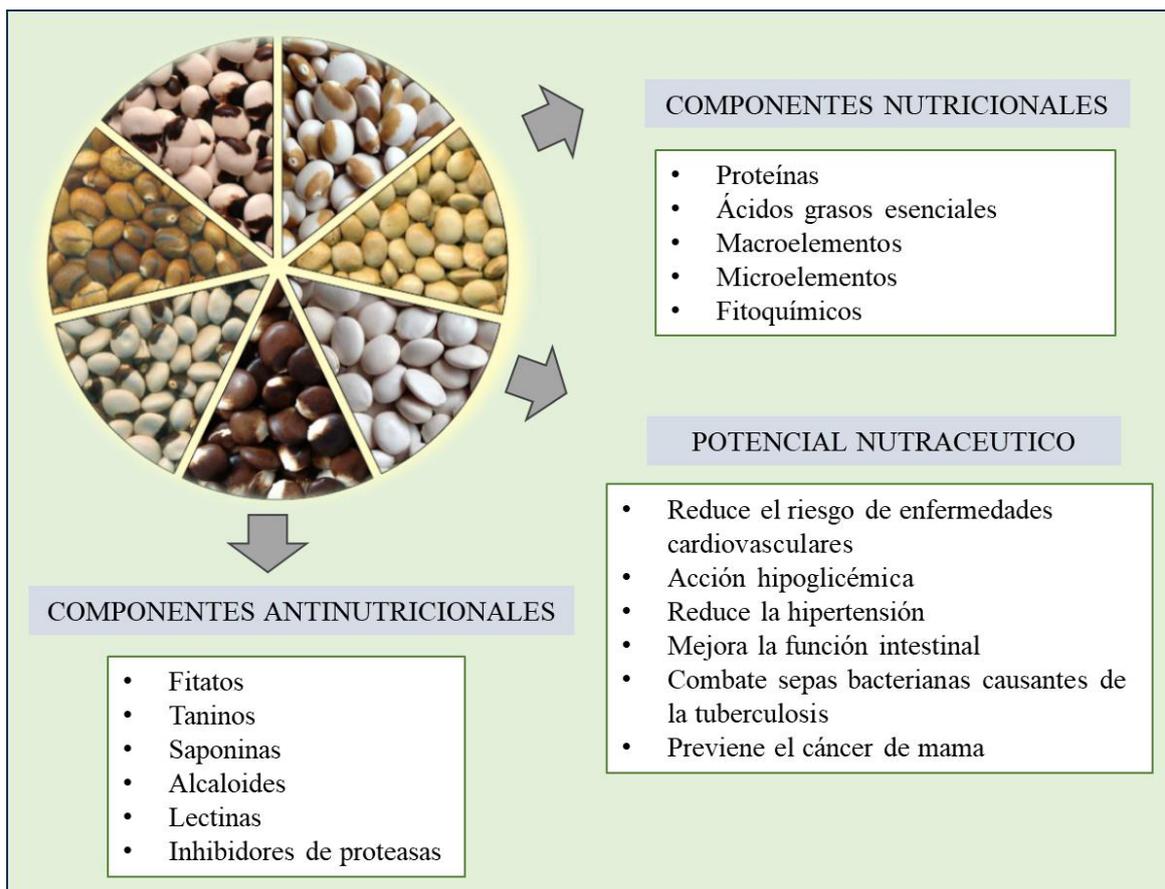


Figura 1. Componentes nutricionales, nutraceuticos y antinutricionales en tarwi

2.2 SITUACIÓN ALIMENTARIA EN EL PERÚ Y EL MUNDO

2.2.1 Importancia del hierro en la dieta humana

Desde la antigüedad, el hierro ha sido considerado como un nutriente importante en la dieta humana y los primeros reportes de su utilización en la medicina datan de las culturas egipcia, hindú, griega y romana (Forrellat Barrios, 2016). Sin embargo, en 1932 se demostró su importancia para la salud humana al comprobarse que el hierro inorgánico es esencial para la síntesis de hemoglobina (Abbaspour et al., 2014). Actualmente se reconoce la participación del hierro en más de 100 enzimas que son de vital importancia para un correcto crecimiento y desarrollo del cuerpo humano. Algunas de sus principales funciones son la síntesis de ADN, al ser parte de la enzima ribonucleótido reductasa (Toxqui et al., 2010), el transporte y almacenamiento de oxígeno, así como para la síntesis de ATP (Yip, 2003). A pesar que el hierro interviene en la síntesis de una multitud de proteínas y enzimas, cabe mencionar que casi 2/3 del hierro del cuerpo se localiza en la hemoglobina, el 25% se encuentra en las reservas movilizables y el resto está unido a la mioglobina (Grijota Pérez,

2016). No obstante, una insignificante fracción de este mineral se encuentra formando parte de una amplia variedad de enzimas relacionadas a los procesos asociados con el metabolismo oxidativo y otras funciones celulares (Abbaspour et al., 2014). La estrategia para mantener la homeostasis de hierro en el organismo se basa en un continuo reciclaje y estricta conservación de este mineral (Forrellat Barrios, 2016). Además, el cuerpo debe recibir un suministro diario de hierro y esto puede variar según la edad y el sexo (Tabla 1).

Tabla 1. Requerimiento diario de hierro por edad y sexo

Etapa de la vida	Cantidad recomendada
Bebés hasta los 6 meses de edad	0,27 mg
Bebés de 7 a 12 meses de edad	11 mg
Niños de 1 a 3 años de edad	7 mg
Niños de 4 a 8 años de edad	10 mg
Niños de 9 a 13 años de edad	8 mg
Adolescentes (varones) de 14 a 18 años de edad	11 mg
Adolescentes (niñas) de 14 a 18 años de edad	15 mg
Hombres adultos de 19 a 50 años de edad	8 mg
Mujeres adultas de 19 a 50 años de edad	18 mg
Adultos de 51 o más años de edad	8 mg
Adolescentes embarazadas	27 mg
Embarazadas	27 mg
Adolescentes que están amamantando	10 mg
Mujeres que están amamantando	9 mg

Fuente: NIH (2023).

La fuente de hierro dietético presenta dos orígenes: hemo y no hemo. El hierro hemo proviene de las carnes rojas y blancas, el cual puede ser absorbido por el cuerpo hasta un 50% (Jumbo Crisanto, 2016). En cambio, el hierro no hemo se encuentra en los alimentos de origen vegetal, unido a proteínas como la ferritina que permite su fácil biodisponibilidad (Gutiérrez Mesías, 2023). Sin embargo, este micronutriente también forma complejos moleculares que son de naturaleza insoluble, lo que no permite su absorción por el intestino delgado y son conocidos como antinutrientes (Martínez-Valverde et al., 2000). Entre los más comunes tenemos al ácido fítico, caracterizado por ser un ácido orgánico que contiene principalmente fósforo, y se ha reportado que también secuestra micronutrientes como hierro (De-Paula et al., 2018). Este antinutriente lo podemos encontrar en especies cultivadas como *Glycine máxima*, *Lens culinaris*, *Cicer arietinum*, *Arachis hipogaea* y *Phaseolus vulgaris* en concentraciones que varían entre 386 a 714 mg/100 g de semillas (Popova y Mihaylova, 2019) y en los cultivos del género *Vigna*; presentan concentraciones de ácido fítico que oscilan entre de 312 a 1135.625 mg/100 g de alimento (Tresina y Mohan, 2012; Kakati et

al., 2010; kalidass y Mohan, 2012). Sin embargo, *Lupinus mutabilis* contiene 0.311 mg de fitatos por 100 g de semillas, reduciéndose hasta en un 55 % producto del desamarrado (Fernández, 2017). Otro antinutriente es el tanino, que tiene la capacidad de ligarse al hierro, evitando la absorción de este nutriente, reduciendo su absorción hasta un 60 % (Álvarez y César, 2019). Se ha registrado en *Phaseolus vulgaris* una concentración de taninos de 2961 mg/100 g de alimento (Shimelis y Rakshit, 2008); mientras que en *Cajanus cajan* y *Glycine máxima* las concentraciones de taninos son de 1900 y 1590 mg/100 g de alimento (Sangronis y Machado, 2007 y Sharma et al., 2013). Además, Popova y Mihaylova (2019) analizaron semillas de *Lens culinaris*, *Cicer arietinum* y *Arachis hipogaea* registrando concentraciones de taninos que van de los 180 a 1800 mg/100g de alimento. En cambio, en semillas de tarwi tenemos una concentración de taninos de 95.53 mg/100 g de alimento que, con el desamargado, se reduce hasta un 80%, garantizando una mayor biodisponibilidad de hierro (Fernández, 2017) a diferencia de las otras especies de leguminosas.

Las saponinas son metabolitos secundarios que juegan un rol en la defensa contra los patógenos (Franco Jiménez, 2021). Sin embargo, este antinutriente interfiere con la absorción y digestión de nutrientes (García, 2004). Ante ello, es crucial tener un registro de las concentraciones de saponinas en las especies cultivadas, con el objetivo de establecer estrategias de mejora genética para brindar alimentos más saludables. En *Glycine maxima*, *Lens culinaris*, *Cicer arietinum*, *Arachis hipogaea* y *Phaseolus vulgaris*, las concentraciones de saponinas se encuentran en el rango de 106-170 mg/100 g de alimento (Popova y Mihaylova, 2019). Por otro lado, las concentraciones de este antinutriente en *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* y *Cicer arietinum* fluctúan entre 168 y 201 mg/100 g de alimento (Sharma y Sign, 2017). En cambio, en *Lupinus mutabilis*, Ruiz et al. (1995) reportan concentraciones de saponinas que oscilan entre 37.9 a 74 mg/100 g de alimento, siendo estas concentraciones menores a las descritas anteriormente, lo que la posiciona como un alimento más seguro respecto a otras leguminosas.

2.2.2 Anemia, una deficiencia micronutricional

En el mundo existen muchas enfermedades no transmisibles asociadas a una ingesta baja en nutrientes y entre las más comunes tenemos a la anemia (Medlineplus, 2020). La incidencia de esta patología es muy importante para la salud pública, porque si no es atendida en los primeros años de vida, puede repercutir en forma negativa en la capacidad cognitiva y productiva de las personas (Haas y Brownlie, 2001), siendo además una de las principales

causas de muerte de mujeres gestantes durante el parto (Milman, 2011). Esta enfermedad no transmisible se debe a múltiples causas; sin embargo, la más relevante es el consumo de alimentos bajos en hierro (Medlineplus, 2020). Esta afección presenta tres estadios: 1) la disminución de las reservas de hierro en el cuerpo denominada depleción de hierro, 2) la deficiencia de hierro con disminución de la eritropoyesis, viéndose afectada la síntesis de hemoglobina, y 3) la anemia ferropénica, es el caso más grave y se caracteriza por una reducción de la síntesis de hemoglobina (Vásquez, 2003). La anemia ferropénica afecta al 27 % de personas en el mundo (Jeng y Chen, 2022). En los países industrializados, los grupos más vulnerables a la anemia son las mujeres embarazadas (18%) y los preescolares (17 %); mientras que en los países en desarrollo estos índices aumentan a 56 % y 42 % en mujeres embarazadas y preescolares (Vásquez, 2003). En el Perú, los niveles de anemia continúan siendo un problema para salud pública, en donde los niños y mujeres gestantes son los más vulnerables (Díaz-Rodríguez et al., 2022; Silva Lopez, 2024). Para detener el avance de la anemia en el Perú y en el mundo se han planteado múltiples alternativas y entre ellas: suministrar suplementos nutricionales ricos en hierro; sin embargo, estos generan estreñimiento (Mansilla et al., 2017). Por otro lado, existen programas interdisciplinarios como Harvestplus, que trabaja en conjunto con instituciones académicas del sector público y privado de 40 países del mundo con el objetivo de generar alimentos biofortificados. En el Perú, el Ministerio de Salud (MINSA), por medio de su programa acción contra el hambre, promueve el desarrollo de investigaciones de cultivos biofortificados (Alcázar, 2012; Nestel et al., 2006; Douthwaite et al., 2023).

2.3 BIODIVERSIDAD VEGETAL Y BIOFORTIFICACIÓN CON HIERRO

La biodiversidad vegetal cuenta con especies de importancia económica en el sector agroindustrial, textil, medicinal, entre otros (Begossi et al., 2000). Sin embargo, las de interés alimenticio son las más críticas, porque su consumo favorece el rendimiento corporal y cognitivo (Haas y Brownlie, 2001) y reduce la incidencia de enfermedades crónicas asociadas a la deficiencia de nutrientes (Ruiz et al., 2014). Ante ello, muchos investigadores en fitomejoramiento se enfocan en explorar la variabilidad de las especies vegetales domesticadas, a fin de identificar material genético promisorio que sirva de base para la obtención de cultivares biofortificados en hierro y, entre las especies comerciales más estudiadas, tenemos: frijol, trigo y otras (Gómez-Galera et al., 2010). El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una de las leguminosas más consumidas a nivel mundial y, por esta razón, se han comenzado a identificar genotipos biofortificados con hierro por medio de mejoramiento

convencional (Petry et al., 2015). El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) evaluó 1000 accesiones de frijol común y encontró algunas que presentaban entre 34 a 89 ppm de hierro total (Della Valle et al., 2013). Además, Aliu *et al.* (2014), estudiando la variabilidad micronutricional de una población de frijol, encontró que el contenido de hierro en estos genotipos variaba entre 53.36 a 114 ppm. Asimismo, Araújo et al. (2003), evaluando una colección de genotipos, cultivares y líneas élites de frijol, encontró que la magnitud de la dispersión del contenido de hierros estuvo entre 83.5 a 104 ppm. En cambio, en otras leguminosas como las habas, las alverjas, el frijol castilla, el garbanzo y las lentejas el contenido de hierro varió entre 5 a 97.78 ppm (Baloch et al., 2014; Diapari et al., 2015; Gerrano et al., 2017; Grewal et al., 2020; Karakoy et al., 2012). El trigo (*Triticum aestivum*) es otra especie de interés alimenticio para generar cultivares biofortificados con hierro, por tener una gran variabilidad fenotípica en torno a la concentración de este mineral en la semilla, encontrando genotipos de 15 a 109 ppm de hierro (Cakmak et al., 2004; Badakhshan et al., 2013). Por otro lado, Badigannavar *et al.* (2016), evaluando el contenido de hierro 112 genotipos de sorgo, encontró que las cantidades de este micronutriente varían entre 11 a 954 ppm.

2.4 HOMEOSTASIS DE HIERRO EN PLANTAS

El hierro es un micronutriente esencial para las plantas y su deficiencia puede repercutir en procesos fisiológicos implicados en su crecimiento y desarrollo tales como la respiración, biosíntesis de clorofila y fotosíntesis (Ishimaru et al., 2010). Sin embargo, este micronutriente no puede estar en forma libre en las células porque puede reaccionar con los radicales hidroxilos a través de la reacción de Fenton, ocasionando daños irreversibles a nivel celular (Jeong y Guerinot, 2009). La compartimentalización de este micronutriente es fundamental para evitar sus efectos tóxicos y facilitar su biodisponibilidad para el buen funcionamiento de la célula. Las biomoléculas que participan en su biodisponibilidad son proteínas que intervienen en la toma de hierro del suelo hasta su almacenamiento y uso dentro de las células vegetales (Mai y Bauer, 2016).

2.4.1 Absorción y asimilación de hierro en plantas

Las plantas, para crecer y desarrollarse, deben tomar los nutrientes necesarios del suelo donde se encuentran (Morgan y Connolly, 2013). Sin embargo, estos suelos presentan diversas características que pueden facilitar o no la absorción de nutrientes (Chapin, 1983). En suelos donde los nutrientes no estén bajo su forma biodisponible, las especies vegetales

han empleado estrategias para regular su homeostasis nutricional (Yoshiaki, 2021). Por ejemplo, en suelos calcáreos el hierro se encuentra bajo la forma química de ion férrico o Fe(III) (Nozoye et al., 2013). Ante esta situación, las plantas desarrollaron mecanismos como la reducción de Fe(III) a ion ferroso o Fe(II) (forma bioasimilable) o la exudación de biomoléculas que atrapan el Fe(III) para facilitar su ingreso a la raíz (Jeong y Guerinot, 2009). Además, estas estrategias están presentes en plantas gramíneas y no gramíneas (Figura 2).

a. Estrategia de absorción de hierro en gramíneas

Las especies gramíneas, en respuesta a la deficiencia de hierro, liberan fitosideróforos a la rizósfera. Dentro de estos fitosideróforos tenemos a la nicotianamina (NA) y la S-Adenosilmetionina (SAM) que son biosintetizadas por las enzimas Nicotianamina sintasa (NAS) (Nozoye 2018) y la S-Adenosilmetionina Sintetasa 3 (SAMS3) (Chen et al., 2016a, Mori y Nishizawa, 1987 y Binet et al., 2011). El fitosideróforo NA se caracteriza por ser un aminoácido no proteínogénico que fue descubierto por primera vez en el tabaco (Noma et al. 1971). La NA se ha vuelto una biomolécula translocadora muy importante en la homeostasis de hierro, ya que no solo facilita el transporte de hierro del suelo a la raíz, sino también a las hojas e inclusive a las semillas (Kim et al., 2005; Masuda et al., 2009; Schuler et al., 2012), convirtiendo a la enzima biosintetizadora de este fitosideróforo en pieza clave para la generación de cultivares tolerantes a la deficiencia de hierro (Johnson et al., 2011). Para ello, se han realizado estudios de sobreexpresión de la enzima NAS en diversos cultivos para confirmar la tolerancia. En soya, la sobreexpresión de la enzima *HvNAS1* ha incrementado el contenido de hierro en semillas de 55 a 110 ppm (Nozoye et al., 2014). En camote, la enzima NAS incrementó el contenido de hierro cinco veces más en hojas en comparación con el testigo (Kim et al., 2005). En arroz, la sobreexpresión del gen *HvNAS1* con ayuda del promotor CaMV 35 aumentó al doble el contenido de hierro en semillas pulidas (Masuda et al., 2009). En cambio, en cebada el SAM es biosintetizado en repuesta a la deficiencia de hierro (Takizawa et al. 1996). El NA secuestra el Fe(III) y el Fe(II), y los transporta al interior de la raíz por medio de la proteína transportadora Yellow Stripe Like 1 (YSL1) (Le et al., 2005). La proteína de transporte YSL1 se encuentra en la membrana plasmática de las células radiculares (Kumar et al., 2017) y se ha demostrado que la expresión de este gen es mayor bajo deficiencia de hierro (Waters et al., 2006). En cebada existe una proteína de transporte homóloga a YSL1 conocida como *Hordeum vulgare* Yellow Stripe 1 (*HvYS1*) que tiene afinidad por el fitosideróforo conocido como ácido

mugineico (AM) para transportar el Fe(III) al interior de la raíz (Inoue et al., 2009). En arroz, la proteína YSL15 utiliza al 2'-desoximugineico (ADM) para transportar Fe(III) al interior de las células radiculares (Lee et al., 2009). A pesar que estas proteínas de transporte son propias de las gramíneas, se han encontrado en múltiples especies, incluyendo monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas, helechos y musgos (Chen et al., 2014).

b. Estrategia de absorción de hierro en especies no gramíneas

Las especies dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, bajo un panorama de deficiencia de hierro, emplean estrategias para tomar este mineral no asimilable convirtiéndolo en biodisponible (Jeong y Guerinot, 2009). Para facilitar el ingreso de hierro, este grupo de plantas utiliza la exudación de protones y ácidos orgánicos con el objetivo de generar las condiciones para convertir el Fe(III) a la forma biodisponible que es el Fe(II) (Kobayashi y Nishizawa, 2012). Uno de los complejos que facilita la acidificación de la rizósfera es la ATPasa (AHA) (Zhang et al., 2019). Esta enzima se localiza en la célula radicular, exactamente en la membrana plasmática y se ha demostrado que se expresa aún más bajo deficiencia de hierro (Yi y Guerinot, 1996). En *Arabidopsis*, se ha reportado que la expresión de las enzimas AHA2 y AHA7 es elevada bajo condiciones de deficiencia de hierro, mientras que AHA1 no (Yuan et al., 2017, Zhang et al., 2019). La acidificación de la rizosfera permite la liberación del hierro en su forma oxidada; sin embargo, este mineral debe reducirse a Fe(II) para ingresar al interior de la célula radicular y para ello existe la enzima Ferroquelato reductasa 2 (FRO2) (Vert et al., 2002). Esta enzima transforma el Fe(III) en Fe(II) por medio de la donación un electrón proveniente del $\text{NADPH} + \text{H}^+$, ocurriendo esta reacción en el apoplasto de la raíz (Zhang et al., 2019). En *Arabidopsis thaliana*, la enzima FRO2 está asociada al incremento de la longitud de la raíz bajo deficiencia de hierro (Satbhai et al., 2017). Mientras que en *Glycine max*, la FRO2 tiene una alta afinidad por el Fe(III) (Mamidi et al., 2014). Una vez reducido, el hierro debe ingresar al interior de la raíz y, para ello, es necesaria la proteína de transporte regulada por hierro 1 (IRT1). Ishimaru et al. (2007) y Oki et al. (2004) revelaron que el gen que regula la proteína de transporte IRT1 en líneas transgénicas incrementa las concentraciones de hierro en las células radiculares, mejorando la tolerancia a la baja biodisponibilidad de este micronutriente en condiciones hidropónicas y en suelos calcáreos.

2009). Dentro de estas tenemos a las proteínas de la familia Yellow Stripe Like (YSL) (Kumar et al., 2019a). Las YSLs son parte de la familia de proteínas conocida como oligopéptidos transportadores (OPT) y fueron identificadas en base a la similitud de sus secuencias con la proteína *Zea mays* Yellow Stripe (*ZmYS1*) debido a su secuencia proteínica altamente conservada (Harada et al., 2007). Estas proteínas se han identificado y caracterizado en diversas especies vegetales como monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas, helechos y musgos (Lubkowitz, 2006). Curie et al. (2001), Inoue et al. (2009), Murata et al. (2006) y Banakar et al. (2017) reportan que este tipo de proteínas de transporte en *Arabidopsis*, arroz y cebada están involucradas en la adquisición de hierro y su distribución a diferentes partes de la planta. En trigo, las proteínas *TaYSL1A*, *TaYSL1B*, *TaYSL3*, *TaYSL5* y *TaYSL6* se encuentran reguladas en las raíces, mientras que las proteínas *TaYSL5*, *TaYSL12* y *TaYSL9* en el brote y su actividad incrementa bajo deficiencia de hierro (Kumar et al., 2019a). Por otro lado, Senoura et al. (2017) revelaron que la proteína *OsYSL9* transporta tanto el complejo Fe(II)-nicotianamina y el Fe(III)-ácido 2-deoximugineico del endospermo al embrión durante el desarrollo de la semilla. En cambio, la proteína *OsYSL2* está involucrada en el transporte de hierro desde las hojas a las semillas (Koike et al., 2004; Ishmaru et al., 2010). En *Oriza sativa*, la proteína *OsYSL15* se localiza en la membrana plasmática de la raíz y permite el ingreso del complejo Fe(III)-ácido 2-deoximugineico y su sobreexpresión incrementa el contenido de hierro en las semillas de arroz (Connorton y Balk, 2019). Moran Lauter et al. (2014), identificaron genes candidatos en respuesta a la deficiencia de hierro en *Glycine max*, en donde solo la proteína de transporte *GmYSL7* se expresó a nivel de hojas. Sin embargo, en *Arabidopsis thaliana*, las proteínas *AtYSL1* y *AtYSL3* se localizan en las raíces y hojas, y su regulación es mayor en respuesta a la deficiencia de hierro; además, ellos hipotetizan que estas dos proteínas pueden translocar el hierro del xilema al floema para poder transportarlo hacia las flores y frutos (Waters et al., 2006).

Dentro de la familia OPT, existen otras proteínas conocidas como Peptide Transporters (PTs) (Lubkowitz, 2011). Estas proteínas están involucradas en procesos tales como: distribución de metales a larga distancia, movilización de nitrógeno, secuestro de metales pesados y transporte de glutatión (Lubkowitz, 2011). Sin embargo, dentro de este grupo hay proteínas de transporte de larga distancia, cuyo rol es importante en la homeostasis de hierro en los seres vivos. Bajo esa función utilizan a la NA para movilizar el hierro en su forma química divalente o trivalente por el floema hacia las semillas (Grusak et al., 1999). El homólogo de

la proteína OPT3 de *Brassica juncea* (BjGT1) se sobreexpresa en el tallo bajo deficiencia de hierro, permitiendo la acumulación de este micronutriente en las semillas (Zhai et al., 2014). En cambio, en *Arabidopsis thaliana*, las proteínas AtOPT1 al 9 a excepción de la AtOPT8 se expresan fuertemente en las plántulas germinadas, especialmente en el tejido vascular de los cotiledones e hipocótilos (Koh et al., 2002). La regulación de estas proteínas preferentemente es en el tejido vascular de los cotiledones; sin embargo, también se observa su regulación en raíces, hipocótilos, hojas, flores, vainas y semillas (Stacey et al., 2006). Por otro lado, las proteínas de transporte OsOPT1, OsOPT3, OsOPT4, OsOPT5 y OsOPT7 movilizan tanto el Fe(II) como el Fe(III) a las raíces, tallos, hojas, cubierta de la semilla, pedicelo y embriones (Vasconcelos et al., 2008). A nivel del xilema, tenemos una proteína de transporte a larga distancia conocida como Reductasa Férrica Defectuosa 3 (FRD3) (Roschttardt et al., 2011). Esta proteína fue aislada por primera vez en *Arabidopsis thaliana* y, estudiando su funcionalidad, se determinó como una proteína transportadora de manganeso (Delhaize, 1996). Sin embargo, se ha descubierto que anulando la expresión del gen FRD3 se pueden generar, en *Arabidopsis*, plantas cloróticas bajo un escenario de escasez de hierro en el suelo, corroborando así su importante participación en la homeostasis de hierro (Yokosho et al., 2009) Esta proteína transporta hierro en su forma férrica por medio del complejo citrato-ion férrico (Rogers y Guerinot, 2002; Green y Rogers, 2004; Durrett et al., 2007; Yokosho et al., 2009). Este fitosideróforo probablemente sea específico para la FRD3 para el transporte de hierro via xilema, ya que contiene el 99.5% del hierro presente en los exudados del xilema (Durrett et al., 2007). La proteína FRD3 cumple roles relevantes asociados a la fertilidad, ya que la anulación de la expresión del gen FRD3 provocaría aborto de los granos de polen y, con ello, la generación de semillas vanas en *Arabidopsis thaliana* (Roschttardt et al., 2011). En *Oryza sativa* hay seis ortólogos de la proteína FRD3 de las cuales OsFRDL1 causa clorosis en las hojas. Además, esta misma proteína fue localizada en el pedúnculo, raquis, cáscara y estambre, asociándola con la viabilidad del polen y la fertilidad del grano (Yokosho et al., 2009). Los reportes sobre estas proteínas asociadas a la homeostasis de hierro, corroboran su importancia para su utilización dentro de un programa de mejora vegetal a fin de tener cultivares biofortificados adaptados a suelos marginales.

b. Transporte a corta distancia

En la célula, el tránsito e ingreso de hierro en sus formas divalente y trivalente se da gracias a proteínas de transporte de corta distancia. Estas proteínas se localizan en las orgánulas que cumplen un rol vital en el crecimiento y desarrollo celular. Estas orgánulas son: el cloroplasto

y la vacuola (Frazer y Anderson, 2014). En el cloroplasto (Figura 3), la proteína de transporte conocida como translocon 21 de la membrana interna del cloroplasto (TIC21) cumple la función de permitir el ingreso del hierro en su forma química de Fe(II) (Li y Chiu, 2010). En *Arabidopsis thaliana*, esta proteína fue identificada por primera vez, determinando su importancia en la homeostasis de hierro y en la formación de plastidios (Sun et al., 2001; Duy et al., 2007). Sin embargo, en el citoplasma también existe Fe(III) que no puede ingresar bajo esta forma química; es por ello que existe una enzima ubicada en la membrana del cloroplasto que se encarga de reducir el Fe(III) a Fe(II) llamada Ferroquelato Reductasa 7 (FRO7) y es inducida durante la diferenciación de las células en las hojas, así como en la maduración de los cloroplastos (Kroh y Pilon, 2020). Cabe mencionar que la FRO7 cumple un rol importante en las necesidades fotosintéticas de las plantas, ya que un mal funcionamiento de esta enzima puede generar un retraso en el crecimiento, un bajo transporte de electrones y una disminución en la acumulación de citocromo b6/f bajo condiciones *in vitro* (Jeong et al., 2008).

En la vacuola (Figura 3), las proteínas de transporte de corta distancia más importantes son: el transportador de hierro vacuolar (VIT) y la resistencia asociada al macrófago (NRAMP) (Yoshida y Negishi, 2013). La VIT1 es importante para la homeostasis de hierro porque permite la transferencia de hierro del citoplasma al interior de las vacuolas, permitiendo el incremento de hierro en los cultivos (Kato et al., 2019). Esta proteína de transporte fue reportada por primera vez en *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2006). Para el uso del hierro almacenado en la vacuola, el citoplasma circundante debe disminuir de pH, permitiendo así la activación de los sistemas de flujos que liberan los iones metálicos almacenados en la vacuola de las cuales uno de sus componentes son las Proteínas de macrófagos asociada a la resistencia natural (NRAMPs) (Yoshida y Negishi, 2013). En *Oriza sativa* se han identificado las proteínas *OsNRAMP1-7*, de las cuales solo cinco de ellas han sido caracterizadas y solo la NRAMP6 estaba involucrada en la homeostasis de hierro (Peris-Peris et al., 2016). En cambio, en *Arabidopsis thaliana* se han identificado seis proteínas NRAMP en las que la *AtNRAMP3* y *AtNRAMP4* están asociadas a la adquisición de hierro en las membranas vacuolares localizadas en los embriones durante las etapas de desarrollo temprano (Calliatte et al., 2010). En *Arachis hypogaea*, se ha identificado la proteína *AhNRAMP1* en raíces y hojas. La función de esta proteína es la movilización de hierro divalente del interior de la vacuola al espacio intracelular, para su utilización cuando exista deficiencia de hierro (Xiong et al., 2012). Las proteínas de transporte antes mencionadas

cumplen un rol primordial en la homeostasis de hierro en los cultivos, ya que permiten el reciclaje y abastecimiento de este micronutriente para el normal funcionamiento de los procesos biológicos vitales en un escenario de escasez de este mineral en el suelo.

2.4.3 Almacenamiento de hierro en las plantas

Dentro de las células, el hierro en su estado libre es tóxico y, por eso, debe ser compartimentalizado hasta cuando sea requerido y utilizado para la regulación de procesos fundamentales como la fotosíntesis, respiración entre otras (Bashir et al., 2016). Para ello existen proteínas, conocidas como ferritinas (FERs), donde se almacena el hierro para mantener el balance en el contenido de este mineral a nivel celular (Figura 3). Estas proteínas de almacenamiento se localizan principalmente en el cloroplasto, mitocondrias (Vigani et al., 2013) y vacuolas (Bastow et al., 2018). En *Oriza sativa*, al sobreexpresar el gen de la ferritina se consiguió incrementar el contenido de hierro en las semillas y, después de ese acontecimiento, se empezó a estudiar este mismo gen en otras especies con el objetivo de generar estrategias para obtener cultivos biofortificados en hierro (Kobayashi et al., 2010). Por otro lado, la coexpresión del gen de la ferritina de *Glycine max* y de la *Aspergillus phytasa* permitió el aumento de un 20 a 70% en el contenido de hierro a nivel de endospermo en *Zea mays* (Lee et al., 2012). En banana, utilizando el gen de la ferritina de *Glycine max* se logró incrementar el contenido de hierro en 6.32 veces en comparación con las plantas testigo (Kumar et al., 2011). Además, se utilizó el gen de la ferritina de *Glycine max* en trigo consiguiendo aumentar el contenido de hierro a 40 ppm, mientras que sobreexpresando la ferritina de trigo conocida como *TaFer1-A* se consiguió incrementar el contenido de hierro a 44.5 ppm (kumar et al., 2019b). Goto et al. (1999) y Lucca et al. (2002) afirman que la sobreexpresión de las ferritinas de las semillas de las especies de cereales contribuiría a incrementar el contenido de hierro y, de esta manera, generar un alimento con mayor calidad nutritiva en base a hierro. Aparte de las ferritinas, existen otras biomoléculas en donde el hierro es almacenado y son conocidas como antinutrientes, porque solo almacenan y no permiten la biodisponibilidad de hierro. Entre ellas tenemos a los taninos, polímeros fenólicos y el ácido fítico (Welch y Graham, 2004). El ácido fítico puede precipitar el hierro, disminuyendo su biodisponibilidad en la planta y dificultando su asimilación como alimento para las personas (Schuler y Bauer, 2012). Por lo tanto, un alimento con alto contenido de ácido fítico, es un recurso alimenticio que genera deficiencia de hierro y la anemia en su población (Shamsuddin, 2008). Ante esta situación, los programas de mejoramiento genético de cultivos trabajan en reducir el contenido de ácido fítico en los cultivos con el fin de

incrementar el contenido de hierro biodisponible (Kuwano et al., 2006).

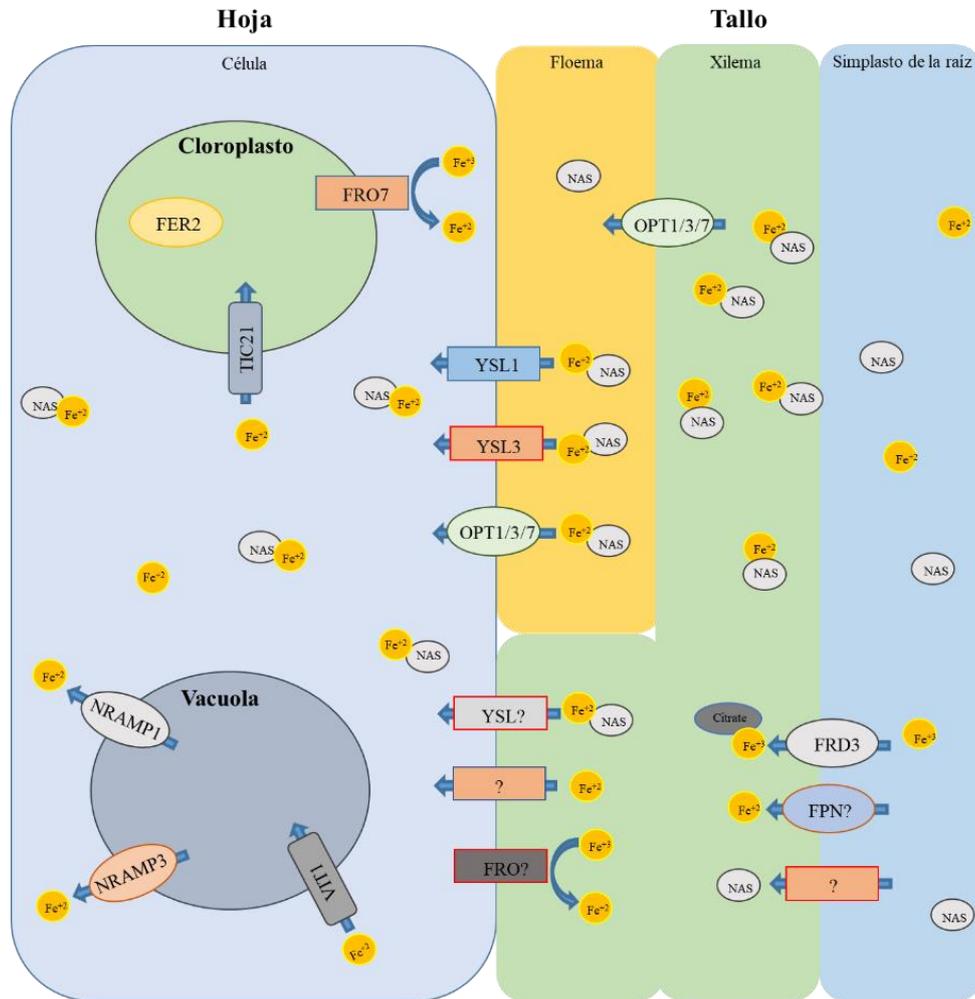


Figura 3. Mecanismo de transporte y almacenamiento de hierro en plantas

Las proteínas Reductasa férrica defectuosa 3 (FRD3), Transportador de oligopéptidos 1 (OPT1), Transportador de oligopéptidos 3 (OPT3), Transportador de oligopéptidos 7 (OPT7), Yellow stripe like 1 (YSL1) y Yellow stripe like 3 (YSL3) transportan el hierro vía vascular y en hoja, las proteínas Proteína 1 de macrofagos asociada a la resistencia natural (NRAMP1), Proteína 3 de macrofagos asociada a la resistencia natural (NRAMP3), Transportador de hierro vacuolar 1 (VIT1) permiten la salida e ingreso del hierro de la vacuola, y en el cloroplasto la enzima Ferroquelato reductasa 7 (FRO7) reduce el hierro de Fe(III) a Fe(II) para que la Translocon 21 de la membrana interna del cloroplasto (TIC21) permita su ingresos para ser almacenado en la proteína Ferritina 2 (FER2). Loas interrogantes (?) simbolizan proteína desconocida.

Fuente: Gayomba et al. (2015) y Agafonov et al. (2016).

En leguminosas, se ha reportado que existe un simultáneo incremento del contenido de ácido fítico y de hierro (Petry et al., 2015). En cereales, se busca que la relación entre ácido fítico y hierro esté en una relación molar de 1:1, ya que esto significaría una absorción significativa de hierro en este tipo de alimentos (Hurrell y Egli, 2010). En cambio, para algunas legumbres

y cereales integrales, si la relación molar es de 10:1, la biodisponibilidad de hierro es nula (Rodríguez-Ramiro et al., 2017). A nivel de mejora genética, en *Pisum sativum* se logró reducir a un 60 % el contenido de ácido fítico, logrando mejorar la biodisponibilidad de hierro (Warkentin et al. 2012; Liu et al., 2014). La información antes mencionada evidencia la importancia de incrementar el contenido de ferritina y disminuir el de ácido fítico para mejorar la biodisponibilidad de hierro y, con ello, garantizar una mejor adaptabilidad del cultivo al ambiente y facilitar un alimento con calidad nutritiva en base a hierro.

2.5 HIERRO Y SU COMPETENCIA CON OTROS MICRONUTRIENTES

El hierro se encuentra biodisponible en el suelo de pH ácido. Sin embargo, la mayoría de los suelos agrícolas presentan pH alcalino y, en esta situación, las especies cultivadas se valen de estrategias para tomar el hierro del suelo y mantener la homeostasis de este micronutriente en la planta (Guerinot, 2001). El hierro es tomado por la planta a través de proteínas de transporte que son activadas bajo deficiencia de hierro. Sin embargo, estas proteínas no suelen ser específicas para este micronutriente (Puig y Peñarrubia, 2009). La proteína de transporte IRT1 puede tomar del suelo mayor cantidad de cadmio, manganeso y zinc que de hierro, demostrando su mayor afinidad por estos metales que por hierro (Staiger, 2002). Cohen et al. (2004) revelaron que la proteína *PsIRT1* no solo transporta Fe(II) sino también Zn(II) y Mn(II) en *Pisum sativum*. En gramíneas, el fitosideróforo NA a un pH de 6.5 puede atrapar iones de Cu en lugar de hierro. Además, se ha reportado que la NA presenta mayor afinidad por el Zn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) y Fe(III) que por Fe(II). Asimismo, Singh et al. (2017) reportan los fitosideróforos biosintetizados por la *TaNAS2* en trigo, secuestrando tanto el hierro como el zinc. Estos complejos quelantes pueden ser transportados, de la raíz a las hojas y de ellas a las semillas, por las proteínas de transporte YSL reduciendo las concentraciones de hierro e incrementando el contenido de otros micronutrientes o metales pesados en la planta (Curie et al., 2008). Así, la proteína *TaYSL5* reportada para trigo puede movilizar el hierro, cobre, zinc y manganeso (Kumar et al., 2018). Vía xilema, la proteína de transporte *AtFRD3* no es específica de hierro, ya que también se ha reportado que puede movilizar zinc (Pineau et al., 2012). Dentro de las proteínas de transporte a corta distancia, se ha reportado que las proteínas NRAMP presentan mayor afinidad por el Cd(II) que por el Fe(II) (Thomine et al., 2000). En cambio, Mani y Sankaranarayanan (2018) y Kirammayi et al. (2014) afirman que la proteína *OsNRAMP* puede trasladar tanto el hierro como zinc, cobre y manganeso. También se ha reportado que las ferritinas no son específicas para

almacenar hierro, ya que también pueden contener cobre y manganeso (Bashir et al., 2016). Las biomoléculas antes mencionadas, son importantes por tener una mayor participación bajo deficiencia de hierro. Sin embargo, presentan cierta afinidad por otros micronutrientes, pudiendo reducir la concentración de hierro en la planta y, por lo tanto, la calidad nutricional de los alimentos en relación a este mineral.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS ACCESIONES DE TARWI

3.1.1 Obtención del material vegetal

Las semillas de los genotipos precoces (20) y tardíos (25) de tarwi, fueron obtenidos del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) Huancayo (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de las 45 accesiones de tarwi utilizados en la tesis

Código del investigador	Código de la accesión	Ecotipo	Días a la floración	Origin		Seed physics characteristics									
				Departamento	Provincia	P100S (gr.)	Largo (mm.)	Ancho (mm.)	Forma	Brillo	Color	Intensidad del color	Color secundario	Intensidad del color secundario	Distribución del color secundario
P01	PER006145	Precoz	119	Cusco	Cusco	27.84	10.11	8.15	Cuboide	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P02	PER005098	Precoz	113	Cajamarca	Celendin	25.33	10.06	7.72	Lenticular	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P03	PER006032	Precoz	106	Cusco	Cusco	20.8	8.5	7.1	Oval	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P05	PER006026	Precoz	120	Cusco	Cusco	21.05	9.39	6.97	Lenticular	Brillo	Blanco	Claro	Marrón	Claro	Ceja vetada
P06	PER004918	Precoz	112	Ancash	Huari	24.5	9.51	7.65	Oval	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P07	PER006389	Precoz	107	Junin	Concepción	23.41	10.4	8.86	Lenticular	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
P08	PER005983	Precoz	86	Cusco	Cusco	25.97	10.23	8.46	Lenticular	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P09	PER004935	Precoz	112	Cusco	Cusco	22.07	9.99	8.18	Cuboide	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
P10	PER006068	Precoz	120	Cusco	Cusco	26.52	10.59	8.54	Oval	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P11	PER005942	Precoz	95	Cusco	Cusco	25.17	10.28	8.04	Lenticular	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P12	PER005430	Precoz	107	Ancash	Mariscal Luzuriaga	25.74	9.76	8.06	Esférico	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P13	PER005432	Precoz	112	Ancash	Corongo	26.71	10.77	8.22	Esférico	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P14	PER006007	Precoz	120	Cusco	Cusco	28.04	11.41	9.28	Lenticular	Mate	Blanco	Oscuro	No	No	No
P16	PER005969	Precoz	86	Cusco	Cusco	30.64	11.62	9.34	Cuboide	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P17	PER005726	Precoz	86	Cusco	Paucartambo	21.99	9.49	8.08	Unknown	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P18	PER005994	Precoz	120	Cusco	Cusco	26.52	11.04	8.84	Lenticular	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
P20	PER005515	Precoz	112	Cajamarca	Cajabamba	26.19	10.48	8.43	Oval	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
P21	PER006302	Precoz	93	Junin	Huancayo	28.16	10.49	8.75	Ovalo plano	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
P22	PER006167	Precoz	122	Cusco	Cusco	24.14	10.59	7.99	Oval	Mate	Blanco	Medio	Marrón	Oscuro	Media luna
P25	PER005623	Precoz	86	Cusco	Paruro	23.5	10.24	8.5	Cuboide	Mate	Blanco	Claro	No	No	No
T01	PER005303	Tardío	140	Ancash	Carhuaz	18.33	9.14	7.18	Oval	Brillo	Blanco	Claro	No	No	No
T02	PER005304	Tardío	140	Ancash	Carhuaz	22.36	10.19	8.17	Lenticular	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
T03	PER005336	Tardío	140	Ancash	Huari	19.24	8.32	7.08	Esférico	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
T04	PER005338	Tardío	140	Ancash	Huari	18.5	8.7	7.2	Desconocido	Mate	Blanco	Medio	No	No	No
T05	PER005339	Tardío	140	Ancash	Huari	20.73	9.46	7.39	Oval	brillo	Blanco	Medio	No	No	No
T06	PER005341	Tardío	140	Ancash	Huari	19.52	8.94	7.5	Oval	Mate	Blanco	Medio	No	No	No
T07	PER005345	Tardío	140	Unknown	Unknown	18.99	8.66	7.48	Desconocido	brillo	Blanco	Medio	No	No	No
T08	PER005347	Tardío	140	Anchash	Unknown	22.29	9.77	7.81	Desconocido	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
T09	PER005350	Tardío	140	Unknown	Unknown	24.64	10.07	8.14	Oval	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
T10	PER005395	Tardío	140	Ancash	Yungay	19.42	8.94	7.55	Esférico	Brillo	Blanco	Oscuro	No	No	No
T11	PER005402	Tardío	140	Ancash	Huari	25.46	9.7	7.72	Esférico	Brillo	Blanco	Medio	No	No	No
T12	PER004845	Tardío	153	Cajamarca	Celendin	27.61	9.82	8.03	Oval	Mate	Blanco	Medio	Marrón	Oscuro	Media luna
T13	PER004847	Tardío	153	Cajamarca	Celendin	26.13	9.5	7.89	Oval	Brillo	Blanco	Medio	Marrón	Oscuro	Media luna
T14	PER004849	Tardío	153	Cajamarca	Celendin	25.12	9.31	7.65	Oval	Mate	Blanco	Medio	No	No	No
T15	PER004850	Tardío	153	Cajamarca	Cajamarca	24.12	9.37	7.72	Oval	Brillo	Blanco	Medio	Marrón	Oscuro	Media luna
T16	PER004903	Tardío	153	Cajamarca	Cajamarca	21.65	8.94	7.35	Oval	Mate	Blanco	Medio	No	No	No
T17	PER005006	Tardío	153	Cajamarca	Cajamarca	26.07	9.73	7.95	Ovalo aplanado	Mate	Blanco	Claro	No	No	No
T18	PER005007	Tardío	153	Cajamarca	Cajatambo	25.43	10.18	7.84	Oval	Mate	Blanco	Medio	No	No	No
T19	PER005121	Tardío	153	Cajamarca	Celendin	27.18	9.96	7.92	Oval	Brillo	Blanco	Oscuro	No	No	No
T20	PER005390	Tardío	166	Unknown	Unknown	18.31	9.55	7.27	Ovalo aplanado	Mate	Blanco	Claro	No	No	No
T21	PER005407	Tardío	166	Huancayo	Antonio Raimondi	20.03	8.89	7.4	Oval	Mate	Blanco	Claro	No	No	No
T22	PER005437	Tardío	158	Ancash	Corongo	25.35	10.18	8.3	Desconocido	Brillo	Blanco	Oscuro	No	No	No
T23	PER005471	Tardío	166	Cajamarca	Cajabamba	24.45	10.17	8.25	Oval	Brillo	Marrón	Oscuro	No	No	No
T24	PER005485	Tardío	166	Cajamarca	Celendin	23.37	9.61	8	Ovalo aplanado	Mate	Blanco	Claro	Marrón	Oscuro	Desconocido
T25	PER005550	Tardío	158	Cajamarca	Cutervo	24.86	10.28	7.97	Cuboide	Mate	Blanco	Medio	No	No	No

3.1.2 Experimentación

a. Caracterización morfológica y micronutricional para la selección de las accesiones de tarwi

Para la selección de las mejores accesiones tardías y precoces de tarwi, se realizó una caracterización a nivel de semilla, en donde se evaluó los rasgos morfológicos asociados a la semilla como el ancho de semilla (mm), largo de semilla (mm) y el peso de 100 semillas en gramos (Pereira et al., 2008). La caracterización micronutricional se basó en determinar el contenido de Fe, Zn, B, Cu y Mn, utilizando 10 g de semillas por repetición. En el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina fueron llevadas las muestras, en donde se trituraron, hasta su pulverización, con ayuda de un molino y secadas en una estufa a 70°C. Para el análisis de Fe, Zn, Cu y Mn, el polvo pasó por una digestión húmeda en una mezcla nitro-perclórica y la lectura se efectuó por espectrofotometría de absorción atómica (Zasoski y Bureau, 1970). La determinación de B se realizó por colorimetría, empleando la curcumina acética (Dible et al., 1954).

b. Selección de accesiones en base al perfil micronutricional

La selección de las mejores accesiones de tarwi se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios micronutricionales:

- Contenido de Fe > 40 ppm (Bouis y Saltzman, 2017).
- Contenido de Zn > 28 ppm (Bouis y Saltzman, 2017).
- Contenido de B > 13 ppm (Kuru et al., 2018).
- Contenido de Cu < 9 ppm (Shokunbi et al., 2019).
- Contenido de Mn < 30 ppm (VKM, 2018).

3.1.3 Análisis estadísticos

a. Selección de las accesiones de tarwi por su perfil micronutricional (Fe, Zn, B, Cu y Mn) y características relacionadas a la semilla (peso de 100 semillas, así como el largo y ancho de semilla)

Los resultados obtenidos del punto a fueron sometidos a la prueba de normalidad e igualdad

de varianzas de acuerdo a Kolmogorov – Smirnov y posteriormente se utilizó el CME del ANOVA para evaluar la variabilidad (Rueda Restrepo et al., 2009) y el análisis de conglomerados utilizando la distancia de Mahalanobis permitió seleccionar los mejores grupos (Escobedo y Salas, 2008)

3.2 IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS TRANSCRIPTOS ASOCIADOS A LA HOMEOSTASIS DE HIERRO A PARTIR DE UNA DATA TRANSCRIPTÓMICA PREVIA HECHA EN TARWI.

3.2.1 Recopilación y validación de los genes asociados a la ruta de homeostasis de hierro en *Arabidopsis thaliana*.

La información de los genes asociados a la homeostasis de hierro en *Arabidopsis thaliana* L. se obtuvo por expresión global de genes realizados en los artículos científicos de Li y Lan (2017) y Naranjo-Arcos et al. (2017). Esta información fue revalidada con la base de datos de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org), siendo 16 los genes identificados (Tabla 4).

3.2.2. Comparación y selección de las secuencias involucradas con la homeostasis de hierro de tarwi con las secuencias del punto 3.2.1.

El análisis del blasteo involucró los siguientes pasos: (1) descargar las secuencias del punto 3.2.1 en formato fasta de las proteínas implicadas en homeostasis de hierro (Tabla 2). (2) búsqueda de las proteínas homólogas en las siguientes especies: *Glycine maxima* L., *Glycine soja* L., *Arachis hypogaea* L., *Arachis ipaensis* L., *Cicer arietinum* L., *Medicago truncatula* L., *Cajanus cajan* L., *Vigna unguiculata* L. y *Lupinus angustifolius* L. a través de Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) en NCBI. Las secuencias de los puntos (1) y (2) fueron comparados contra la data de la información proteica de tarwi proveniente de los trabajos de la tesis de Hidalgo (2021) y Ramos (2021) por medio del programa BLAST en la plataforma LINUX. La anotación de los genes de tarwi relacionados a la homeostasis de hierro se realizó teniendo en cuenta un e-valor menor a 1×10^{-50} (Lobos, 2008). Para un análisis funcional más profundo de las secuencias proteicas relacionada con la absorción, translocación y almacenamiento de hierro en tarwi, se identificó los dominios y motivos para cada proteína, utilizando InterPRO (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y software *in silico* MEME (<https://meme-suite.org/meme/>), respectivamente. Para la identificación de los dominios con función biológica validada, se utilizó la secuencia proteica de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Dentro de la plataforma de interPRO,

fueron seleccionados los dominios predichos por el software InterPRO y PHANTER, ya que coinciden con la funcionalidad de los dominios, así como su ubicación dentro de la secuencia proteica de *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 3. Reglas para la determinación de la secuencia consenso

Reglas (En la misma posición dentro del alineamiento múltiple)	Símbolo	Referencia
(1) La frecuencia del aminoácido es un 100%, el consenso se escribe con mayúscula.	A	Hernández et al. (2019)
(2) La frecuencia del aminoácido es más de un 50%, el consenso se escribe con minúscula.	A	Hernández et al. (2019)
(3) La frecuencia de espacios vacíos superan más del 50%, el consenso está representado por el signo “menos”	-	Porebski y Buckle (2016)
(4) Si no se cumple la regla 1, 2 y 3, el consenso está representado por el signo “más”.	+	Porebski y Buckle (2016)
(5) Si dos aminoácidos en igual proporción superan más del 50% de los aminoácidos, el consenso estará representado como una fracción.	A/B	https://meme-suite.org/meme/

Además, estos softwares fueron seleccionados por la actualización constante de su base de datos (InterPRO) y por la utilización de secuencias curadas en la predicción de dominios (PHANTER). Con el software MEME se realizó la predicción de motivos, utilizando todas las secuencias de aminoácidos de las especies descritas en el punto 3.2.1 y 3.2.2 para cada proteína. También se determinó la secuencia consenso con ayuda del programa bioinformático MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), teniendo en cuenta las reglas descritas en la Tabla 3.

Tabla 4. Genes involucrados en la ruta de homeostasis de hierro en *Arabidopsis thaliana*

Genes	Nombre del gen	Código del gen
Proteínas transportadoras de corta distancia		
IRT1	Transportador regulado por hierro 1	AT4G19690.2
NRAMP1	Proteína 1 de macrófagos asociada a la resistencia natural	AT1G80830.1
NRAMP3	Proteína 3 de macrófagos asociada a la resistencia natural	AT2G23150.1
VIT1	Transportador de hierro vacuolar 1	AT2G01770.1
TIC21	Translocón 21 de la membrana interna del cloroplasto	AT2G15290.1
Proteínas transportadoras de larga distancia		
OPT1	Transportador de oligopéptidos 1	AT5G55930.1
OTP3	Transportador de oligopéptidos 3	AT4G16370.1
OTP7	Transportador de oligopéptidos 7	AT4G10770.1
YSL1	Yellow stripe like 1	AT4G24120.1
YSL3	Yellow stripe like 3	AT5G53550.1
FRD3	Reductasa férrica defectuosa 3	AT3G08040.1
Proteína de almacenamiento		
FER2	Ferritina 2	AT3G11050.1
Enzimas de oxidación-reducción de hierro		
FRO2	Ferroquelato reductasa 2	AT1G01580.1
FRO7	Ferroquelato reductasa 7	AT5G49740.1
Transportador de protones		
AHA2	ATPasa 2	AT4G30190.1
Enzimas productoras de fitosideróforos		
NAS	Nicotianamina sintasa	AT5G04950.1
SAMS3	S-adenosylmethionina sintetasa 3	AT3G17390.1

3.3 ESTUDIO DE LOS MECANISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA HOMEOSTASIS DE HIERRO BAJO CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE ESTE MICRONUTRIENTE

3.3.1 Experimento bajo deficiencia de hierro

De las accesiones de tarwi seleccionadas en la etapa 3.1.2.1, la accesión T25 fue seleccionada por su bajo CVM de Fe, Zn, B, Cu y Mn (6.53 %) (Anexo 1) junto el cultivar Andenes (testigo) y sembrados bajo solución hidropónica Murashike Skoog (1962) sin hierro. A las

dos semanas de sembrados T25 y Andenes se colectó, por separado, hojas, tallo y raíz que presenten la sintomatología de clorosis, los cuales fueron utilizados para realizar el experimento de expresión génica y para el análisis estadístico. Se utilizó tres réplicas técnicas.

3.3.2 Análisis de expresión génica

La ruta de homeostasis de hierro integra la expresión de genes asociados a la absorción, transporte y almacenamiento (Tabla 3) (Morrissey y Guerinot, 2009). El material colectado (hojas, tallos y raíces) de las accesiones seleccionadas en el punto 3.3.1 fue preservado a -80 ° C hasta su procesamiento. El ARN total fue aislado con TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El ARN total (2.5 µg) fue tratado con DNase I (Fermentas) a fin de eliminar el ADN restante. El cADN fue sintetizado con oligo dT (Invitrogen) usando SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La transcriptasa reversa-PCR semi-cuantitativo (RT-PCR) se realizó con primers específicos de cada gen. El gen 18S rRNA fue usado como control para asegurar una carga igualitaria de cADN en cada muestra (Robinson et al., 2007). La cuantificación de las variaciones se hizo midiendo la intensidad de las bandas usando ImageJ Software. El análisis de PCR fue llevado a cabo 3 veces con 3 repeticiones técnicas independientes.

3.3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los puntos 3.3.1 y 3.3.2 fueron sometidos a las pruebas de normalidad e igualdad de variancia de acuerdo a Kolmogorov – Smirnov. Posteriormente se evaluaron las diferencias significativas entre los tratamientos mediante el test de Duncan, así como el análisis de variancia de un solo factor (ANOVA) (Ferreira et al., 2019).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 EVALUACIÓN Y SELECCIÓN LAS ACCESIONES DE TARWI

4.1.1 Caracterización micronutricional y morfológica de las semillas

a. Caracterización micronutricional de las semillas

La caracterización de micronutrientes realizada en las accesiones de tarwi, reveló que la variabilidad en el contenido de hierro, zinc, boro, cobre y manganeso fue mayor en las accesiones de floración temprana que en las de floración tardía (Figura 4A). En cuanto al nivel de Fe, el tarwi es superior a *Dolichos lablab* (27 ppm), *Phaseolus aureus* (41.5 ppm), *Cajanus cajan* (19 ppm), *Phaseolus mungo* (38 ppm) (Kamboj y Nanda, 2018), *Phaseolus vulgaris* de tipo riñón (23 ppm), *Phaseolus vulgaris* de tipo blanco (16 ppm), *Lens culinaris* de tipo verde (20 ppm), *Lens culinaris* de tipo marrón (15 ppm), *Cicer arietinum* (13 ppm) (Margier *et al.* 2018), *Vigna unguiculata* (20 a 24 ppm) (Gondwe *et al.*, 2019), *Vigna radiata* (34 a 44 ppm) (Kumar y Pandey, 2020) y especies monocotiledóneas (Ancuceanu *et al.*, 2015). Sin embargo, la cantidad de Fe en tarwi fue similar a las siguientes leguminosas: *Vicia faba* (67.7 ppm a 69.75 ppm), *Cicer arietinum* (46 ppm), *Vigna mungo* (44 ppm), *Lens esculenta* (75.8 ppm), *Phaseolus vulgaris* (54.6 ppm), (Fetahu *et al.*, 2014; Hossain *et al.*, 2013; Kamboj y Nanda, 2018 y Khursheed y Khan, 2016). Philipo *et al.* (2020) reportaron genotipos de *Phaseolus vulgaris* con mayor contenido de Fe a diferencia de las concentraciones de hierro encontradas en tarwi. Por otro lado, el nivel de Zn en tarwi fue más alto que *Pisum sativum* (10.1 a 20.4 ppm) (Kumar y Pandey, 2020), *Vicia faba* (31.4 a 33.3 ppm) (Khursheed y Khan, 2016), *Vigna unguiculata* (7 a 8 ppm) (Gondwe *et al.*, 2019), *Vigna radiata* (12 a 21 ppm) (Kumar y Pandey 2020), *Phaseolus vulgaris* tipo riñón (9.4 ppm), *Phaseolus vulgaris* tipo blanco (7.6 ppm), *Cicer arietinum* (11 ppm), *Lens culinaris* tipo verde (9.9 ppm), *Lens culinaris* tipo marrón (6.7 ppm) (Margier *et al.*, 2018) y *Phaseolus vulgaris* (13 a 38 ppm) (Fetahu *et al.*, 2014; Hossain *et al.*, 2013).

Sin embargo, la cantidad de Zn en estas accesiones de tarwi fue similar a lo reportado en *Phaseolus vulgaris* (17 a 54 ppm) por Blair et al. (2013) y en *Glycine max* (36.6 a 40.5 ppm) por Rigo et al. (2018). El contenido de B en estas accesiones de tarwi fue superior al de *Cicer arietinum* (10.3 ppm) y *Phaseolus vulgaris* (13 ppm) (Kuru et al., 2018).

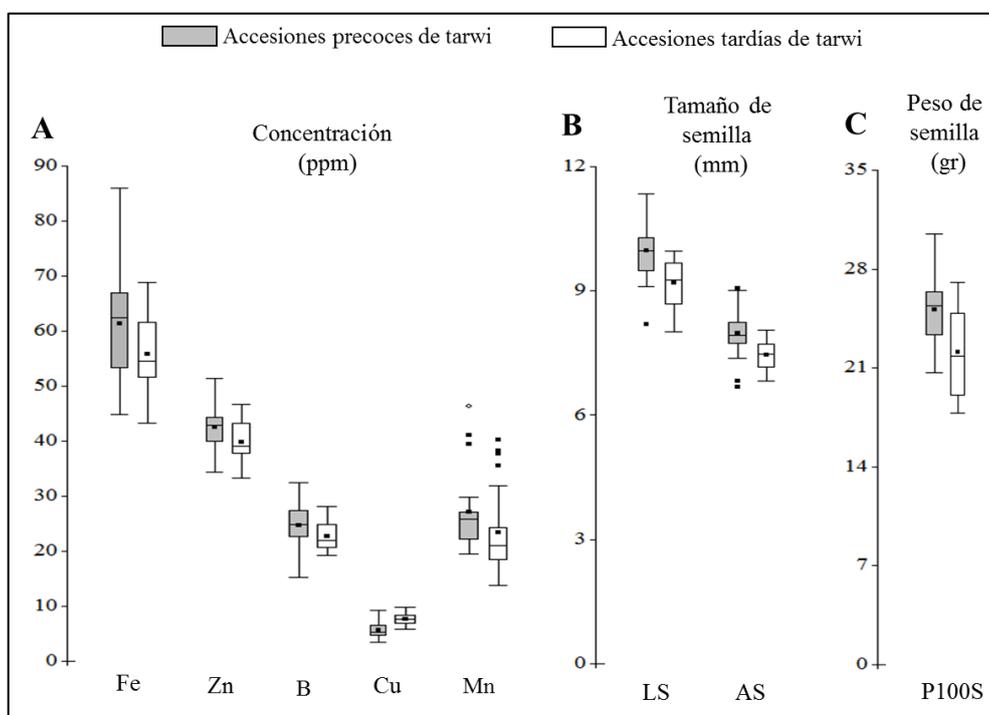


Figura 4. Caracterización micronutricional y morfología de las accesiones de tarwi Caracterización basada (A) el contenido de Fe, Zn, B, Cu and Mn, (B) largo de semilla (SL) y ancho de semilla (WS), y (C) el peso de 100 semillas (P100S).

Sin embargo, la concentración de B presente en las semillas de *Phaseolus vulgaris* (Blair et al., 2013) y *Glycine max* (Rigo et al., 2018) fue similar a la encontrada en tarwi (Figura 4A). Los niveles de Cu y Mn en tarwi fueron más altos que los de *Phaseolus vulgaris* (2 y 5.5 ppm) (Blair et al., 2013), *Phaseolus vulgaris* de tipo riñón (4.4 y 27 ppm), *Phaseolus vulgaris* de tipo blanco (2.2 y 5.5 ppm), *Cicer arietinum* (2.1 y 3.9 ppm), *Lens culinaris* de tipo verde (2.1 a 3.8 ppm) y *Lens culinaris* de tipo marrón (1.9 y 8 ppm) (Margier et al., 2018).

El contenido de Cu (8.5 a 15.3 ppm) y Mn (25.2 a 33.3 ppm) en *Glycine max* reportado por Rigo et al. (2018) fueron similares a estas accesiones de tarwi. Por lo tanto, las concentraciones de Fe, Zn, B, Cu y Mn en tarwi mostraron ser superiores a las de otras legumbres alimentarias importantes. Finalmente, los únicos dos micronutrientes que tuvieron una correlación significativa y positiva fueron Mn y Zn (Tabla 5). Este patrón

también se observó en *Phaseolus vulgaris* (Blair et al., 2013; Gouveia et al., 2014; Beebe et al. 2000) y *Lens culinaris* (Toklu et al., 2015). Además, Redd et al. (1978) reportaron que la interacción de Mn y Zn en soja afectó la absorción y la translocación. Sin embargo, Paredes et al. (2009), Sarker et al. (2018) y Gerrano et al. (2015) no reportaron esta interacción en *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris* y *Vigna unguiculata*.

Tabla 5. Análisis de correlación del contenido micronutricional (Fe, Zn, B, Cu y Mn) y rasgos morfológicos (LA, AS y P100S) estudiados en tarwi

B								
Cu	-0.1478							
Fe	-0.0342	-0.1476						
Mn	0.1184	0.1337	0.0405					
Zn	0.0099	0.0865	0.0479	0.329				
LS	0.5598	-0.4427	0.0004	0.1325	0.0757			
AS	0.6308	-0.3149	0.0427	0.1274	0.1307	0.8904		
P100S	0.5889	-0.2774	0.1481	0.0934	0.1162	0.7558	0.7479	
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	LS	AS	P100S

Los resultados en amarillos son significativos bajo un valor de Alpha=0.05.

b. Caracterización morfológica de las semillas

Las características de las semillas en: largo (LS), ancho (AS) y peso de 100 semillas (P100S) en las accesiones de floración temprana tuvieron una mayor variabilidad que en las accesiones de floración tardía (Figuras 4B y 4C). Así, el P100S en tarwi fue superior al reportado por Buircell y Cowling (1998) en *Lupinus angustifolius* (11.3 g), *Lupinus cosentinii* (16.3 g), *Lupinus digitatus* (12 g), *Lupinus hispanicus* (6.4 g), *Lupinus luteus* (9.7 g), *Lupinus micranthus* (8.7 g) y también fue mayor a *Lens sculenta* (3 a 7.5 g) (Santos et al., 2018; Vandermark et al., 2014; Zhong et al. 2018). Asimismo, el P100S obtenido por Santos et al. (2018), Zhong et al. (2018) y Fageria et al. (2009) en *Lathyrus sativus* (15 g), *Vigna radiata* (3.6 g) y *Cajanus cajan* (12.1 g), fue menor al obtenido en tarwi. Por otro lado, la información sobre el P100S en *Dolichos lablab* (23.4 g), *Cicer arietinum* (29.9 g), *Glycine max* (18.3 a 23.9 g) y *Phaseolus vulgaris* (27 g) proporcionados por Fageria et al. (2009), Sarika et al. (2019), Teng et al. (2009), Sjamsijah et al. (2020) y Darkwa et al. (2016) fue similar al tarwi. Sin embargo, las accesiones de tarwi solo superaron el 10 % de los genotipos de *Phaseolus vulgaris* estudiados por Sinkovič et al. (2019).

El LS en tarwi fue mayor a lo descrito por Kang y Primack (1999) en las familias *Papilionoidea* (2.2 a 3.4 mm), *Mimosoideae* (4.6 a 5.3 mm) y *Caesalpinioideae* (5 a 6.2

mm). Dentro de las *Fabaceae*, las dimensiones de LS y AS en semillas de tarwi fueron mayores a lo reportado por Fuller y Harvey (2006) en *Macrotiloma uniflorum* (4.4 a 6.3 mm y 2.5 a 5.2 mm), *Cajanus cajan* (4.6 a 7 mm y 4.2 a 6.4 mm), *Vigna unguiculata* (3.4 a 7.7 mm y 3.5 a 5.4 mm), *Vigna radiata* (2.9 a 4.7 mm y 2.6 a 3.8 mm), *Vigna mungo* (3.6 a 5.5 mm y 2.9 a 4.5 mm), *Vigna aconitifolia* (3.1 a 4.5 mm y 2.2 a 2.9 mm), *Vigna umbellata* (5.0 a 6.5 mm y 2.6 a 3.9 mm), *Vigna angularis* (3.2 a 7.3 mm y 2.9 a 5.9 mm), *Vigna trilobata* (2.7 a 3.4 mm y 2.2 a 2.6 mm), *Vigna radiata sublobata* (2.9 a 3.3 mm y 1.2 a 1.6 mm) y *Vigna mungo sylvestris* (2.7 a 3.6 mm y 1.9 a 2.5 mm). Sin embargo, el LS en *Phaseolus vulgaris* (Sinkovič et al., 2019) fue mayor, pero el AS fue similar al tarwi. La variabilidad presente en P100S, LS y AS fue mayor que la reportada en otras leguminosas, sumadas a su alto contenido de proteínas (Gulisano et al., 2019), contenido de aceite (Chirinos-Arias, 2015) y micronutrientes (Figura 4A), lo convierten en un cultivo con alto potencial para la industria de alimentos.

4.1.2 Evaluación de la variación ambiental (V_e)

Analizar el efecto del ambiente sobre la expresión fenotípica de los rasgos es fundamental para la selección de plantas. Por lo tanto, se utilizó el cuadrático medio de error (CME) del ANOVA para estimar la varianza ambiental (Malek et al., 2014) para el contenido de micronutrientes (Fe, Zn, B, Cu y Mn), tamaño de semillas (LS y AS) y P100S. El contenido de Fe, Cu y Mn en el tarwi fue menos influenciado por el ambiente, ya que su CME fue menor y el ANOVA fue significativo para estas características; por lo tanto, una selección fenotípica para estos micronutrientes podría ser más efectiva en comparación con Zn y B (Tabla 6). Además, la V_e para Fe de las accesiones tardías y precoces de tarwi fueron menores que lo reportado para *Phaseolus vulgaris* (104.5 a 390.3) (Gomes et al., 2020; Hossain et al., 2013; Muhamba-Tryphone y Nchimbi-Msolla 2010). Este patrón también fue observado por Gerrano et al. (2015) en *Vigna unguiculata* (1970.9). Sin embargo, solo las accesiones tardías de tarwi tienen una V_e para Fe menor que *Lens culinaris* (58.2) (Shrestha et al., 2018), *Cicer arietinum* (55.8) (Jayalakshmi et al., 2018) y *Pisum sativum* (46.2) (Ray et al., 2018). Por otro lado, la V_e para el contenido de Cu en tarwi fue menor que *Phaseolus vulgaris* (9.4) (Hossaim et al., 2013), *Cicer arietinum* (18.9) (Jayalakshmi et al., 2018) y *Pennisetum glaucum* (5.3) (Kumar et al., 2020). Sin embargo, solo la V_e de Cu en los genotipos de floración tardía fue menor que en *Vigna unguiculata* (1.5) (Gerrano et al., 2017), *Phaseolus vulgaris* (1.5) (Ray et al., 2018) y *Pisum sativum* (1.1) (Ray et al., 2018).

En contraste, la *Ve* para el contenido de Mn de tarwi también resultó ser menor que la de *Vigna unguiculata* (1153.7) (Gerrano et al., 2017), *Cicer arietinum* (60.9) (Jayalakshmi et al., 2018) y *Pennisetum glaucum* (22.8) (Kumar et al., 2020). Pero solo la *Ve* para el contenido de Mn en las accesiones de floración tardía fue menor que el de *Phaseolus vulgaris* (9.4) (Gomes et al., 2020).

En relación al peso de 100 semillas (P100S), el *Ve* (1.9) reportado por Saba et al. (2016) fue mayor a lo registrado en tarwi (Tabla 6). Asimismo, *Cajanus cajan* (Verma et al., 2018) y *Cicer arietinum* (Manasa et al., 2020) presentaron valores de *Ve* más altos en comparación con tarwi (Tabla 5). Este patrón también se observó para *Glycine Max* (0.5 a 2.4) (Chandrawat et al., 2017 y Kuswanto 2019 y Saki et al., 2009). En contraste, la *Ve* para LS y AS en semillas de tarwi fue ligeramente más alto que en *Phaseolus vulgaris* (0.02) (Saba et al., 2016) y *Cicer arietinum* (0.02) (Takkuri et al., 2017). A pesar de este leve incremento no se descarta la importancia de estas características para seleccionar genotipos con excelente tamaño de semilla, pues el ANOVA fue altamente significativo (Tabla 6).

Table 6. Estimación de la variabilidad ambiental (*Ve*) asociada al contenido micronutricional y rasgos morfológicos de las semillas de tarwi

Características	Accesiones tardías de tarwi	Accesiones precoces de tarwi
	<i>Ve</i>	<i>Ve</i>
Fe	73.276****	46.478***
Zn	30.75	32.65
B	49.284	11.75
Cu	2.095***	0.934****
Mn	17.566****	5.712****
Largo de Semilla (LS)	0.052****	0.051****
Ancho de Semilla (AS)	0.028****	0.033****
Peso de 100 Semillas (P100S)	0.486****	0.018****

Valores de significancias: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$ y **** $p < .0001$.

4.1.3 Selección de accesiones de tarwi

El Análisis de Componentes Principales (PCA) se realizó con el fin de seleccionar los rasgos de mayor importancia dentro de las variables micronutricionales y físicas evaluadas en estos dos grupos de accesiones de tarwi (Figura 5A). Dentro de este análisis, los dos primeros componentes explicaron el 41 % y el 17 % de la varianza fenotípica total (Figura 3B). Donde el contenido de Zn, Mn y B contribuye significativamente ($p < 0.05$) en la selección de genotipos de tarwi (Figura 5B). El contenido de Zn tuvo una contribución importante para clasificar los genotipos de tarwi, como se informó en *Phaseolus vulgaris* (Yeken et al., 2018) y *Cicer arietinum* (Aliu et al., 2016). Sin embargo, esta característica no fue importante para *Sphenostylis stenocarpa* (Alake y Poberni, 2020), *Vigna subterranea* (Alake y Alake, 2016), *Vigna unguiculata* (Gerrano et al., 2017), *Vicia faba* (Baloch et al., 2014) y *Lens culinaris* (Karaköy et al., 2012). Además, el contenido de B permitió una buena clasificación fenotípica en tarwi en comparación a los reportado en *Vigna unguiculata* (Gerrano et al., 2017). Este patrón también se observó para el contenido de Mn, permitiendo una mejor clasificación de genotipos en tarwi, a diferencia de *Vigna unguiculata* (Gerrano et al., 2017), *Lens cuinaris* (Karaköy et al., 2012) y *Cicer arietinum* (Aliu et al., 2016).

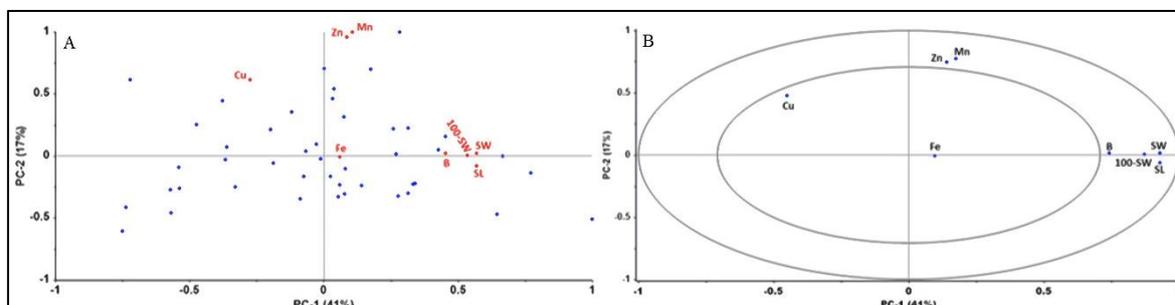


Figura 5. Análisis de componentes de las principales de las accesiones tardías y precoces de tarwi

(A) Gráfico Biplot de la distribución de las accesiones de tarwi para PC1 vs PC2 (B) Gráfico de correlación del análisis de componentes principales para hierro, zinc, boro, cobre, manganeso, largo de semilla, ancho de semilla y el peso de 100 semillas.

Por otro lado, la Figura 3B también muestra la importancia de LS, AS y P100S en la selección de genotipos. La selección basada en LS y AS fue más eficiente en tarwi que en *Phaseolus vulgaris* (Saba et al., 2016; Sinkovič et al., 2019 y Yeken et al., 2018), *Phaseolus coccineus* (Sinkovič et al., 2019), *Vicia Faba* (Baloch et al., 2014) y *Cicer arietinum* (Al-Saady et al., 2019).

El P100S fue un rasgo menos eficiente para seleccionar genotipos en *Sphenostylis*

stenocarpa (Aleke y Poberni, 2019) y *Cicer arietinum* (Mahmood et al., 2018) que en tarwi. Sin embargo, Al-Saady et al. (2019) mostraron que P100S tiene una mayor contribución a la selección fenotípica en *Cicer arietinum*. Para seleccionar los mejores genotipos se utilizó el análisis de conglomerados utilizando la distancia de Mahalanobis. En base al P100S, las accesiones de floración tardía se subdividieron en 12 accesiones con P100S > 23 g y 13 accesiones con P100S < 23 g (Figura 4A). Mientras que 20 accesiones de floración temprana se dividieron en dos subgrupos, 2 genotipos con P100S < 21 g y 18 genotipos con P100S > 21 g (Figura 6A).

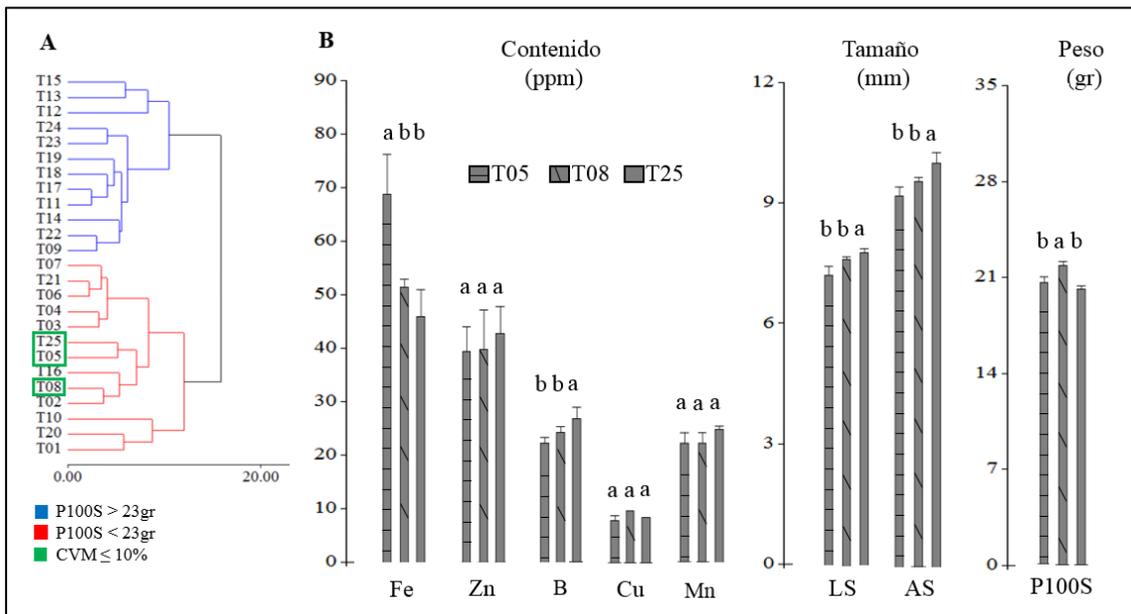


Figura 6. Selección y caracterización de las tres accesiones tardías de tarwi
A) análisis cluster y selección en base al P100S, criterios micronutricionales y la variación de micronutrientes (MCMVmicronutriente $\leq 10\%$). y B) Descripción del contenido de Fe, Zn, B, Cu, Mn, LS, AS y P100S.

Para una selección eficiente de las semillas se utilizaron los criterios que corresponden a una alimentación saludable en micronutrientes (Fe > 40 ppm, Zn > 28 ppm, B > 13 ppm, Cu < 9 ppm y Mn < 30 ppm) y el coeficiente medio de variación para micronutrientes (CVM $\leq 10\%$), lo que nos permitió seleccionar tres accesiones de floración tardía (T05, T08 y T25) y tres accesiones de floración temprana (P14, P16 y P21) por su contenido adecuado de micronutrientes (Figura 6B, 7B y Anexo 1) y sus excelentes rasgos asociados a la semilla (Figura 6B, 7B y Anexo 1), a diferencia de *Phaseolus vulgaris* L. (Beebe et al., 2000; Blair et al., 2013; Gouveia et al., 2014; Paredes et al., 2009), *Vicia faba* (Etemadi et al., 2018), *Lens culinaris* M. (Sarker et al., 2018), *Vigna unguiculata* (Gerrano et al., 2017), *Glycine max* (Rigo et al., 2018) y *Arachis Hypogaea* (Phan Thien et al., 2010). El material vegetal

utilizado para el cumplimiento del tercer objetivo fue el T25 (47.00 ppm), el cual fue comparado con el cultivar "Andenes" (control), para identificar los genes asociados a la homeostasis de hierro en tarwi y conocer que genes se sobreexpresan bajo deficiencia de hierro, convirtiéndolos en críticos para la generación de cultivares biofortificados.

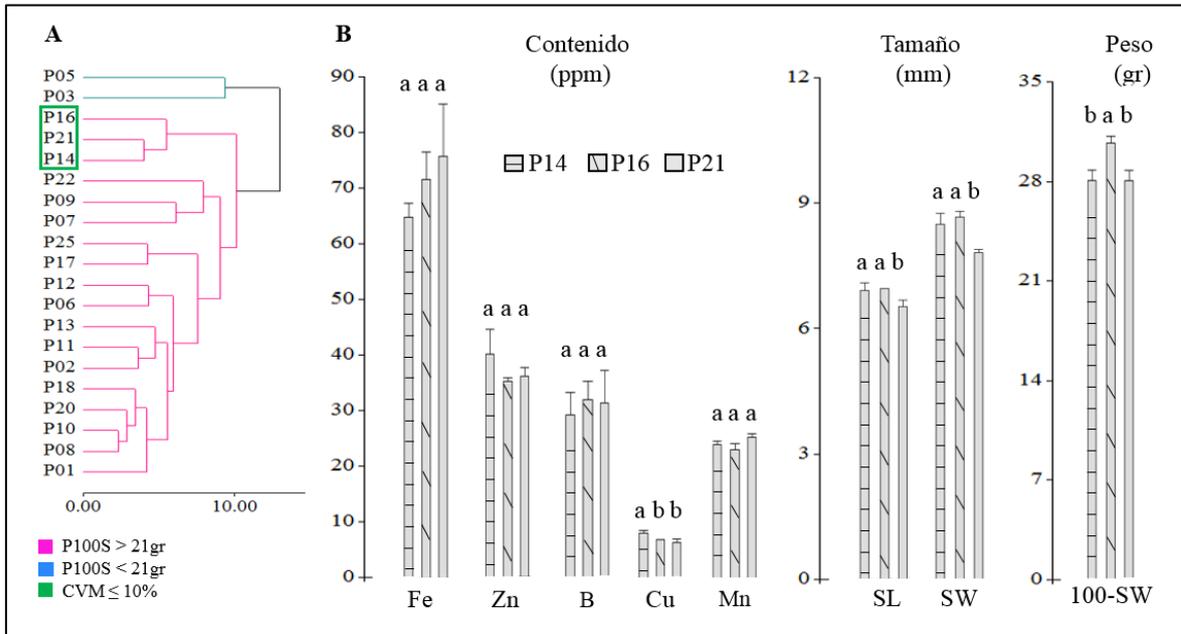


Figura 7. Selección y caracterización de las tres accesiones precoces de tarwi

(A) análisis cluster y selección en base al P100S, criterios micronutricionales y la variación de micronutrientes ($CVM_{micronutriente} \leq 10\%$) y B) Descripción del contenido de Fe, Zn, B, Cu, Mn, LS, AS y P100S.

4.2 IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS TRANSCRIPTOS ASOCIADOS A LA HOMEOSTASIS DE HIERRO EN TARWI

La variación de micronutrientes ($CVM \leq 10\%$) de los genotipos de tarwi seleccionados fue mínima y se observaron muy pocas diferencias significativas (Figura 3B, 4B y Anexo 1). Esto podría deberse a una alta especificidad de las proteínas asociadas con la absorción, translocación, removilización y/o almacenamiento de estos micronutrientes (Vera-Vega et al., 2022). Por lo tanto, para esta investigación se hizo necesaria la identificación de las proteínas implicadas en la absorción, translocación y almacenamiento de hierro en tarwi.

4.2.1 Identificación de los transcriptos implicados en los mecanismos de absorción, transporte y almacenamiento de hierro en tarwi

Los resultados obtenidos de la comparación entre el transcriptoma de tarwi con respecto a la

base de datos conjunta entre *Glycine max* L. (Glym), *Glycyne soja* L. (Glys), *Arachis hypogaea* L. (Arah), *Arachis ipaensis* L. (Ahai), *Cicer arietinum* L. (Cica), *Medicago truncatula* L. (Medt), *Cajanus cajan* L. (Cajc), *Vigna unguiculata* L. (Vigu), *Lupinus angustifolius* L. (Lupina) y *Arabidopsis thaliana* L. (At), revelaron 16 genes asociados en la absorción, transporte y almacenamiento de hierro exclusivas en tarwi (Tabla 6). Estas secuencias se caracterizan por tener un porcentaje de identidad que varía entre 72.98 % a 95.36 %. Además, el e-valor y bit score variaron entre 0 a 2,22E-93 y 324 a 1776, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Transcritos asociados a los mecanismos de absorción, transporte y almacenamiento de hierro en tarwi

ACRÓNIMO	ARABIDOPSIS AGI	HOMOLOGO EN <i>LUPINUS MUTABILIS</i>	% DE IDENTIDAD	E- VALOR	BITE SCORE
RAÍZ					
Gen que regula la exudación de protones					
AHA2	AT4G30190.1	TRINITY DN26268 c0_g1_i1	92.05	0	1776
Gen que regulan el proceso de óxido reducción					
FRO2	AT1G015801	TRINITY DN10820 c0_g1_i1	72.78	0	686
Genes que regulan la biosíntesis de fitosideróforos					
NAS1	AT5G04950.1	TRINITY DN19184 c0_g1_i1	76.73	3.00E-139	488
SAMS3	AT3G17390.1	TRINITY DN21351 c2_g2_i1	95.36	0	610
Gen que regulan el transporte de larga distancia					
YSL1	AT4G24120.1	TRINITY DN22586 c0_g1_i1	80.14	0	1112
TALLO					
Genes que regulan el transporte de larga distancia					
FRD3	AT3G80040.1	TRINITY DN18069 c0_g2_i2	74.16	0	789
OPT1	AT5G55930.1	TRINITY DN19860 c0_g1_i1	76.78	0	1214
OPT3	AT4G16370.1	TRINITY DN22490 c0_g2_i5	89.4	0	1373
OPT7	AT4G10770.1	TRINITY DN23386 c11_g1_i1	86.08	0	1346
YSL3	AT5G53550.1	TRINITY DN25538 c2_g6_i4	80.98	0	1128
HOJA (Vacuola)					
Genes que regulan el transporte de corta distancia					
NRAMP1	AT1G80830.1	TRINITY DN24501 c1_g5_i3	84.71	0	771
NRAMP3	AT2G23150.1	TRINITY DN19831 c0_g1_i2	78.02	0	775
VIT1	AT2G01770.1	TRINITY DN10042 c0_g1_i2	86.07	5.00E-109	410
HOJA (Cloroplasto)					
Gen que regula el almacenamiento					
FER2	AT3G11050.1	TRINITY DN20442 c0_g2_i2	73.11	2.22E-93	324
Gen que regulan el transporte de corta distancia					
TIC21	AT2G15290.1	TRINITY DN19531 c0_g1_i2	81.24	6.00E-113	410
Gen que regulan el proceso de óxido reducción					
FRO7	AT5G49740.1	TRINITY DN14213 c0_g1_i10	75.32	0	1131

4.2.2 Caracterización *In silico* de las proteínas implicadas en la homeostasis de hierro en tarwi

Para esta etapa se utilizó la base de datos del trasdecoder del ensamblaje de tarwi (Ramos, 2021; Hidalgo, 2021) para identificar las secuencias de aminoácidos de los transcritos asociados a los mecanismos de absorción, transporte y almacenamiento de hierro en tarwi (Tabla 7), los cuales fueron utilizados para la caracterización *in silico* en el punto a al c.

a. Análisis filogenético, motivos conservados y dominios de las proteínas implicadas en la homeostasis de hierro a nivel de célula radicular.

Los resultados indicaron que la proteína YSL1 y las enzimas NAS1, SAMS3, AHA2 y FRO2 pueden estar involucradas en el mecanismo de absorción de hierro del tarwi (Tabla 7). La enzima AHA2 es sensible a cambios repentinos en el pH del suelo, facilitando la biodisponibilidad de hierro a través de la liberación de protones a la rizosfera en condiciones de estrés abiótico (Lager et al., 2010), convirtiéndola en un componente importante en la adquisición de este mineral en suelos marginales (Alcántara et al., 1991). Mediante análisis bioinformático se identificó a la secuencia TRINITY DN26268 c0_g1_i1 como una ATPasa del tipo H en tarwi con un porcentaje de identidad del 92,05 % (Tabla 6). El análisis filogenético agrupó en el mismo clúster a tarwi (TRINITY DN26268 c0_g1_i1) con los ortólogos de *Cicer arietinum* (*CiaAHA4*) y *Medicago truncatula* (*MetdAHA4*) (Figura 8A). Se utilizó *AtAHA2* para predecir un dominio funcional altamente conservado que es propio de bacterias, arqueas y eucariotas conocidas como P-type ATPase, subfamily IIIA (Pedersen et al. 2007) y cuya actividad es el transporte de iones específicos, entre ellos el hidrógeno (H^+), por la membrana celular utilizando la hidrólisis de ATP como fuente de energía (Stock et al., 2023). Este dominio en la secuencia TRINITY DN26268 c0_g1_i1 se encuentra ubicado entre el aminoácido 39 al 880 (Anexo 1). De los 27 motivos predichos por MEME, los motivos 5, 9, 23 y 26 no coinciden con la región del dominio P-type ATPase, subfamily IIIA predicho para esta enzima (Figura 8A y Anexo 2), pudiendo ser definidos como regiones no funcionales. En cambio, la ausencia del motivo 26 en *AtAHA2* y *ArahAHA4*, separó *Arabidopsis thaliana* y *Arachis hypogaea* de las leguminosas, así como a las especies del género *Arachis*, pudiendo deberse al proceso de especiación (Vatansever et al., 2016). Además, dentro del proceso de domesticación (Tomar et al., 2022) se ha generado una divergencia entre las especies de la tribu Genisteae (TRINITY DN26268 y *LupinaAHA4*) y Dalbergieae (*ArahAHA4* y *AraiAHA4*). Por otro lado, la secuencia canónica de la enzima

AHA obtenida a partir del alineamiento múltiple reveló zonas de alta variabilidad en los motivos 26 (no funcional), 22 (funcional) y 8 (funcional), siendo este último motivo muy variable debido a que se observa una posible delección de 24 aminoácidos entre los residuos 574 al 606 en las leguminosas. Por otro lado, el alineamiento múltiple reveló sustituciones en la secuencia TRINITY DN26268 c0_g1_i1 versus sus respectivos ortólogos. Así, en el motivo 7 se observó el cambio de valina (Val140) por una isoleucina y en las posiciones 443 y 483 del motivo 15, las lisinas (K) fueron sustituidas por arginina (R) y prolina (P), respectivamente (Anexo 2).

La enzima FRO2 regula la reducción del Fe(III) a Fe(II) bajo condiciones de estrés (Mukherjee et al., 2006), lo que facilita la entrada del hierro y su uso inmediato para amortiguar el daño causado por el estrés abiótico. (Zhang et al., 2019). En tarwi, con un porcentaje de identidad del 72.78 % (Tabla 7) se identificó la secuencia TRINITY DN10820 c0_g1_i1 como FRO2. A nivel filogenético agrupó a TRINITY DN10820 c0_g1_i1 dentro de la tribu Genisteae (Figura 8B), pese a la variación en el tamaño de las secuencias, lo cual pudo deberse a la alta frecuencia de regiones conservadas que comparten. Por medio de la plataforma InterPRO se predijo 3 dominios para la enzima FRO2, los cuales son Ferric reductase transmembrane component-like domain, FAD-binding domain y NAD binding domain. El primer dominio facilita la movilización de electrones por medio de la membrana plasmática (Roman et al., 1993), mientras que los dos últimos intervienen en el proceso de donación de electrones por parte del NADPH+H⁺ (Iyanagi, 2022). En tarwi, el dominio Ferric reductase transmembrane component-like está constituido de una secuencia parcial ubicada entre la posición 257 al 308 (Anexo 3), siendo esta una diferencia relevante respecto de sus respectivos ortólogos (Monstein et al., 2007). Por otro lado, FAD-binding domain y NAD binding domain se localizan entre las posiciones 337 al 440 y 448 al 724, respectivamente, en tarwi. De los 22 motivos determinados para FRO2, los motivos 11, 12, 14, 19 y 20 son considerados no funcionales al no coincidir con las regiones de los dominios predichos para esta enzima. Dentro de estos, la presencia del motivo 19 generó divergencia separando, dentro de la tribu Phaceoleae, a las enzimas del género *Glycine* de *CajcFRO2* y *ViguFRO2* así como a las enzimas FRO2 del género *Arachis*. Por otro lado, la variabilidad mostrada en la secuencia canónica es producto de la alta frecuencia de sustituciones y delecciones. Las delecciones se localizan en el dominio FAD dentro del motivo 22 entre la posición 423 al 425; mientras que en NAD binding domain, están distribuidas en los motivos 7, 10 y 18 entre las posiciones 514 al 538, 658 al 665 y 637 al 639, respectivamente (Anexo

3).

Otras enzimas críticas para la homeostasis de hierro a nivel radícula son NAS1 y SAMS3. Estas enzimas sintetizan fitosideróforos, que son exudados a la rizósfera y cuya función es secuestrar el Fe(III) y Fe(II), facilitando la entrada de este micronutriente a las células de la raíz (Bonneau et al., 2016). Los homólogos únicos en tarwi para la enzima NAS y SAMS son TRINITY DN19184 c0_g1_i1 y TRINITY DN21351 c2_g2_i1, por presentar un porcentaje de identidad de 73,76 % y 95,36 %, respectivamente (Tabla 7). Respecto a la enzima NAS (Figura 8C), el análisis filogenético agrupó de forma separada a las especies de las tribus Genisteeae, Phaseolieae y Dalbergieae en estudio. Con ayuda de la plataforma interPRO, se identificó al dominio NICOTIANAMINE SYNTHASE 3 que cataliza la trimerización del S-adenosylmethionine para la formación de nicotianamina (Singh et al., 2021) y, en tarwi, se ubica entre la posición 5 a la 312 (Anexo 4). Este dominio comparte regiones con todos los motivos identificados por MEME a excepción del motivo 13. Dentro de los motivos funcionales, el motivo 3 y 14 son característicos de las leguminosas, puesto que presentan una alta similitud entre ellas. La secuencia consenso reveló una alta variabilidad en la frecuencia de aminoácidos dentro del dominio, en donde se pueden destacar inserciones glutamina (Q), leucina (L) y isoleucina (I) en las posiciones 7, 312 y 314, siendo estas propias de la tribu Genisteeae. Asimismo, la inserción de glicina (G) en la posición 123 separa a la tribu Dalbergieae del resto y de igual forma la inserción de Asn49, Glu90, Asp91 y Gln92 distinguió a *AtNAS* de sus ortólogos (Anexos 3).

En SAMS, el análisis filogenético reveló una divergencia muy marcada entre la secuencia TRINITY DN21351 c2_g2_i1 con sus ortólogos (Fig. 6D). Por otro lado, se identificó el dominio S-adenosylmethionine synthetase que se encarga de catalizar la formación de S-adenosylmethionine utilizando como sustrato a la metionina y ATP (Remines et al., 2023) y tarwi comparte una región parcial del dominio ubicado entre la posición 51 y 367 del alineamiento múltiple (Anexo 5). Todos los motivos identificados para esta enzima comparten regiones con el dominio S-adenosylmethionine synthetase, identificándolos como funcionales. Sin embargo, la ausencia de los motivos 5 y 6 ubicados en el extremo N-terminal y C-terminal en tarwi es producto del secuenciamiento parcial. Además, esta característica pudo causar la separación filogenética. Por otro lado, en los ortólogos de tarwi se evidencia variaciones por sustitución y delección, pudiendo ser la causa de esta variación el proceso de domesticación y/o especiación (Vleeshouwers et al., 2001). Dentro de la tribu Genisteeae se identificó un mayor número de sustituciones propias de *Lupinus Angustifolius*

y en tarwi sustituciones que se ubican en la posición 91 y 92, en donde hubo un cambio de lysina por asparagina y asparagina por lysina, respectivamente (Anexo 5).

Otra proteína clave en la homeostasis de hierro a nivel radicular es la YSL1, facilitando la entrada de los complejos NA-Fe(II) y NA-Fe(III) a la célula radicular, inducida por la deficiencia de hierro (Araki et al., 2011), cumpliendo un rol clave en el buen funcionamiento de la planta, así como en la calidad micronutricional de los alimentos en referencia al hierro (Negishi et al., 2002).

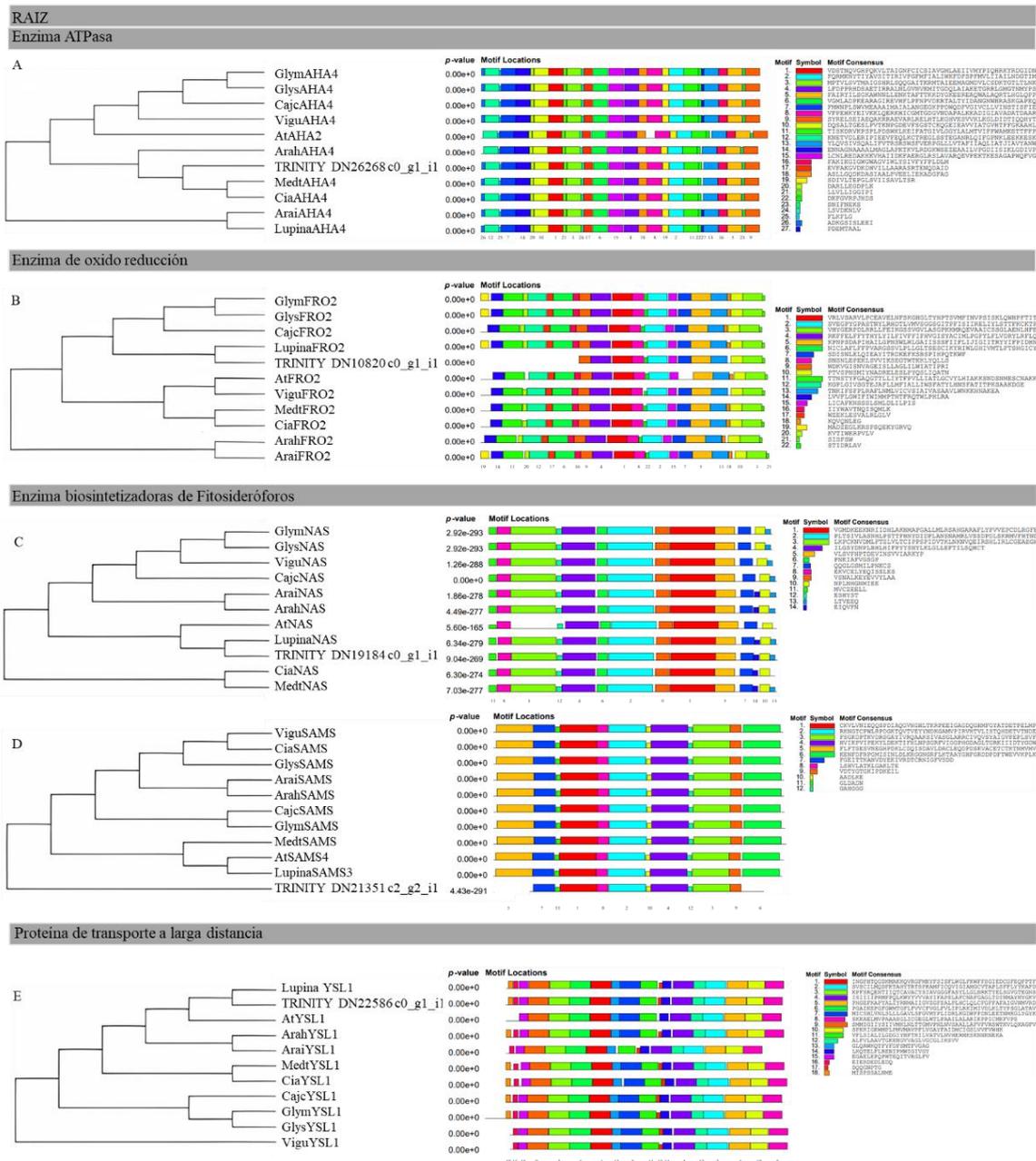


Figura 8. Análisis filogenético y de motivos conservados de las proteínas asociadas al posible mecanismo de absorción de hierro en tarwi

La proteína identificada como YSL1 (TRINITY DN22586_c0_g1_i1) para tarwi se muestra en la tabla 7, por tener un porcentaje de identidad del 80.14 %. A nivel filogenético, se agrupó de forma separada a las especies de la tribu Genisteae y Dalbergieae en estudio (Figura 8E). Con interPRO se identificó el dominio Metal-nicotianamine transporter YSL-like que es característico de hongos, bacterias y arqueas y cuya función es regular el transporte vascular del complejo NA-metal quelatado (DiDonato et al., 2004; Waters et al., 2006). Este dominio comparte regiones como todos los motivos predichos para esta proteína a excepción del motivo 18 (N-terminal). Tanto la ausencia de este motivo como el 16 y 17 no son característicos de *AtYSL1*; mientras que el motivo 18 generó divergencia entre las especies del género *Arachis* y *Glycine*, siendo el proceso de domesticación la posible causa de esta variación en el número de motivos (Gu et al., 2017). Además, la secuencia consenso reveló zonas variables, gobernadas por deleciones, inserciones y sustituciones dentro de los motivos 7, 9, 11, 13, 15, 16 y 18, siendo las más resaltantes las posibles inserciones dentro del motivo 9 de Gly118 y Tyr119 en *Lupina*YSL1 y la inserción de regiones parciales dentro del motivo 7 que parten desde Met343 a Val349 y Ala357 hasta Tyr391 dentro de las especies de leguminosas (Anexo 6).

b. Análisis filogenético, motivos conservados y dominios de las proteínas de transporte a larga distancia implicadas en la homeostasis de hierro a nivel del tallo

Para tarwi se identificaron a FRD3 (TRINITY DN18069_c0_g2_i2), OPT1 (TRINITY DN19860_c0_g1_i1), OPT3 (TRINITY DN22490_c0_g2_i5), OPT7 (TRINITY DN23386_c11_g1_i1) y YSL3 (TRINITY DN25538_c2_g6_i4) como posibles proteínas asociadas a la homeostasis de hierro (Tabla 7). La FRD3 es un transportador del complejo citrato-Fe(III) que transporta este nutriente vía xilema y cuya regulación es intensificada bajo estrés abiótico (Rogers et al., 2002), definiéndola como una proteína clave para la adaptabilidad y biofortificación de los cultivos (Rogers et al., 2009). El árbol filogenético agrupó por separado a las especies de las tribus Genisteae, Phaseoleae y Dalbergieae (Figura 9A). Utilizando InterPRO, se identificó al dominio Protein detoxification 44, chloroplastic-related, siendo propio de bacterias, arqueas y eucariotas, cuya función es regular el transporte del complejo citrato-Fe(III) por el xilema del tallo (Rogers y Guerinot, 2002; Green y Rogers, 2004), ubicándose este dominio entre los aminoácidos conservados Pro46 y Ile544 en tarwi. De los 16 motivos predichos, el 13 (N-terminal) puede ser considerado como no funcional, por no encontrarse dentro de la región del dominio. Dentro de la región funcional, el motivo 10 es típico de las leguminosas; además, el motivo 16 es propio de la tribu

Dalbergieae, mientras que el motivo 14 no (Anexo 7).

La familia de proteínas OPT se caracteriza por transportar péptidos de bajo peso molecular, macro y micronutrientes a lo largo de la planta (Cao et al., 2019; Lubkowitz, 2011), siendo esenciales para mantener la homeostasis iónica (Lubkowitz, 2011; Stacey et al., 2006). En esta familia, la YSL3 pertenece al grupo de Yellow Strike Like (YSL); mientras que la OPT1,3 y 7 integran el Oligopeptides Protein Transport (OPT). En OPT1, el árbol filogenético reveló una estrecha relación entre la secuencia TRINITY DN19860_c0_g1_i1 y *Vigu*OPT1 (Fig. 9B), mientras que en OPT3 y OPT7, las secuencias TRINITY DN22490_c0_g2_i5 y TRINITY DN23386_c11_g1_i1 fueron agrupadas dentro de la tribu Genisteae (Figuras 9C y 9D). Por otro lado, el dominio Tetrapeptide transporter (OPT1/isp4) fue identificado para estas tres proteínas. Con ayuda de MEME, se identificaron 20, 22 y 20 motivos para OPT1, 3 y 7, respectivamente. Sin embargo, los motivos 22 y 18 en OPT3 y 7 no están incluidas dentro del dominio, pudiendo ser consideradas como no funcionales (Anexo 9 y 10). En OPT1 (Anexo 8), la secuencia consenso reveló una alta divergencia dentro del motivo 19, pudiendo ser la causa de la separación de TRINITY DN19860_c0_g1_i1 y *Vigu*OPT1 con sus ortólogos (Vleeshouwers et al., 2001). Por el contrario, *Glys*OPT3 se agrupó con los ortólogos de la tribu Phaseoleae, pese a la ausencia de los motivos 22 y 13, pudiendo ser considerados no funcionales para esta tribu (Fig. 7C y Anexo 9). Mientras que en OPT7, los motivos 18, 19 y 20 son propios en leguminosas, por estar ausentes en *At*OPT7. Por otro lado, el motivo 15 solo está presente en *Arah*OPT7, siendo útil para su identificación taxonómica (Figura 9D y anexo 10). Pese a ello, la secuencia canónica evidenció zonas con alta variación en las proteínas OPT producto de sustituciones, delección e inserciones, siendo esta variación muy marcada en el extremo N-terminal, comprometiendo al motivo 19 en OPT1 (Anexo 8), al motivo 13 en OPT3 (Anexo 9) y al motivo 14 y 18 en OPT7. Además, en *Arai*OPT7 existe una pérdida de aminoácidos entre las posiciones 158 y 177 (Anexo 10).

Por otro lado, YSL3 es una proteína que transporta complejos NA-Fe(II) y NA-Fe(III) desde el floema a las células foliares (Gamboya et al., 2015). El análisis filogenético realizado a YSL3, agrupó a las proteínas de las tribus Phaseoleae, Genisteae y Dalbergieae (Figura 9E). Con InterPRO se identificó al dominio Metal-nicotianamine transporter YSL-like cuya función es el transporte de micronutrientes a nivel vascular (Zang et al., 2020). De los 20 motivos predichos, solo el motivo 14 y 20 no comparten regiones con el dominio, los cuales pueden ser considerados como no funcionales (Anexo 11). Por otro lado, el motivo 15 es

c. Árbol filogenético, motivos conservados y dominios de la proteína de almacenamiento (FER2), de transporte de corta distancia (NRAMP1, NRAMP3, VIT1, TIC21) y enzima de óxido-reducción (FRO7) implicadas en la homeostasis de hierro a nivel de célula foliar.

La ferritina, como proteína de almacenamiento, cumple un rol importante para mantener la homeostasis de hierro bajo estrés abiótico (Kar y Panda, 2020) y, a nivel nutricional, es esencial para la generación de cultivares biofortificados (Finkelstein et al., 2019). Esta proteína fue identificada en tarwi como TRINITY DN20442_c0_g2_i2 y mantiene una fuerte relación filogenética con las especies del género *Glycine* y *Arachis* (Figura 10A). Además, el dominio Ferritin es propio de animales, plantas y microorganismos (Lesjak y Srai, 2019), cuya región funcional en tarwi abarca desde la posición 79 hasta la 265 (Anexo 12). De los 6 dominios predichos por MEME, los motivos 5 y 6 se encuentran fuera del dominio, pudiendo ser caracterizados como no funcionales. Sin embargo, solo el motivo 5 (Figura 10A) se presentó en los géneros *Glycine* y *Arachis* y su presencia puede tener su origen en el proceso de mejoramiento genético al que se sometieron estas especies (Tomar et al., 2022). Por otro lado, la secuencia canónica reveló una baja conservación de aminoácidos asociados a los motivos 4 y 1 (Anexo 12). Las causas de esta alta variabilidad pueden deberse a la secuencia parcial FER2 en *Lupinus angustifolius* y a las sustituciones que se presentan, lo cual podría originar un comportamiento diferencial en el almacenamiento de hierro entre estas proteínas (Houston et al., 2005).

Para utilizar el hierro contenido en la vacuola, es crítico tener proteínas que faciliten su liberación al citoplasma y, entre ellas, tenemos a las NRAMP (Yoshida y Negishi, 2013). En tarwi se identificaron 2 proteínas NRAMP con los códigos TRINITY DN24501_c1_g5_i3 (NRAMP1) y TRINITY DN19831_c0_g1_i2 (NRAMP3) (Figura 10B y 10C). El dominio identificado para estas dos proteínas se denomina NRAMP family, cuya función es el transporte de cationes divalentes y esta interacción está asociada a residuos altamente conservados (Jiang et al., 2022). El programa MEME ha identificado 17 motivos para NRAMP1 y 14 para la NRAMP3, siendo el motivo 9, 13 y 15 en NRAMP1 y solo el motivo 13 de NRAMP3 es considerado como no funcional. Pese a la ausencia de los motivos 5, 12, 13 y 14, la secuencia TRINITY DN24501_c1_g5_i3 se agrupó con *Lupina*NRAMP6 (Anexo 13 y 14). Las secuencias de NRAMP estudiadas, presentan regiones muy variables ubicadas en los extremos N y C-terminales. Las variaciones a nivel de NRAMP3 pueden deberse a deleciones e inserciones. Por otro lado, en NRAMP1 existen aminoácidos característicos de la tribu Genisteeae, los cuales son Ser252, Gln283, Lys347, Ser400, Pro425 y Ala427

(Anexo 13); mientras que en NRAMP3 solo se identificó Val124 para esta tribu (Anexo 14).

Según Li y Chiu (2010), TIC21 es una proteína de transporte crítico para el ingreso de hierro al cloroplasto. En tarwi, esta proteína fue identificada con el código TRINITY DN19531_c0_g1_i2, estando agrupada con *Lupinus angustifolius* como se muestra en el árbol filogenético (Figura 10D). Esta proteína tiene como dominio a PROTEIN TIC 21, CHLOROPLASTIC, cuya función es regular la permeabilización de la membrana para asegurar el ingreso del hierro al cloroplasto (Filiz y Aydın Akbudak, 2020) y, en tarwi, este dominio se localiza entre la posición 44 a la 335 del alineamiento múltiple (Anexo 15). Este dominio comparte regiones como los 10 motivos identificados para esta proteína. Los motivos 6, 8 y 9 son conservados y característicos de las leguminosas, ya que se encuentran ausentes en *Arabidopsis thaliana*. Pese a la ausencia de los motivos 5 y 7 en *Glys*TIC21, esta proteína guarda una alta relación filogenética con *Glym*TIC21 (Fig. 10D). Por otro lado, el motivo 10 es propio de la tribu Genisteeae y se caracteriza por presentar Thr247 y Ile250 ubicado en el motivo 4 en comparación a las otras leguminosas. De acuerdo a la secuencia canónica, los motivos con mayor variabilidad se deben a posibles deleciones, sustituciones e inserciones en los motivos 5, 6, 7 y 8. Por otro lado, los residuos de Ser171 y Val276 son característicos de la tribu Genisteeae (Anexo 15). Estas variaciones en el extremo N-terminal pueden generar diferencias muy marcadas en la funcionalidad de estas enzimas respecto al transporte de hierro (Riedelsberger et al., 2021).

Así como las NRAMPs, VIT1 es una proteína de transporte crítica para la homeostasis del hierro (Kato et al., 2019). En tarwi, esta proteína se identificó con la secuencia TRINITY DN10042_c0_g1_i2, como se muestra en la tabla 7. El árbol filogenético agrupó a las especies de los géneros *Glycine*, *Arachis* y *Lupinus* (Figura 10E). Con interPRO se identificó al dominio FE(2⁺)/MN(2⁺) TRANSPORTER PCL1 el cual regula la permeabilidad transmembrana para el ingreso del hierro a la vacuola (Mach y Sutak, 2020) y este dominio abarca desde la posición 46 al 279 en tarwi (Anexo 16). Este dominio comparte regiones con los 6 motivos predichos por MEME, de los cuales los motivos 2, 4 y 6 están ausentes en *Glys*VIT1 y esto debido a la secuencia parcial utilizada para el análisis (Figura 10E). La variabilidad observada a lo largo de la secuencia puede causar diferencias en el tránsito de hierro al interior de la vacuola por esta proteína (Platre et al., 2022).

La enzima FRO7 es inducida por diferenciación celular a nivel de hoja y la maduración del cloroplasto (Kroh y Pilon, 2020), jugando un rol importante en la fotosíntesis (Jeong et al.,

2008). En tarwi, la secuencia TRINITY DN14213_c0_g2_i2 se identificó como FRO7 y, según el árbol filogenético, se encontró que estaba muy relacionada con FRO7 de *Lupinus angustifolius* (Figura 10F). En esta proteína se determinó los siguientes dominios: Ferric reductase transmembrane component-like domain, FAD-binding domain y NAD binding domain. En donde, el primer dominio regula la movilización de electrones por medio de la membrana plasmática (Roman et al., 1993), mientras que los dos últimos intervienen en el proceso de donación de electrones por parte del NADPH+H⁺ (Iyanagi, 2022).

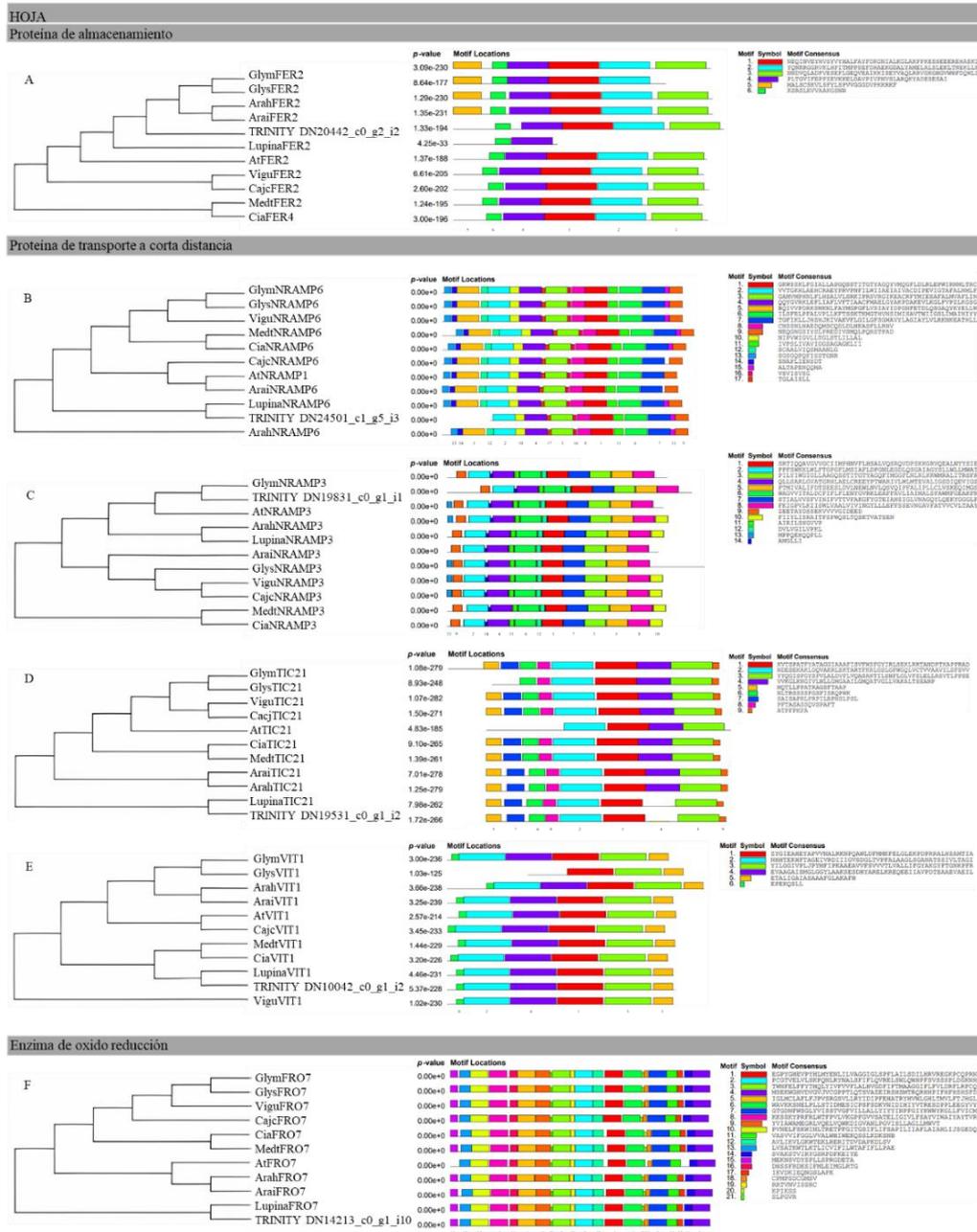


Figura 10. Análisis filogenético y de motivos conservados de las proteínas asociadas al posible mecanismo de transporte y almacenamiento de hierro en la hoja de tarwi

De los 21 motivos establecidos para FRO7, solo los motivos 8, 10, 13 y 15 pueden ser considerados como no funcionales (Anexo 17). No obstante, el motivo 15 es distintivo para leguminosas por estar ausente en *Arabidopsis thaliana* y, dentro de la región funcional, los 17 y 20 son únicos de leguminosas. La secuencia consenso refleja una alta variabilidad producto de deleciones, inserciones y sustituciones, siendo las más representativas las inserciones (Asn115 y Asn116) y la sustitución (Leu291 por Phe291), características de la tribu Genisteae (Anexo 17). Este comportamiento puede deberse a la divergencia durante el proceso de especiación (Longo et al., 2018).

4.3. VALIDACIÓN DE LOS GENES ASOCIADOS A LA HOMEOSTASIS DE HIERRO POR MEDIO DE EXPRESIÓN GENÉTICA

El cultivar "Andenes" y las accesiones T25 fueron utilizados para validar 16 genes asociados a la homeostasis de hierro por medio de expresión genética. El T25 fue seleccionado por su bajo valor de $CV_{\text{micronutricional}}$ (6.53 %) (Anexo 1) y el cultivar Andenes como control comparativo para T25. De acuerdo a Chao y Chao (2022), para la adquisición de hierro a nivel radicular existen dos estrategias, en donde los genes AHA2 y FRO2, que forman parte de la estrategia I, fueron identificados en tarwi; mientras que los genes NAS1 y SAMS3, pertenecientes a la estrategia II, se identificaron para esta leguminosa (Figura 11). Siendo así, T25 reveló niveles altos de expresión de AHA2 en hoja, tallo y raíz, a diferencia del cultivar "Andenes" (Figura 11A), pudiendo reflejar una mayor adaptabilidad de este gen por parte de T25 (Ivanov et al., 2012), lo que facilitaría la exudación de protones por parte de AHA2, facilitando la liberación de Fe(III) a la rizósfera. Esta forma de hierro no disponible debe ser reducida a Fe(II) y, para ello, el gen FRO2 se expresa (Connolly et al., 2003). En tarwi, FRO2 se expresa en hoja, tallo y raíz en ambos genotipos (Figura 11B), siendo su expresión predominante en raíz, disminuyendo en tallo y hoja. La expresión de FRO2 en T25 se observa en los tres órganos, pudiendo indicar una mayor plasticidad a las variaciones de hierro intracelular en la planta, para amortiguar los efectos de estrés causado por la deficiencia de este mineral (Vert et al., 2003).

En torno la estrategia II, el gen NAS1 es sobreexpresado bajo estrés abiótico para biosintetizar NA, que se encarga de secuestrar hierro fijado en el suelo y lo transporta al interior de la célula radicular (Pearce et al., 2014). En tarwi se observó una elevada expresión de NAS1 en T25 que en el cultivar Andenes (Figura 11C), revelando que la accesión T25 presenta una mayor resiliencia a la deficiencia de hierro, gracias a la sobreexpresión del gen

NAS1 (Grillet y Schmidt, 2019); mientras que la baja expresión de NAS1 en "Andenes" podría ser producto del proceso de mejora genética (Rauf et al., 2010). El gen SAMS3 cumple un rol similar al NAS1, asociándolo a la tolerancia a la deficiencia de hierro (Heidari et al., 2020). A nivel de tallo y raíz, la expresión del SAMS3 fue alta en "Andenes" versus T25, a diferencia de lo observado en hojas (Figura 11D). El alto nivel de expresión de SAMS3 en "Andenes", podría deberse a la pérdida de secuencias en los extremos N y C-terminal observadas en la región del dominio S-adenosylmethionine Synthetase (Anexo 5) (Asif y Nath, 2005). Para que el complejo fitosideróforo-hierro ingrese al interior de la célula radicular es necesaria la expresión y traducción del gen YSL1 (Le Jean et al., 2005). En la accesión T25, el gen YSL1 mantiene un patrón de expresión alto en hoja, tallo y raíz, a diferencia de lo observado en "Andenes" (Figura 12E). La baja expresión de YSL1 en "Andenes" pudo deberse a variaciones en las secuencias observadas en el dominio Metal-Nicotiamine transporter YSL-like (Anexo 6) que se pudieron dar durante el proceso de generación de este cultivar (Afzal et al., 2020).

Para el transporte de hierro vía xilema, es necesaria la expresión de genes asociados al transporte a larga distancia (Conte y Walker, 2011) y, entre ellos, tenemos los genes FRD3, OPT1, OPT3, OPT7 y YSL3. En tarwi, la expresión de FRD3 fue mayor en tallo y raíz en "Andenes", mientras que en T25 fue mayor en hojas (Figura 12A). Sin embargo, la accesión T25 presenta una mayor uniformidad en la expresión de FRD3 a nivel de los órganos evaluados, lo que facilitaría una mejor respuesta a la deficiencia de hierro (Zhang et al., 2019), convirtiéndose en un gen crítico para la adaptabilidad y biofortificación de cultivos (Tong et al., 2020).

En cambio, el gen OPT1 presenta una expresión diferencial en tallo y hoja, siendo alta y similar en raíz para ambos genotipos (Figura 12B). Esta expresión diferencial es una característica de este tipo de genes (Liu et al., 2014). Sin embargo, los niveles de expresión de OPT3 para T25 presentan diferencias significativas a nivel de raíz para ambos genotipos (Figura 12C). La expresión de OPT3 en T25 fue más uniforme, lo cual revelaría una mayor estabilidad del gen frente a la deficiencia de hierro (Rauf et al., 2010). En OPT7, se observa una mayor expresión en T25 que en "Andenes" para los tres órganos en estudio (Figura 12D), revelando una eficiente regulación de OPT7 en T25 para amortiguar los efectos negativos generados por la deficiencia de hierro (Bashir et al., 2015). Por otro lado, la subfamilia YS-like como YSL1 y YSL3 juegan un rol importante como transportadores de larga distancia. Sin embargo, YSL1 presenta una expresión predominante a nivel radicular (Jahan et al.,

2023), mientras que YSL3 a nivel foliar (Sheng *et al.* 2019).

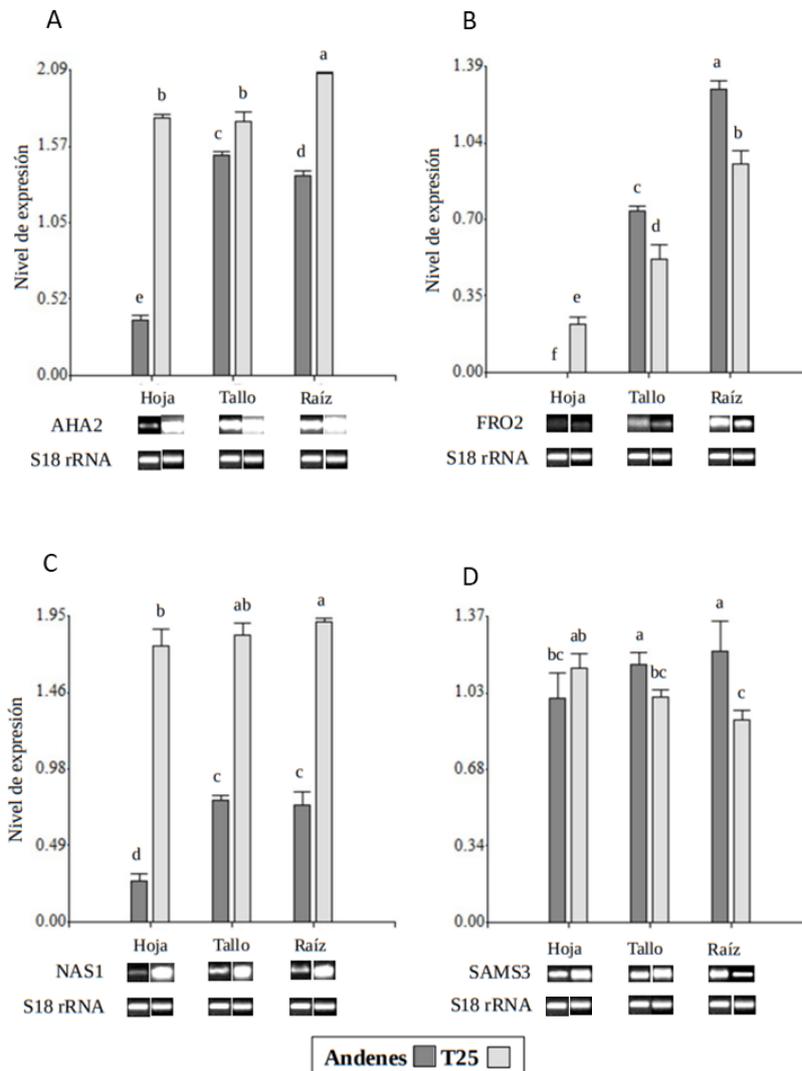


Figura 11. Cambios en la expresión en hoja, tallo y raíz de los genes relacionados con la estrategia I (AHA2 y FRO2) y la estrategia II (NAS1 y SAMS3) en la adquisición de hierro para el cultivar “Andenes” y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente

La expresión de YSL1 en tarwi fue mayor en T25 que “Andenes”, mostrando diferencias significativas a nivel de hoja y raíz. Sin embargo, YSL3 mostró un nivel de expresión superior y significativo en Andenes a nivel de tallo y raíz (Figura 12F) pero alto en T25 a nivel de hojas. Este comportamiento de YSL3 en hojas para T25 se ha reportado también en *Arabidopsis* (Waters *et al.*, 2018) y esto podría indicar que la planta trataría de reducir los efectos negativos en la producción de energía y biomasa, al proporcionar hierro a los aparatos fotosintéticos y respiratorios (Bandyopadhyay *et al.*, 2021).

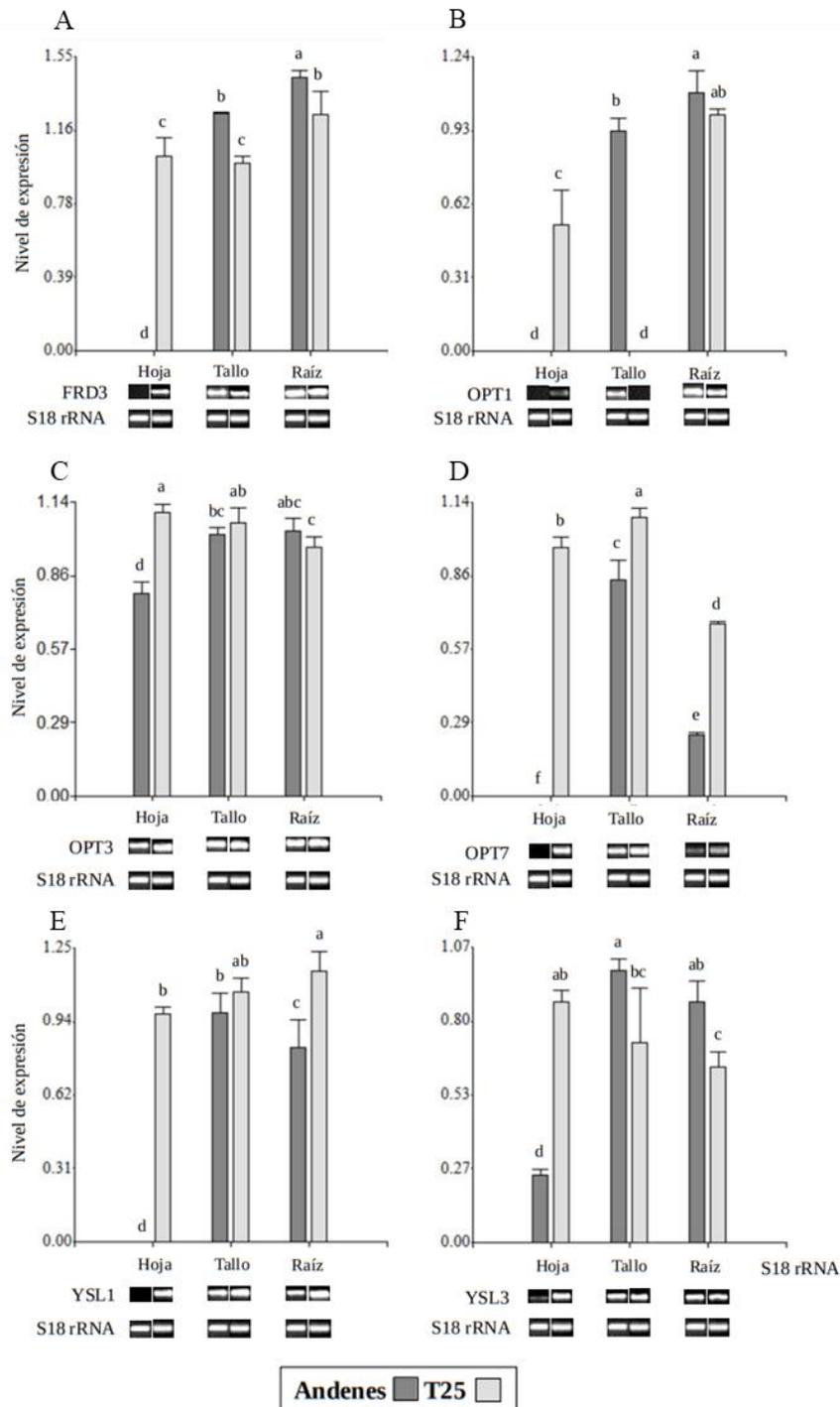


Figura 12. Cambios en la expresión de las proteínas de transporte de larga distancia asociadas a la homeostasis de hierro en hoja, tallo y raíz en el cultivar “Andenes” y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente

A nivel de las células foliares el hierro debe ser utilizado o compartimentalizado y, para ello, es necesario la regulación de genes asociados al transporte de hierro a corta distancia (Curie y Briat, 2003), siendo identificadas para tarwi a VIT1, NRAMP1, NRAMP3 y TIC21. Para

el ingreso del hierro a la vacuola es crítico un transportador de corta distancia como VIT1 (Kim et al., 2006). La expresión de VIT1 en T25 fue mayor y significativa en todos los tejidos (Figura 12A), mostrando una mayor respuesta a la deficiencia de hierro y, en consecuencia, podría indicar una mejor respuesta frente a la deficiencia de hierro (Briat et al., 2007). Para utilizar las reservas de hierro vacuolar, se requiere de una vía de salida del hierro, la cual involucra a los genes NRAMP1 y NRAMP3.

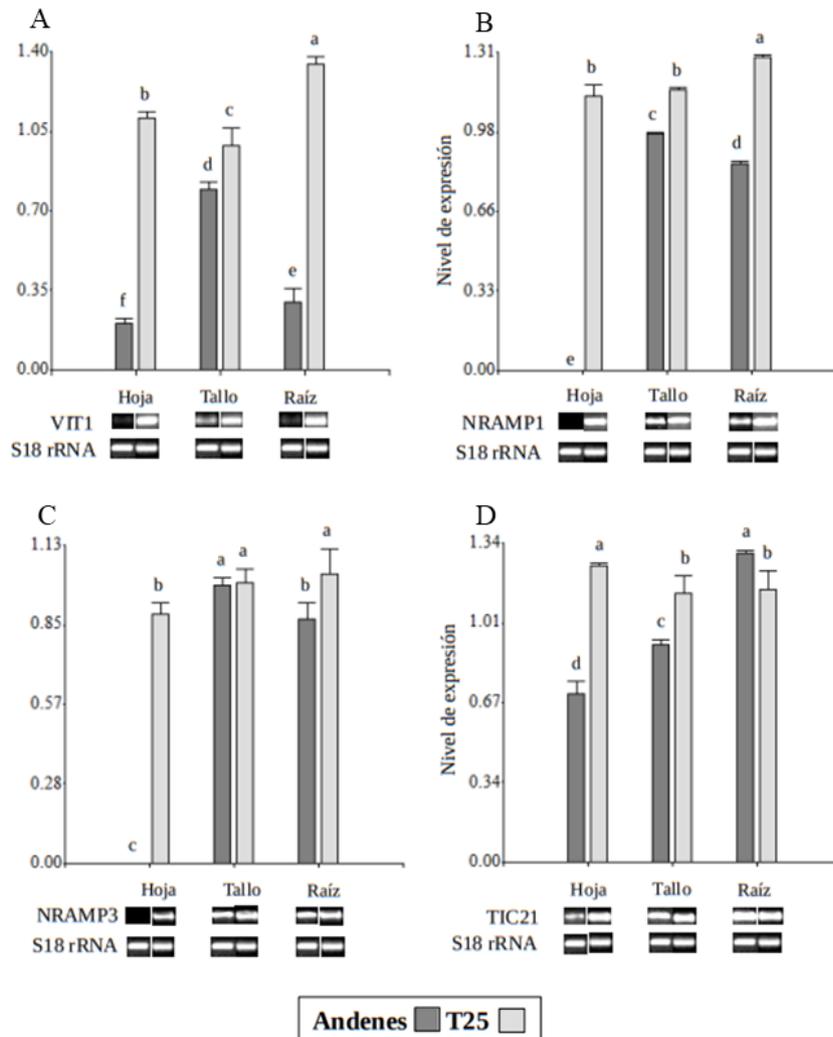


Figura 13. Cambios en la expresión de las proteínas de transporte de corta distancia asociadas a la homeostasis de hierro en hoja, tallo y raíz en el cultivar “Andenes” y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente

En tarwi, la expresión de NRAMP1 en T25 fue mayor y significativa en todos los tejidos, mostrando un patrón de expresión muy similar a VIT1 (Figura 13B). Mientras que la expresión de NRAMP3 de T25 fue significativa solo a nivel de hoja y raíz, mostrando una expresión similar a nivel tallo para ambos genotipos (Figura 13C). La sobreexpresión de NRAMP1 y NRAMP3 en la accesión T25, revelaría una mayor plasticidad a la deficiencia

de hierro (Chen *et al.* 2016b), pudiendo ser una estrategia adaptativa en las accesiones silvestres para mantener la homeostasis de hierro bajo suelos marginales (Chen et al., 2023). El ion ferroso ingresa al cloroplasto a través de TIC21 (Filiz y Aydin Akbudak, 2020). En tarwi, los niveles de expresión de TIC21 en T25 solo fueron altos y significativos a nivel de hoja y tallo (Figura 13D). No obstante, la baja expresión de TIC21 en "Andenes", podría alterar la tasa fotosintética, perjudicando así la calidad y rendimiento del cultivo a futuro (Gong et al., 2015).

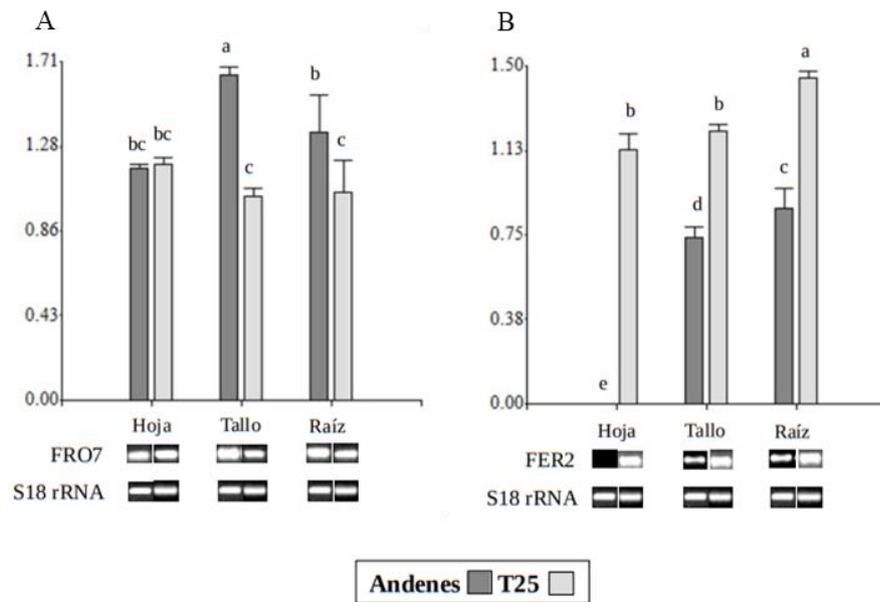


Figura 14. Cambios en la expresión de los genes FRO7 y FER2 en hoja, tallo y raíz en el cultivar "Andenes" y la accesión tardía T25 bajo deficiencia de este micronutriente

El hierro debe ser reducido por la TIC21 para garantizar su ingreso al interior del cloroplasto, siendo crítica la reducción del hierro a través de FRO7 (Jeong et al., 2008). En tarwi, FRO7 no muestra diferencias significativas a nivel de hojas. Sin embargo, el cultivar Andenes mostró diferencias significativas a nivel de tallo y raíz (Figura 14A). La elevada respuesta de FRO7 en "Andenes" podría ser consecuencia del proceso de mejora genética que tuvo este cultivar (Schuback y Tortell, 2019). Tanto en la vacuola como en el cloroplasto, el hierro es almacenado en ferritinas (Paramonova et al., 2007), siendo elevada la expresión de FER2 a nivel de semillas, la cual disminuye durante la germinación (Kranner y Colville, 2011). Sin embargo, en tarwi se observa una sobreexpresión de FER2 en T25 en todos los tejidos (Figura 14B), revelando una mayor resiliencia de FER2 a la deficiencia de hierro (Rauf et al., 2010).

V. CONCLUSIONES

1. Sin haber pasado por un proceso de mejora genética, las accesiones tardías y precoces de tarwi estudiadas demostraron ser más homogéneas en los rasgos físicos y micronutricionales, logrando una rápida selección de 3 accesiones tardías (T05, T08 y T25) y 3 precoces (P14, P16 y P21) con cantidades adecuadas en Fe, Zn, B Cu y Mn sin afectar la calidad física de la semilla.
2. El análisis *in silico* permitió identificar 16 genes y sus secuencias de proteínas asociadas a la homeostasis de hierro en tarwi, las cuales son: enzima de ATPasa (AHA), biosintetizadoras de fitosideróforos (NAS1 y SAMS3), proteína de almacenamiento (FER2), enzimas de óxido-reducción (FRO2 y FRO7), proteínas de transporte de larga distancia (FRD3, OPT1, OPT3, OPT7, YSL1 y YSL3) y corta distancia (VIT1, TIC21, NRAMP1, NRAMP3). Además, con la caracterización funcional de estas proteínas a través de Meme e Inter Pro se predijo los motivos y dominios conservados para cada secuencia, revelando diferencias con sus ortólogos que podrían estar asociadas con la resiliencia de proteínas frente a deficiencia de hierro.
3. La comparación de la expresión de los genes asociados a la homeostasis de hierro entre la accesión T25 y el cultivar "Andenes" (control), revelaron genes con una excelente respuesta a la deficiencia de hierro en T25, los cuales son AHA2, FER2, NAS1, YSL1, NRAMP1, NRAMP3, VIT1 y TC21, considerándolos genes críticos para la generación de cultivares biofortificados.

VI. RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios de la homeostasis de hierro en tarwi a nivel reproductivo y de llenado de grano.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbaspour, N., Hurrell, R. y Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*, 19(2):164–74.
- Afzal, S., Sirohi, P., Sharma, D. y Singh, N. K. (2020). Micronutrient movement and signalling in plants from a biofortification perspective. *Plant micronutrients: deficiency and toxicity management*, 129-171.
- Agafonov, O., Selstø, C. H., Thorsen, K., Xu, X. M., Drengstig, T. y Ruoff, P. (2016). The organization of controller motifs leading to robust plant iron homeostasis. *PLoS One*, 11(1), e0147120.
- Alake, C.O. and Alake, O.O. (2016). Genetic diversity for agro-nutritional traits in African Landraces of *Vigna subterranean* Germplasm. *Journal of Crop Improvement*, 30(4):378-398.
- Alake, C.O. and Porbeni, B.J. (2020). Genetic variation and intraspecific diversity for agromorphological and nutritional traits in African yam bean. *Journal of Crop Improvement*, 34(2):139-163.
- Alcántara, E., de la Guardia, M. D. & Romera, F. J. (1991). Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants. *Plant Physiology*, 96(4), 1034-1037.
- Alcázar, L. (2012). Impacto económico de la anemia en el Perú.
- Alcibíades, A. y Granara, A.A. (2015). Nutritional and medicinal properties of the tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), Radio program of the Peru always home, 1:1.
- Aliu S, Kaul H.-P, Rusinovci I, Shala-Mayrhofer V. y Fetahu S, Zeka D. (2016). Genetic diversity for some nutritive traits of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) from different regions in Kosova, *Turkish Journal of Field Crops*, 21(1): 156-161.

- Aliu S., Rusinovci I., Gashi B., Kaul H.P., Rozman L. y Fetahu Sh. (2014). Genetic diversity for mineral content and photosynthetic pigments in local bean (*Phaseolus vulgaris* L.) populations. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12, 2: 635-639.
- Al-Saady, N. A., Nadaf, S. K., Al-Lawati, & Al-Hinai, S. A. (2019). Genetic diversity of indigenous Chickpea (*Cicer arvense* L.) Germplasm Collection.
- Ancuceanu, R., Dinu, M., Hovane, M.V., Anghel, A.I., Popescu, C.V. y Negre, S.A. (2015). Survey of plant iron content—A semi-systematic review. *Nutrients*, 7 (12): 10320–10351.
- Araujo, R., Miglioranza, E., Montalván, R., Destro, D., Gonçalves-Vidigal, M.C. y Modacirino, V. (2003). Genotype x environment interaction effects on the iron content of common bean grains. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4: 269-274.
- Arones, A. (2016). Estudio de la variedad genética de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) de la Región de Huánuco a través del uso de marcadores moleculares ISSR.
- Alvarez Ariza, A. A. & César Solano, M. E. (2019). Deficit de zinc y desnutrición: La fortificación como solución (Doctoral dissertation, Universidad del Sinú, sección Cartagena).
- Aparco, J.P., Bullón, L. y Cusirramos, S. (2019). Impacto de micronutrientes en polvo sobre la anemia en niños de 10 a 35 meses de edad en Apurímac, Perú. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*, 36(1):17-25.
- Araki, R., Murata, J. & Murata, Y. (2011). A novel barley yellow stripe 1-like transporter (HvYSL2) localized to the root endodermis transports metal–phytosiderophore complexes. *Plant and Cell Physiology*, 52(11), 1931-1940.
- Asif, M. H. & Nath, P. (2005). Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(2), 177-184.
- Aulestia-Guerrero, E.M. y Capa-Mora, E.D. (2020). Una mirada hacia la inseguridad alimentaria sudamericana. *Ciência y Saúde Coletiva*, 25(7): 2507-2517.
- Badakhshan, H., Moradi, N., Mohammadzadeh, H. y Zakeri, M.R. (2013). Genetic

- variability analysis of grains Fe, Zn and beta-carotene concentration of prevalent wheat varieties in Iran. *Int. J. Agric. Crop Sci*, 6: 57–62.
- Badigannavar, A., Girish, G., Ramachandran, V. y Ganapathi, T.R., (2016). Genotypic variation 514 for seed protein and mineral content among post-rainy season-grown sorghum 515 genotypes. *The Crop Journal*, 4, 61-67.
- Baloch, F.S., Karaköy, T., Demirbaş, A., Toklu, F., Özkan, H. y Hatipoglu, R. (2014). Variation of some seed mineral contents in open pollinated faba bean (*Vicia faba* L.) landraces from Turkey. *Turk. J. Agric. For.* 38, 591–602.
- Banakar, R., Fernández. A.A., Abadia, J., Capell, T. y Christou P (2017) The expression of heterologous Fe (III) phyto siderophore transporter HvYS1 in rice increases Fe uptake, translocation and seed loading and excludes heavy metals by selective Fe transport. *Plant Biotechnol J*, 15(4):423–432.
- Bandyopadhyay, T. & Prasad, M. (2021). IRONing out stress problems in crops: a homeostatic perspective. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 559-577
- Bashir, K., Ishimaru, Y., Itai, R. N., Senoura, T., Takahashi, M., An, G. & Nishizawa, N. K. (2015). Iron deficiency regulated OsOPT7 is essential for iron homeostasis in rice. *Plant molecular biology*, 88, 165-176.
- Bashir, K., Rasheed, S., Kobayashi, T., Seki, M. and Nishizawa, N.K. (2016) Regulating subcellular metal homeostasis: The Key to Crop Improvement. *Front. Plant Sci*, 7:1192.
- Bastow, E.L., De La Torre, V.S.G., Maclean, A.E., Green, R.T., Merlot, S., Thomine, S. y Balk, J. (2018). Vacuolar iron stores gated by NRAMP3 and NRAMP4 are the primary source of iron in germinating seeds. *Plant Physiol*, 177: 1267–1276.
- Beebe, S., Gonzalez, A.V. y Rengifo, J. (2000). Research on trace minerals in the common bean. *Food and Nutrition Bulletin*, 21(4): 387-391.
- Begossi, A., Hanazaki, N. y Peroni, N. (2000). Knowledge and use of biodiversity in Brazilian hot spots. *Environment, Development and Sustainability*, 2: 177–193.
- Binet, R., Fernández, R.E., Fisher, D.J. y Maurelli, A.T. (2011). Identification and characterization of the *Chlamydia trachomatis* L2 S-adenosylmethionine

transporter. *MBio* 2: 1-11.

- Bischoff, S. C., Escher, J., Hébuterne, X., Kłęk, S., Krznic, Z., Schneider, S. & Burgos Peláez, R. (2022). Guía ESPEN: nutrición clínica en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutrición Hospitalaria*, 39(3), 678-703.
- Blair, M.W., Izquierdo, P., Astudillo, C. y Grusak, M.A. (2013). A Legume biofortification quandary: Variability and genetic control of seed coat micronutrient accumulation in common beans. *Front Plant Sci*, 4: 275.
- Blanco, O. y Maywa, B. (1995). Cultivos Andinos y la investigación Universitaria. Recopilación y análisis de bibliografía temática. # 7. CCTA, FEAS, FIDA, Ministerio de Agricultura, Lima, Perú.
- Bonneau, J., Baumann, U., Beasley, J., Li, Y. & Johnson, A. A. (2016). Identification and molecular characterization of the nicotianamine synthase gene family in bread wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 14(12), 2228-2239.
- Bonilla-Aparicio, M. E., Salcido-Ramos, B. A., Paredes-Sánchez, J. A., Aguirre-Álvarez, L., Méndez-Cadena, M. E. & de Lourdes Hernández-Rodríguez, M. (2013). La diversidad hortícola para la seguridad alimentaria en municipios marginados del estado de Puebla. *Ra Ximhai*, 9(2), 151-163.
- Bouis, H. y Saltzman, A. (2017). Improving Nutrition Through Biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 Through 2016, 2003 a 2016. *Global food security*, 12, 49–58.
- Briat, J. F., Curie, C. & Gaymard, F. (2007). Iron utilization and metabolism in plants. *Current opinion in plant biology*, 10(3), 276-282.
- Buircell, B.J. y Cowling, A.W. (1998). Genetic Resources in Lupins. CAB International; Editors: J.S. Gladstones, C.A. Atkins, J. Hamblin.
- Cakmak, I., Tourn, A., Millet, E., Feldman, M., Fahima, T., Korol, A., Nevo, E., Braun, H.J. y Ozkan, H. (2004). *Triticum dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Sci Plant Nutr*, 50 (7): 1047-1054.
- Calliatte, R., Schikora, A., Briat, J.F., Mari, S. y Curie, C. (2010). High-affinity manganese

- uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions. *Plant Cell*, 22:904– 917.
- Cao, Q., Xv, C., Jiang, Q., Wang, L. & Shi, G. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals key genes responsible for the homeostasis of iron and other divalent metals in peanut roots under iron deficiency. *Plant and Soil*, 445, 513-531.
- Chandrawat, K.S., Baig, K.S., Hashmi, S., Sarang, D.H., Kumar, A. y Dumai, P.K. (2017). Study on genetic variability, heritability and genetic advance in soybean. *Int J Pure App Biosci*, 5: 57-63.
- Chao, Z. F. & Chao, D. Y. (2022). Similarities and differences in iron homeostasis strategies between graminaceous and nongraminaceous plants. *New Phytologist*, 236(5), 1655-1660.
- Chapin, F.S. (1983) Patterns of Nutrient Absorption and Use by Plants from Natural and Man-Modified Environments. In: Mooney H.A., Godron M. (eds) *Disturbance and Ecosystems. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, Springer, Berlin, Heidelberg, vol 44.
- Chen, Y., Zou, T. y McCormick, S. (2016a). S-Adenosylmethionine Synthetase 3 is important for pollen tube growth. *Plant Physiol*, 172: 244–253.
- Chen, D. J., Sang, L., Sun, S. K., Chen, Y. F. & Xie, X. P. (2016b) Cloning and sequence analysis of nramp1 gene in Fujian yellow rabbit.
- Chen, C-c., Chien, W-F., Lin, N-C. y Yeh, K-C. (2014). Alternative Functions of Arabidopsis YELLOW STRIPE-LIKE3: From Metal Translocation to Pathogen Defense. *PLoS ONE* 9(5).
- Chen, Y., Yuan, Y., Qiu, Z., Hong, W., Mao, K., Yao, C. & Wang, N. (2023). Identification of reference genes for RT-qPCR analysis across kiwi fruit species under iron deficiency conditions. *Scientia Horticulturae*. 312, 111865.
- Chillitupa Arredondo, C. P. & Tamayo Lee, M. F. (2023). Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta productora de aceite de tarwi (*Lupinus mutabilis*).
- Chirinos-Arias, M.C. (2015). Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential. *Revista Bio Ciencias*, 3: 163-172.

- Chirinos, R., Villasante-Bravo, N., Aguilar-Galvez, A., Figueroa-Merma, A., Carpentier, S., Pedreschi, R. & Campos, D. (2022). Antioxidant, antihypertensive and antidiabetic potential of peptidic fractions obtained from tarwi (*Lupinus mutabilis*) protein hydrolysate and identification of promising multifunctional bioactive peptides. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(11), 7402-7411.
- Cohen, C.K., Garvin, D.F. y L.V. Kochian. (2004). Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta*, 218:784–792.
- Connolly, E.L., Campbell, N.H., Grotz, N., Prichard, C.L. y Guerinot, M.L. (2003) Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol*, 133: 1102–1110.
- Connorton, J.M. y Balk, J. (2019). Iron Biofortification of Staple Crops: Lessons and Challenges in Plant Genetics. *Plant and Cell Physiology*. 60(7): 1447–1456.
- Conte, S. S. & Walker, E. L. (2011). Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant*. 4(3), 464-476.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F. y Walker, E.L. (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*. 409:346–349.
- Curie, C. y Briat, J.-F., (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev Plant Biol*. 54, 183–206.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M. y Mari, S, (2008). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals Botany*. 103(1): 1–11.
- Darkwa, K., Ambachewa, D., Mohammed, H., Asfawa, A. y Blair, M.W. (2016). Evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for drought stress adaptation in Ethiopia. *The crop journal*, 4(5): 367-376.
- Delhaize, E. (1996). A metal-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 111: 849–855.

- Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V. & Peto, R. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet*, 381(9869), 805-816.
- DellaValle, D. M., Thavarajah, D., Thavarajah, P., Vandenberg, A. y Glahn, R.P. (2013). Lentil (*Lens culinaris* L.) as a candidate crop for iron biofortification: Is there genetic potential for iron bioavailability?. *Field Crops Research*. 144: 119–125.
- De-Paula, C. D., Jarma-Arroyo, S. & Aramendiz-Tatis, H. (2018). Caracterización nutricional y determinación de ácido fólico como factor antinutricional del frijol caupí. *Agronomía Mesoamericana*. 29(1), 29-40.
- Diapari, M., Sindhu, A. y Warkentin, T.D. (2015). Population structure and marker-trait association studies of iron, zinc and selenium concentrations in seed of field pea (*Pisum sativum* L.). *Mol Breeding*. (35)30:1-14.
- Díaz-Rodríguez, K., Pacheco-Aranibar, J., Manrique-Sam, C., Ita-Balta, Y., Carpio-Toia, A. M. D., López-Casaperalta, P. y Bernabe-Ortiz, J. C. (2022). Intestinal Microbiota in Children with Anemia in Southern Peru through Next-Generation Sequencing Technology. *Children*. 9(11), 1615.
- Dible, W.T., Truog, E. y Berger, K.C. (1954). Boron determination in soils and plants: Simplified curcumin procedure, *Analytical Chemistry*. 26(2), 418-421.
- DiDonato Jr., R. J., Roberts, L. A., Sanderson, T., Easley, R. B. & Walker, E. L. (2004). Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. *The Plant Journal*, 39(3), 403-414.
- Dimitri, C. y Rogus, S. (2014). Global Food Security (SPRING/SUMMER 2014), Published By: Journal of International Affairs Editorial Board, 67(2): 19-31.
- Douthwaite, B., Johnson, N. & Wyatt, A. (2023). Using outcome trajectory evaluation to assess HarvestPlus contribution to the development of national biofortification breeding programs. *The European Journal of Development Research*. 35(2), 426-451.

- Dunwell, J. M., Khuri, S. & Gane, P. J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(1), 153-179.
- Durrett, T.P., Gassmann, W. y Rogers, E.E. (2007). The FRD3- mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol*. 144: 197–205.
- Duy, D., Wanner, G., Meda, A., Wirén, N., Soll, J. y Philippara, K. (2007). PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis chloroplasts*, mediates iron transport. *Plant Cell*. 19: 986–1006.
- Escobar-Navia, C. P., Banda-Garrido, L. F. & Berduguez-Claros, J. E. (2023). Variables directas e indirectas que influyen en el rendimiento de grano de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Revista de Investigación Agropecuaria y Forestal Boliviana-RIAFB*, 7, e300534-e300534.
- Escobedo, M. y Salas, J.P. (2008). Mahalanobis y las aplicaciones de su distancia estadística. *Cultura, Ciencia y Tecnología*, 5 (27): 13-21.
- Etemadi, F., Barker, A. V., Hashemi, M., Zandvakili, O. R. & Park, Y. (2018). Nutrient accumulation in faba bean varieties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 49(16), 2064-2073.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C. y Li, Y.C. (2009). Differential soil acidity tolerance of tropical legume cover crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 40, 1148–1160.
- FAO. (2016). Cambio climático y seguridad alimentaria y nutricional. América Latina y el Caribe. orientaciones de política. (citado el 9 de octubre del 2019).
- FAO. (2017). The state of food security and nutrition in the world. (citado el 10 de enero del 2021).
- Fernández Cheza, E. E. (2017). Determinación del contenido de antinutrientes en tres variedades de chocho (Andino INIAP 450, Guaranguito INIAP 451 y Criollo) (Bachelor's thesis, PUCE).

- Ferreira, C., Sousa, C., Sanchis-Pérez, I., López-Rayó, S., Barros, M., Soares, H. y Lucena, J. (2019). Calcareous soil interactions of the iron (III) chelates of DPH and Azotochelin and its application on amending iron chlorosis in soybean (*Glycine max*). *Science of The Total Environment*. 647: 1586-1593.
- Fetahu, S., Aliu, S., Rusinovci, I., Behluli, A. y Kelmendi, B. (2014). Genetic diversity for micronutrients contents in some common bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genetics, Plant Breeding and Seed Production*. Pag: 219-223.
- Filiz, E. & Aydın Akbudak, M. (2020). Investigation of PIC1 (permease in chloroplasts 1) gene's role in iron homeostasis: bioinformatics and expression analyses in tomato and sorghum. *Biometals*. 33, 29-44.
- Finkelstein, J. L., Fothergill, A., Hackl, L. S., Haas, J. D. & Mehta, S. (2019). Iron biofortification interventions to improve iron status and functional outcomes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 78(2), 197-207.
- Finkelstein, J., Haas, J. y Mehta, S. (2017). Iron-biofortified staple food crops for improving iron status: a review of the current evidence. *Current Opinion in Biotechnology*. 44: 138–145.
- Forrellat Barrios, M. (2016). Regulación del metabolismo del hierro: dos sistemas, un mismo objetivo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 32: 4-14.
- Franco Jiménez, J. C. (2021). Variación microclimática de metabolitos secundarios de *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw.(Cactaceae) en temporada de lluvia y de estiaje.
- Frazer, D. M. y Anderson, G. J. (2014). The regulation of iron transport. *Biofactors*, 40: 206–214.
- Fuller, D.Q. y Harvey, E.L. (2006). The archaeobotany of Indian pulses: identification, processing and evidence for cultivation. *Environmental Archaeology*, 11(2): 219-246.
- García, D.E. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y forrajes*, 27(2).
- Gerrano, A.S., Adebola, P.O., Jansen van Rensburg, W.S. y Venter, S.L. (2015). Genetic

- variability and heritability estimates of nutritional composition in the leaves of selected Cowpea genotypes [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Hortscience, 50(10): 1435–1440.
- Gerrano, A.S., Jansen van Rensburg, W.S. y Adebola, P.O. (2017). Nutritional composition of immature pods in selected cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] genotypes in South Africa. Aust J Crop Sci, 11:134–141.
- Gomes, G.H., Freiria, G.H., Constantino, L.I., Alves, S.M., Zeffa, D.M. y Takahashi, L.S.A. (2020). Productivity, mineral composition, and phenolic compound content in bush snap beans grown during different seasons. Semina: Ciências Agrárias, 41(5): 1469-1482.
- Gómez-Galera, S., Rojas, E. y Sudhakar, D. (2010). Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. Transgenic Res., 19: 165–180.
- Gondwe, T.M., Alamu, E.O., Mdziniso, P. y Maziya-Dixon, B. (2019), Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) for food security: an evaluation of end-user traits of improved varieties in Swaziland. Scientific Reports, 9: 1-6.
- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. y Takaiwa, F. (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. Nat. Biotechnol, 17: 282–286.
- Guerinot, M. (2001) Improving rice yields-ironing out the details. Nat. Biotechnol, 19, 417–418.
- Guilengue, N., Alves, S., Talhinhos, P. & Neves-Martins, J. (2019). Genetic and genomic diversity in a tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) germplasm collection and adaptability to Mediterranean climate conditions. Agronomy, 10(1), 21.
- Gong, X., Guo, C., Terachi, T., Cai, H. & Yu, D. (2015). Tobacco PIC1 mediates iron transport and regulates chloroplast development. Plant Molecular Biology Reporter, 33, 401-413.
- Gouveia, C.S.S., Freitas, G., De Brito, J.H., Slaski, J.J. y De Carvalho, M.A.A.P. (2014) Nutritional and mineral variability in 52 accessions of common bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) from Madeira Island. Agricultural Sciences, 5(4): 317-329.
- Gutiérrez Mesías, L. G. (2023). Búsqueda de variantes de ferritina con elevada capacidad

de acumulación de hierro en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

- Green, L.S. and Rogers, E.E. (2004). FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136: 2523–2531.
- Grewal, S.K., Sharma, K., Bharadwaj, R. D., Hegde, B., Tripathi, S., Singh, S. y Mondal, B. (2020). Understanding genotypic variation and identification of promising genotypes for iron and zinc content in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 88: 103458.
- Grijota Pérez, F. J. (2016). Influencia del ejercicio físico en los niveles eritrocitarios de elementos minerales traza.
- Grillet, L. & Schmidt, W. (2019). Iron acquisition strategies in land plants: not so different after all. *New Phytologist*, 224(1), 11-18.
- Grusak, M.A., Pearson, J.N. y Marentes, E. (1999). The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Res.*, 60: 41–56.
- Gu, Y., Li, W., Jiang, H., Wang, Y., Gao, H., Liu, M. & He, C. (2017). Differential expression of a WRKY gene between wild and cultivated soybeans correlates to seed size. *Journal of Experimental Botany*, 68(11), 2717-2729.
- Gulisano, A., Alves, S., Neves-Martins, J. y Trindade, L.M. (2019). Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: An Emerging Protein Crop. *Front Plant Sci*, 10: 1-13.
- Haas, J. y Brownlie, T. (2001). Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *The Journal of Nutrition*, 131: 676-688.
- Harada, E., Sugase, K., Namba, K., Iwashita, T. y Murata, Y. (2007). Structural element responsible for the Fe(III)-phytosiderophore specific transport by HvYS1 transporter in barley. *FEBS Letters*, 581: 4298–4302.
- Heidari, P., Mazloomi, F., Nussbaumer, T. & Barcaccia, G. (2020). Insights into the SAM synthetase gene family and its roles in tomato seedlings under abiotic stresses and hormone treatments. *Plants*, 9(5), 586.
- Hernández, G., Osnaya, V. G. & Pérez-Martínez, X. (2019). Conservation and variability

- of the AUG initiation codon context in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 44(12), 1009-1021.
- Hidalgo, M. Transcriptoma de *Lupinus Mutabilis* sometido a estrés hídrico. Universidad Nacional Agraria La Molina: Lima, Perú, 2021.
- Hidalgo, M., Asmat Marrufo, P., Lezama Asencio, P., Ramos, C., Chimoy Tuñoque, C. A. & Zolla, G. (2022). Evaluación de la susceptibilidad in vitro a esparteína, en cuatro cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 39, 77-82.
- Hidalgo, M., Ramos, C. & Zolla, G. (2023). Analysis of lncRNAs in *Lupinus mutabilis* (Tarwi) and Their Potential Role in Drought Response. *Non-coding RNA*, 9(5), 48.
- Hossain, K.G., Islam, N., Jacob, D., Ghavami, F., Tucker, M. y Kowalski, T. (2013). Interdependence of Genotype and Growing Site on Seed Mineral Compositions in Common Bean. *Asian Journal of Plant Sciences*, 12(1): 11-20.
- Houston, N. L., Fan, C., Xiang, Q. Y., Schulze, J. M., Jung, R. & Boston, R. S. (2005). Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiology*, 137(2), 762-778.
- Huamán, A., Chirinos-Arias, M., Solís, H., Sáez, G., Marocho, L., Guevara, J. & Tapia, M. (2013). Evaluación in vitro de la actividad antileishmanial y antitripanosomal del extracto acuoso de las hojas y semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”. *Anales Facultad de medicina*, 74(Supl 1), S19.
- Huaringa-Joaquin, A., Saldaña, C. L., Saravia, D., García-Bendezú, S., Rodríguez-Grados, P., Salazar, W. & Arbizu, C. I. (2023). Assessment of the genetic diversity and population structure of the peruvian andean legume, tarwi (*Lupinus mutabilis*), with high quality SNPs. *Diversity*, 15(3), 437.
- Hurrell, R. y Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J. Clin Nutr.* 91:1461–1467.
- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M. y Kakei, Y. (2009). Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots

- and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J. Biol. Chem.*, 284:3470–3479.
- Ishimaru, Y., Kim, S., Tsukamoto, T., Oki, H. y Kobayashi, T. (2007). Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 7373–7378.
- Ishimaru, Y., Masuda, H., Bashir, K., Inoue, H., Tsukamoto, T., Takahashi, M. y Nishizawa, N. (2010). Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *The Plant Journal*, 62 (3): 379–390.
- Ivanov, R., Brumbarova, T. & Bauer, P. (2012). Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Molecular plant*, 5(1), 27-42.
- Iyanagi, T. (2022). Roles of Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase and Flavodoxin in NAD (P) H-dependent electron transfer systems. *Antioxidants*, 11(11), 2143.
- Jacobsen, S. E., Miranda, Á., Chalampunte-Flores, D., Rodríguez, J. P., Osorio, L. R. M., Bonjean, A. P. & Sørensen, M. (2023). Agronomical Characterization of Latin-American Crops. In *Latin-American Seeds* (pp. 1-51). CRC Press.
- Jahan, T. A., Kalve, S., Belak, Z., Eskiw, C. & Tar'an, B. (2023). Iron accumulation and partitioning in hydroponically grown wild and cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1092493.
- Jayalakshmi, V., Trivikrama Reddy, A. y Nagamadhuri, K.V. (2018). Genetic diversity and variability for protein and micro nutrients in advance breeding lines and chickpea varieties grown in Andhra Pradesh. *Legume Research*, 1-5.
- Jeng, S. S. & Chen, Y. H. (2022). Association of Zinc with Anemia. *Nutrients*, 14(22), 4918.
- Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E.L. y Guerinot, M.L. (2008). Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 10619–10624.
- Jeong, J. y Guerinot, M. (2009). Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in Plant*

Science, 14(5): 280–285.

- Jiang, X., Yin, J., Wang, L., Xi, K., Zhu, X., Li, G. & Liu, Y. (2022). Identification and evolutionary analysis of the metal-tolerance protein family in eight Cucurbitaceae species. *The Plant Genome*, 15(1), e20167.
- Johnson, A. A., Kyriacou, B., Callahan, D. L., Carruthers, L., Stangoulis, J. y Lombi, E. (2011). Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS One* 6:e24476. doi: 10.1371/journal.pone. 0024476.
- Jumbo Crisanto, J. V. (2019). Guía nutricional para la prevención y tratamiento de anemia ferropénica en mujeres de edad fértil de la sierra (Bachelor's thesis, Quito).
- Kakati, P., Deka, S. C., Kotoki, D. & Saikia, S. (2010). Effect of traditional methods of processing on the nutrient contents and some antinutritional factors in newly developed cultivars of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilezek] and black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] of Assam, India. *International Food Research Journal*, 17(2), 377-384.
- Kalidass, C. & Mohan, V. R. (2012). Nutritional composition and antinutritional factors of little-known species of *Vigna*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(3).
- Kamboj, R. y Nanda, V.N. (2018). Proximate composition, nutritional profile and health benefits of legumes – A review. *Legume Research-An International Journal*, 41(3): 325-332.
- Kang, H. y Primack, R.B. (1999). Evolutionary change in seed size among some legume species: the effects of phylogeny. *Plant Syst Evol*, 219: 151-164.
- Kar, S. & Panda, S. K. (2020). Iron homeostasis in rice: Deficit and excess. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, 227-235.
- Karaköy, T., Halil, E., Baloch, F.S., Toklu, F., Eker, S. y Kilian, B.H. (2012). Ozkan Diversity of macro- and micronutrients in the seeds of lentil landraces, *Scientific World J.*, Article ID 710412: 1-9.
- Kato, T., Kumazaki, K., Wada, M., Taniguchi, R., Nakane, T., Yamashita, K., Hirata, K.,

- Ishitani, R., Ito, K. y Nishizawa, T. (2019). Crystal structure of plant vacuolar iron transporter VIT1. *Nature Plants*, 5: 308–315.
- Kaya, H., Takeda, S., Kobayashi, M. J., Kimura, S., Iizuka, A., Imai, A. & Kuchitsu, K. (2019). Comparative analysis of the reactive oxygen species-producing enzymatic activity of *Arabidopsis* NADPH oxidases. *The Plant Journal*, 98(2), 291-300.
- Khursheed, S. y Khan, S. (2016). Genetic improvement of two cultivars of *Vicia faba* L. using gamma irradiation and ethyl methanesulphonate mutagenesis. *Legume Research - An International Journal*, 40(2): 338-344.
- Kim, S., Takahashi, M., Higuchi, K., Tsunoda, K., Nakanishi, H. y Yoshimura, E. (2005). Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. *Plant Cell Physiol*, 46: 1809–1818.
- Kim, S. A. et al. (2006). Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, 314: 1295–1298.
- Kiranmayi, P., Vijaya, R.K., Santyasyamala, M. y Nagamrutha, M. (2014). Genome-Wide Identification of Transition Metal Ion Transporters in *Oryza sativa*. *J Rice Res.*, 2: 124.
- Kobayashi, T., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K. (2010). Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. *Proc Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, 86: 900–913.
- Kobayashi, T. y Nishizawa, N.K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 63: 131–152.
- Koh, S., Wiles, A. M., Sharp, J. S., Naider, F. R., Becker, J. M. & Stacey, G. (2002). An oligopeptide transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 128(1): 21–29.
- Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. y Nishizawa, N.K. (2004). OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J.*, 39:415–424.
- Kranner, I. & Colville, L. (2011). Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and*

- Experimental Botany, 72(1), 93-105.
- Kroh, G.E. y Pilon, M. (2020). Regulation of iron homeostasis and use in chloroplasts, *Int. J. Mol. Sci.*, 21(9), 3395.
- Kumar, M., Rani, K., Ajay, B.C., Paltel, M.S., Mungra, K.D. y Patel, M.P. (2020). Study of genetic variability, heritability and path analysis for grain micronutrients concentration, yield and component traits in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.)). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2):1402-1409.
- Kumar, G.B.S., Srinivas, L. y Ganapathi, T.R. (2011). Iron Fortification of Banana by the Expression of Soybean Ferritin. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 142: 232–241.
- Kumar, R. K., Chu, H. H., Abundis, C., Vasques, K., Rodríguez, D. C. y Chia, J. C. (2017). Iron-Nicotianamine transporters are required for proper long distance iron signaling. *Plant Physiol.* 175: 1254–1268.
- Kumar, A., Kaur, G., Goel, P., Bhati, K.K., Kaur, M. y Shukla, V. (2019a). Genome-wide analysis of oligopeptide transporters and detailed characterization of yellow stripe transporter genes in hexaploid wheat. *Funct. Integr. Genomics*, 19: 75–90.
- Kumar, S., Palve, A., Joshi, C., Srivastava, R.K. y Rukhsar, R.K. (2019b). Crop biofortification for iron (Fe), zinc (Zn) and vitamin A with transgenic approaches. *Heliyon* 5:1-6.
- Kumar, S., Hash, C.T., Nepolean, T., Mahendrakar, M.D., Satyavathi, C.T., Singh, G., Rathore, A., Yadav, R.S., Gupta, R. y Srivastava, R.K. (2018). Mapping grain iron and zinc content quantitative trait loci in an inbred-derived immortal population of Pearl millet, *Genes*, 9: 248.
- Kumar, S. y Pandey, G. (2020). Biofortification of pulses and legumes to enhance nutrition. *Heliyon* 6: e03682.
- Kurmi, A., Jayswal, D. K., Saikia, D. & Lal, N. (2023). Current Perspective on Malnutrition and Human Health. In *Nano-Biofortification for Human and Environmental Health* (pp. 155-177). Cham: Springer International Publishing
- Kuru, R., Yilmaz, S., Tasli, P. N., Yarat, A. y Sahin, F. (2018). Boron Content of Some Foods Consumed in Istanbul, Turkey. *Biological Trace Element Research*. 187 (1):

1-8.

- Kuwano, M., Ohyama, A., Tanaka, Y., Mimura, T., Takaiwa, F. y Yoshida, K.T. (2006). Molecular breeding for transgenic rice with low-phytic-acid phenotype through manipulating myo-inositol 3-phosphate synthase gene. *Mol. Breed.*, 18: 263- 272.
- Kuswanto, H. (2019). Performance, similarity and genetic parameters of agronomical characters of soybean [*Glycine max* (L) Merrill.] germplasms. *Agr. Nat. Resour.*, 53: 228–236.
- Lager, I. D. A., Andréasson, O. L. A., Dunbar, T. L., Andreasson, E., Escobar, M. A. & Rasmusson, A. G. (2010). Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant, Cell & Environment*, 33(9), 1513-1528.
- Lee, S., Chiecko, J.C., Kim, S.A., Walker, E.L. y Lee, Y. (2009). Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol*, 150:786–800.
- Lee, S., Jeon, J.S. y An, G. (2012). Iron homeostasis and fortification in rice. *J. Plant Biol.*, 55:261–267.
- Le Jean, M., Schikora, A., Mari, S., Briat, J.F. y Curie, C. (2005). A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J.*, 44: 769–782.
- Lesjak, M. & KS Srail, S. (2019). Role of dietary flavonoids in iron homeostasis. *Pharmaceuticals*, 12(3), 119.
- Li, H. y Chiu, C.C. (2010). Protein transport into chloroplasts. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 61:157–80.
- Liu, X., Glahn R.P., Arganosa, G.C. y Warkentin, T.D. (2014a). Iron bioavailability in low phytate pea. *Crop. Sci.* Pag: 1-19.
- Li, W. y Lan, P. (2017). The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I Plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front. Plant Sci.*, 8:40.
- Liu, Z., Zhou, Y., Liu, S., Zhao, Q., Feng, J., Lu, S. y Liu, Y. (2014). Characterization and

dietary regulation of oligopeptide transporter (PepT1) in different ploidy fishes. *Peptides*, 52, 149-156.

Lobo, I. (2008). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nature Education* 1(1), 215.

Longo, A., Miles, N. W. & Dickstein, R. (2018). Genome mining of plant NPFs reveals varying conservation of signature motifs associated with the mechanism of transport. *Frontiers in plant science*, 9, 1668.

Lubkowitz M. (2006). The OPT Family Functions in long-distance peptide and metal transport in plants. In: Setlow J.K. (eds) *Genetic Engineering. Genetic Engineering: Principles and Methods*, Springer, Boston, Vol: 27.

Lubkowitz, M. (2011). The oligopeptide transporters: a small gene family with a diverse group of substrates and functions?. *Mol. Plant*, 4:407– 415.

Lucca, P., Hurrell, R. y Potrykus, I. (2002). Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J. Am. Coll. Nutr.*, 21: 184–190.

Mach, J. & Sutak, R. (2020). Iron in parasitic protists—from uptake to storage and where we can interfere. *Metallomics*, 12(9), 1335-1347.

Mahmood, M. T., Ahmad, M., Ali, I., Hussain, M., Latif, A. & Zubair, M. (2018). Evaluation of chickpea genotypes for genetic diversity through multivariate analysis. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*, 15, 11-17.

Malek, M.A., Rafii, M.Y., Afroz, M.S.S., Nath, U.K. y Mondal, M.M.A. (2014). Morphological characterization and assessment of genetic variability, character association, and divergence in soybean mutants. *The Scientific World Journal*, Pag: 1–12.

Malesza, I. J., Bartkowiak-Wieczorek, J., Winkler-Galicki, J., Nowicka, A., Dzięciołowska, D., Błaszczyk, M. & Mądry, E. (2022). The dark side of iron: The relationship between iron, inflammation and gut microbiota in selected diseases associated with iron deficiency anaemia—A Narrative Review. *Nutrients*, 14(17), 3478.

- Mamani, J. P. (2023). Evaluación de la promoción y revalorización del consumo de tarwi (*Lupinus mutabilis*) en cuatro municipios del departamento de la paz.
- Manasa, B., Priya, M.S., Jayalakshmi, V. y Umamaheswari, P. (2020). Genetic variability studies in extra-large and large seeded kabuli chickpea (*Cicer arietinum*). *Electronic Journal of Plant Breeding*, 11(2): 707-712.
- Margier, M., Georgé, S., Hafnaoui, N., Remond, D., Nowicki, M. y Du Chaffaut, L. (2018). Nutritional composition and bioactive content of legumes: characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the Cooking Method. *Nutrients*, 10: 1-12.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J. & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 50(1), 5-18.
- Masuda, H., Usuda, K., Kobayashi, T., Ishimaru, Y., Kakei, T. y Takahashi, M. (2009). Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene HvNAS1 increases iron and zinc concentration in rice grains. *Rice*, 2: 155–166.
- Mai, H.-J. y Bauer, P. (2016). From the proteomic point of view: Integration of adaptive changes to iron deficiency in plants. *Current Plant Biology*, 5, 45–56.
- Mani, A. y Sankaranarayanan, K. (2018). In silico analysis of natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family of transporters in rice. *Protein J.*, 37:237–247.
- Mansilla, J., Whittembury, A., Chuquimbalqui, R., Laguna, M., Guerra, V. y Agüero, Y. (2017). Modelo para mejorar la anemia y cuidado infantil en un ámbito rural del Perú. *Rev. Panam. Salud Pública*, 41:112.
- Medlineplus. (2020). Anemia. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000560.htm>. (Citado el 3/6/2020).
- Mendoza Ocampo, E. S. (2022). Evaluación de la inocuidad de un producto natural nutracéutico a base de amaranto (*Amaranthus caudatus*), quinua (*Chenopodium quinoa*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*), sobre los niveles de sodio, potasio y ácido úrico sérico como indicadores para alcanzar la homeostasia en diabéticos y/o

- sobrepeso (Doctoral dissertation, [sn]).
- Milman, N. (2011). Postpartum anemia I: definition, prevalence, causes and consequences. *Ann Hematol*, 90, 1247-1252.
- Mamidi, S., Lee, R.K., Goos, J.R. y McClean, P.E. (2014). Genome-wide Association studies identifies seven major regions responsible for iron deficiency chlorosis in soybean (*Glycine max*). *PLoS ONE* 9(9):1-13.
- Monstein, H. J., Östholm-Balkhed, Å., Nilsson, M. V., Nilsson, M., Dornbusch, K. & Nilsson, L. E. (2007). Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *Apmis*, 115(12), 1400-1408.
- Moran Lauter, A.N., Peiffer, G.A. y Yin, T. (2014). Identification of candidate genes involved in early iron deficiency chlorosis signaling in soybean (*Glycine max*) roots and leaves. *BMC Genomics*, 15: 702.
- Morgan, J. B. y Connolly, E. L. (2013). Plant-soil interactions: nutrient uptake. *Nature Education Knowledge*, 4(8):2.
- Mori, S. y Nishizawa, N. (1987). *Plant Cell Physiol.*, 28: 1081–1092.
- Morrissey, J. y Guerinot, M. L. (2009.). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical reviews*, 109(10): 4553–4567.
- Muhamba-Tryphone, G. y Nchimbi-Msolla, S. (2010). Diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in iron and zinc contents under greenhouse conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 5(8): 738 – 747.
- Mukherjee, I., Campbell, N. H., Ash, J. S. & Connolly, E. L. (2006). Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta*, 223, 1178-1190.
- Murata, Y., Ma, J.F., Yamaji, N., Ueno, D., Nomoto, K. y Iwashita, T. (2006). A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant*, 46:563–572.
- Naranjo-Arcos, M.A., Maurer, F., Meiser, J., Pateyron, S., Fink-Straube, C. y Bauer, P. (2017). Dissection of iron signaling and iron accumulation by overexpression of

- subgroup Ib bHLH039 protein. Scientific report, 7 (1): 1-12.
- Negishi, T., Nakanishi, H., Yazaki, J., Kishimoto, N., Fujii, F. y Shimbo, K. (2002) cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J.* 30: 83–94.
- Nestel, P., Bouis, H.E., Meenakshi, J. V. y Pfeiffer, W. (2006). Biofortification of staple food crops. *The Journal of Nutrition*, 136(4): 1064–1067.
- Noma, M., Noguchi, M. and Tamaki, E. (1971). A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. *Tetrahedron Lett.* 22: 2017–2020.
- Noto, J. M., Piazuolo, M. B., Shah, S. C., Romero-Gallo, J., Hart, J. L., Di, C. & Peek, R. M. (2022). Iron deficiency linked to altered bile acid metabolism promotes *Helicobacter pylori*-induced inflammation-driven gastric carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(10).
- Nozoye, T., Kim, S., Kakei, Y., Takahashi, M., Nakanishi, H. and Nishizawa, N. K. (2014). Enhanced levels of nicotianamine promote iron accumulation, and tolerance to calcareous soil in soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1677–1684.
- Nozoye, T. (2018). The nicotianamine synthase gene is a useful candidate for improving the nutritional qualities and Fe-deficiency tolerance of various crops. *Front. Plant Sci.* 9(340):1-13.
- Oki, H., Kim, S., Nakanishi, H., Takahashi, M. y Yamaguchi, H. (2004), Directed evolution of yeast ferric reductase to produce plants with tolerance to iron deficiency in alkaline soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50: 1159–1165.
- Ortega-David, E., Rodríguez, A., David, A. y Zamora-Burbano, A. (2010). Characterization properties of lupin (*Lupinus mutabilis*) seeds grown in the Colombian Andean region. *Acta agronómica*, 59: 111-118.
- Paramonova, N. V., Shevyakova, N. I. & Kuznetsov, V. V. (2007). Ultrastructure of ferritin in the leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* under stress conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 244-256.
- Paredes, C., Becerra, V. y Tay, J. (2009). Inorganic nutritional composition of common

- bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes race Chile. Chilean Journal of Agricultural Research, 69(4): 486-495.
- Pearce, S., Tabbita, F., Cantu, D., Buffalo, V., Avni, R., Vazquez-Gross, H. & Dubcovksy, J. (2014). Regulation of Zn and Fe transporters by the GPC1 gene during early wheat monocarpic senescence. BMC Plant Biology, 14, 1-23.
- Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Preben Morth, J., Palmgren, M. G. & Nissen, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. Nature, 450(7172), 1111-1114.
- Pereira, T., Coelho, C., Bogo, A., Guidolin, A. y Miquelluti, D. (2009). Diversity in common bean landraces from south Brazil. Acta Botanica Croatica, 68(1), 79-92.
- Peris-Peris, C., Serra-Cardona, A., Sánchez-Sanuy, F., Campo, S., Ariño, J. y San Segundo, B. (2016). Two NRAMP6 isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in rice. Mol Plant Microbe Interact, 30(5): 385-398.
- Petry, N., Boy, E., Wirth, J. P. & Hurrell, R. F. (2015) Review: The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. Nutrients, 7: 1144–1173.
- Phan-Thien, K. Y., Wright, G. C. & Lee, N. A. (2010). Genotype-by-environment interaction affects the essential mineral composition of peanut (*Arachis hypogaea* L.) kernels. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(16), 9204-9213.
- Pineau, C., Loubet, S., Lefoulon, C., Chalies, C. y Fizames, C. (2012), Natural Variation at the FRD3 MATE Transporter locus reveals cross-talk between Fe homeostasis and Zn tolerance in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet 8(12):1-10.
- Philipo, M., Ndakidemi, P.A. y Mbega, E.R. (2020). Environmental and genotypes influence on seed iron and zinc levels of landraces and improved varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Tanzania. Ecological Genetics and Genomics, 15: 1-10.
- Piskin, E., Cianciosi, D., Gulec, S., Tomas, M. & Capanoglu, E. (2022). Iron absorption: factors, limitations, and improvement methods. ACS omega, 7(24), 20441-20456.

- Platre, M. P., Satbhai, S. B., Brent, L., Gleason, M. F., Cao, M., Grison, M. & Busch, W. (2022). The receptor kinase SRF3 coordinates iron-level and flagellin dependent defense and growth responses in plants. *Nature Communications*, 13(1), 4445.
- Popova, A. & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in plant-based foods: A review. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1).
- Porebski, B. T. & Buckle, A. M. (2016). Consensus protein design. *Protein Engineering. Design and Selection*, 29(7), 245-251.
- Puig, S. y Peñarrubia, L. (2009). Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Current opinion in plant biology*, 12 (3): 299-306.
- Puma Quispe, C. (2023). Niveles de fertilización y densidades de siembra en rendimiento de tarwi (*Lupinus mutabilis*, Sweet) en la comunidad campesina de Phuyucalla distrito, provincia de Paucartambo–región Cusco.
- Ramos, C. Regulación del crecimiento de yemas florales en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) Por RNA-Seq. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú, 2021.
- Rauf, S., da Silva, J. T., Khan, A. A. & Naveed, A. (2010). Consequences of plant breeding on genetic diversity. *International Journal of plant breeding*, 4(1), 1-21.
- Ray, H., Bett, K., Tar'an, B., Vandenberg, A., Thavarajah, D. y Warkentin, T. (2018). Mineral micronutrient content of cultivars of Field Pea, Chickpea, Common Bean, and Lentil Grown in Saskatchewan, Canada. *Crop Sci*, 54: 1698–1708.
- Remines, M., Schnoover, M., Zoey, K., Kailee, K., Hoffert, K. M., Coric, A. & Strome, E. (2023). Profiling the compendium of changes in *Saccharomyces cerevisiae* due to mutations that alter availability of the main methyl donor S-Adenosylmethionine. *bioRxiv*, 2023-06.
- Riedelsberger, J., Miller, J. K., Valdebenito-Maturana, B., Piñeros, M. A., González, W. & Dreyer, I. (2021). Plant HKT channels: an updated view on structure, function and gene regulation. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1892.
- Rigo, G.A., Schuch, L.O.B., Vargas, R.L., Barros, W.S., Szarecki, V.J. y Carvalho, I.R. (2018). Micronutrient content and physiological quality of soybean seeds. *Journal of Agricultural Science*, 10(4): 223-230.

- Rodriguez-Ortega, D., Zambrano, J. L., Pereira-Lorenzo, S., Torres, A. & Murillo, A. (2023). Lupinus mutabilis Breeding in the Andes of Ecuador, Peru, and Bolivia: A Review. *Agronomy*, 14(1), 94.
- Rodríguez-Ramiro, I., Brearley, C., Bruggraber, S.F.A., Perfecto, A., Shewry, P. y Fairweather-Tait, S. (2017). Assessment of iron bioavailability from different bread making processes using an in vitro intestinal cell model. *Food Chemistry*, 228: 91-98.
- Roman, D. G., Dancis, A., Anderson, G. J. & Klausner, R. D. (1993). The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Molecular and cellular biology*, 13(7), 4342-4350.
- Roschttardt, H., Segúla-Arnaud, M., Briat, J., Vert, G. y Curie, C. (2011). The FRD3 citrate effluxer promotes iron nutrition between symplastically disconnected tissues throughout Arabidopsis development. *Plant Cell*, 23: 2725–2737.
- Rogers, E.E. and Guerinot, M.L. (2002). FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 1787–1799.
- Rueda Restrepo, J. A. & Cotes Torres, J. M. (2009). Evaluación de dos métodos de estabilidad fenotípica a través de validación cruzada. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín*, 62(2), 5111-5123.
- Ruiz, K.B., Biondi, S. y Oses, R. (2014). Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 349–359.
- Ruiz, R. G., Price, K. R., Rose, M. E., Arthur, A. E., Petterson, D. S. & Fenwick, R. (1995). The effect of cultivar and environment on saponin content of Australian sweet lupin seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(3), 347-351.
- Saba, I., Sofi, P.A., Zeerak, N.A., Bhat, M.A. y Mir, R.R. (2016). Characterization of a core set of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm for seed quality traits. *Journal of Breeding and Genetics*, 48(3): 359-376.
- Sangronis, E. & Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality

- of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. LWT-Food Science and Technology, 40(1), 116-120.
- Saki, A., Zaman, M.A., Tuhina-Khatun, M., Kamal, M.M. y Begum, H. (2009). Genetic variability, correlation and path Co-efficient analysis for agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). The Agriculturists, 7(1): 12-21.
- Santos, C.S., Carbas, B., Castanho, A., Bronze, M.R., Serrano, C. y Vasconcelos, M.W. (2018). Relationship between seed traits and pasting and cooking behaviour in a pulse germplasm collection. Crop & Pasture Science, 69: 892–903.
- Sarika, K., Bharadwaj, C., Kumar, T., Sachdeva, S., Satyavathi, C.T. y Jain, P.K. (2019). Correlation of seed quality traits with 100 seed weight in chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. International Journal of Chemical Studies, 7(3): 4006-4011.
- Sarker, A., Rizvi, A.H. y Singh, M. (2018). Genetic variability for nutritional quality in Lentil (*Lens culinaris* Medikus Subsp. culinaris). Legume Research, Pag: 1-6.
- Satbhai, S.B., Setzer, C., Freynschlag, F., Slovak, R. y Kerdaffrec, E. (2017). Natural allelic variation of FRO2 modulates Arabidopsis root growth under iron deficiency. Nature communications 8: 1-10.
- Shamsuddin, A.M. (2008). Demonizing phytate. Nat. Biotechnol., 26: 496-497.
- Sharma, S., Goyal, R. & Barwal, S. (2013). Domestic processing effects on physicochemical, nutritional and anti-nutritional attributes in soybean (*Glycine max* L. Merrill). International Food.
- Sharma, S. y Singh, S. (2017). Comparison of cell wall constituents, nutrients and anti-nutrients of lupin genotypes. Legume Research-An International Journal, 40(3), 478-484.
- Schuler, M., Rellán-Álvarez, R., Fink-Straube, C., Abadía, J. and Bauer, P. (2012). Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in Arabidopsis. Plant Cell 24, 2380–2400.
- Schuler, M. y Bauer, P. (2012). Strategies for Iron Biofortification of Crop plants, Food Quality, Dr. Kostas Kapiris (Ed.), ISBN: 978-953-51-0560-2, InTech, Available

from: <http://www.intechopen.com/books/food-quality/strategies-for-iron-biofortification-of-crop-plants>.

Schuback, N. & Tortell, P. D. (2019). Diurnal regulation of photosynthetic light absorption, electron transport and carbon fixation in two contrasting oceanic environments. *Biogeosciences*, 16(7), 1381-1399.

Sequeiros Huachaca, F. E. (2022). Potencial de nutrientes, bioactividad y funcionalidad de Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.), Maíz (*Zea mays*) y Tarwi (*Lupinus mutabilis* S.) de la región Apurímac.

Sheng, H., Jiang, Y., Ishka, M. R., Chia, J. C., Dokuchayeva, T., Kavulych, Y. & Vatamaniuk, O. K. (2019). YSL3-mediated copper distribution is required for fertility, grain yield, and size in *Brachypodium*. *bioRxiv*, 2019-12.

Shokunbi, O., Adepoju, O., Mojapelo, P., Ramaite, I. y Akinyele, I. (2019). Copper, manganese, iron and zinc contents of Nigerian foods and estimates of adult dietary intakes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82: 103-245.

Shrestha, R., Rizvi, A.H., Sarker, A., Darai, R., Paneru, R.B. y Vandenberg, A. (2018). Genotypic Variability and Genotype x Environment Interaction for Iron and Zinc Content in Lentil under Nepalese Environments. *Crop Sci.*, 58: 2503–2510.

Senoura, T., Sakashita, E. y Kobayashi, T. (2017). The iron-chelate transporter OsYSL9 plays a role in iron distribution in developing rice grains. *Plant Mol Biol* **95**, 375–387.

Silva López, D. J. (2024). Factores nutricionales y obstétricos asociados a anemia en gestantes. Centro de Salud Baños Del Inca-Cajamarca, 2021-2022.

Sinkovič, L., Pipan, B., Sinkovič, E. y Meglic, V. (2019). Morphological Seed Characterization of Common (*Phaseolus vulgaris* L.) and Runner (*Phaseolus coccineus* L.) Bean germplasm: A Slovenian gene bank example. *BioMed Research International*, Pag: 1-12.

Singh, R., Misra, A. N. & Sharma, P. (2021). Effect of arsenate toxicity on antioxidant enzymes and expression of nicotianamine synthase in contrasting genotypes of bioenergy crop *Ricinus communis*. *Environmental Science and Pollution Research*,

28, 31421-31430.

- Singh, S.P., Keller, B., Gruissem, W. y Bhullar, N.K. (2017). Rice NICOTIANAMINE SYNTHASE 2 expression improves dietary iron and zinc levels in wheat. *Theor Appl Genet* 130: 283–292.
- Sjamsijah, N., Rahayu, S., Suharjono, S., Rosdiana, E. y Santika, P. (2020). Yield enhancement of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) in genotypes ‘Polije-4’ and ‘Polije-5’ through Backcross with large seed donor parent. *Earth Environ Sci*, 411:1-6.
- Stacey, M.G., Osawa, H, y Patel, A. (2006). Expression analyses of Arabidopsis oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction. *Planta*, 223: 291–305.
- Staiger, D. (2002). Chemical strategies for iron acquisition in plants. *Angewandte Chemie International Edition*, 41 (13), 2259-2264.
- Stock, C., Heger, T., Basse Hansen, S., Thirup Larsen, S., Habeck, M., Dieudonné, T. & Nissen, P. (2023). Fast-forward on P-type ATPases: recent advances on structure and function. *Biochemical Society Transactions*, BST20221543.
- Sun, C-W., Chen, L-J., Lin, L-C. y Li, H-m. (2001). Leaf-specific upregulation of chloroplast translocon genes by a CCT motif-containing protein, CIA 2. *Plant Cell* 13:2053–2061.
- Taípe-Ruiz, B. R. y Troncoso-Corzo, L. (2019). Anemia en el primer control de gestantes en un centro de salud de Lima, Perú y su relación con el estado nutricional pregestacional. *Horizonte Médico (Lima)*, 19(2), 6-11.
- Takizawa, R., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H. y Mori, S. (1996). Effect of iron deficiency on S-adenosylmethionine synthetase in barley roots. *J. Plant Nutr.*, 19: 1189–1200.
- Takkuri, R., Sadhukhan, R. y Vangaru, S. (2017). Genetic variability studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.) for yield and yield related traits. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 6(2): 177-183.
- Tapia, M.E. y Fries, A.M. (2019). FAO: Field guide to Andean crops, Lima, Peru: Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] and National

- Association of Ecological Products of Peru [ANPE] 2007 [cited 2019 November 20]. Available from: www.fao.org.
- Taylor, J. L., & De Angelis, G. (2020). and Matthew N. Nelson. The Lupin Genome, 95.
- Teng, W., Han, Y., Du, Y., Sun, D., Zhang, Z. y Qiu, L. (2009). QTL analyses of seed weight during the development of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Heredity*, 102: 372–380.
- Thomine, S. y Lanquar, V. (2011). Iron transport and signaling in plants. Transporters and pumps in plant signaling, *Signaling and Communication in Plants*, eds Geisler M, Venema K (Springer, Berlin), Pag: 99–131.
- Toklu, F. (2015). Effects of different priming treatments on seed germination properties, yield components and grain yield of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(1), 153-158.
- Tomar, S., Subba, A., Bala, M., Singh, A. K., Pareek, A. & Singla-Pareek, S. L. (2022). Genetic conservation of CBS domain containing protein family in *Oryza* species and their association with abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1687.
- Tong, J., Sun, M., Wang, Y., Zhang, Y., Rasheed, A., Li, M. & Hao, Y. (2020). Dissection of molecular processes and genetic architecture underlying iron and zinc homeostasis for biofortification: from model plants to common wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9280.
- Toxqui, L., De Piero, A., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. y Vaquero, M. (2010). Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 25(3), 350-365.
- Tresina, P. S. & Mohan, V. R. (2012). Physico-chemical and antinutritional attributes of gamma irradiated *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata* seeds. *International Food Research*.
- Vandemark, G.J., Brick, M.A., Osorno, J.M., Kelly, J.D. y Urrea, C.A. (2014). Edible grain legumes. Special Publication 33. In: S. Smith, B. Diers, J. Specht, and B. Carver, editors.

- Vasconcelos, M.W., Li, G.W., Lubkowitz, M.A. y Grusak, M.A. (2008). Characterization of the PT clade of oligopeptide transporters in rice. *Plant Genome*, 1(2008): 77–88.
- Vásquez, E. (2003). La anemia en la infancia, *Rev. Panam. Salud Pública*, 13(6):349-51.
- Vatansever, R., Filiz, E. & Ozyigit, I. I. (2016). In silico analysis of Mn transporters (NRAMP1) in various plant species. *Molecular biology reports*, 43(3), 151-163.
- Vera-Vega, M., Jimenez-Davalos, J. y & Zolla, G. (2022). The micronutrient content in underutilized crops: the *Lupinus mutabilis* sweet case. *Scientific Reports*, 12(1), 15162.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F. y Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 2002, 14: 1223–1233.
- Verma, S.K., Bisht, C., Kumar, G.A. y Chandra, D. (2018). Study on some genetic parameters for yield and related traits in Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] Genotypes. *Chemical Science Review and Letters*, 7(25): 70-76.
- Vert, G. A., Briat, J. F. & Curie, C. (2003). Dual regulation of the Arabidopsis high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiology*, 132(2), 796-804.
- Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K. and Briat, J.-F. (2013) Cellular iron homeostasis and metabolism in plant. *Front. PlantSci.* 4:490. doi: 10.3389/fpls.2013.00490
- Vitenskapskomiteen for mat og miljø (VKM). (2018). Assessment of dietary intake of manganese in relation to tolerable upper intake. Opinion of the Panel on Nutrition, Shokunbi Dietetic Products, Novel Food and Allergy of the Norwegian Scientific Committee for Food and Environment. VKM Report 2018: 02, ISBN: 978-82-8259-299, Oslo, Norway. Available online: www.vkm.no.
- Vleeshouwers, V. G., Martens, A., van Dooijeweert, W., Colon, L. T., Govers, F. & Kamoun, S. (2001). Ancient diversification of the Pto kinase family preceded speciation in Solanum. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(8), 996-1005.
- Warkentin, T. D., Delgerjav, O., Arganosa, G., Rehman, A. U., Bett, K. E., Anbessa, Y.,

- Rosnagel, B. y Raboy, V. (2012). Development and characterization of low-phytate pea. *Crop Sci.*, 52: 74–78.
- Waters, B.M., Chu, H.H., Didonato, R.J., Roberts, L.A., Eislely, R.B., Lahner, B., Salt, D.E. y Walker, E.L. (2006). Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol.*, 141: 1446–1458
- Waters, B. M., Amundsen, K. y Graef, G. (2018). Gene expression profiling of iron deficiency chlorosis sensitive and tolerant soybean indicates key roles for phenylpropanoids under alkalinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 10.
- Welch, R.M. y Graham, R.D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.*, 55: 353-364
- Xiong, H.C., Kobayashi, T., Kakei, Y., Senoura, T., Nakazono, M., Takahashi, H., Nakanishi, H., Shen, H.Y., Duan, P.G. y Guo, X.T. (2012). AhNRAMP1 iron transporter is involved in iron acquisition in peanut, *J. Exp. Bot.*, 63:4437–4446.
- Yeken, M.Z., Kantar, F., Çancı, H., Özer, G. y Çiftçi, V. (2018) Breeding of dry bean cultivars using *Phaseolus vulgaris* Landraces in Turkey. *International Journal of Agricultural and Wildlife Sciences*, 4(2):261-269.
- Yip, R. (2003). En: *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 8 ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, 340-356.
- Yi, Y. y Guerinot, M.L. (1996). Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.*, 10: 835–844.
- Yoshida, K. and Negishi, T. (2013). The identification of a vacuolar iron transporter involved in the blue coloration of cornflower petals. *Phytochemistry* 94: 60–67.
- Yokosho, K., Yamaji, N., Ueno, D., Mitani, N. and Ma, J.F. (2009). OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol.*, 149: 297–305.
- Yoshiaki, U., Yasuhito, S. y Shuichi, Y. (2021). Environmental control of phosphorus acquisition: A piece of the molecular framework underlying nutritional

homeostasis. *Plant and Cell Physiology*,
pcab010, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab010>.

Yuan, W., Zhang, D., Song, T., Xu, F., Lin, S., Xu, W., Li, Q., Zhu, Y., Liang, J. y Zhang, J. (2017). Arabidopsis plasma membrane H⁺-ATPase genes AHA2 and AHA7 have distinct and overlapping roles in the modulation of root tip H⁺ efflux in response to low-phosphorus stress. *J. Exp. Bot.*, 68: 1731–1741.

Zang, J., Huo, Y., Liu, J., Zhang, H., Liu, J. & Chen, H. (2020). Maize YSL2 is required for iron distribution and development in kernels. *Journal of Experimental Botany*, 71(19), 5896-5910.

Zasoski R. y Burau R. (1977). A rapid nitric-perchloric acid digestion method for multi-element tissue analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 8(5): 425-436.

Zhai, Z., Gayomba, S.R., Jung, H.I., Vimalakumari, N.K., Pineros, M., Craft, E., Rutzke, M.A., Danku, J., Lahner, B. y Punshon, T. (2014). OPT3 is a phloem-specific iron transporter that is essential for systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in Arabidopsis. *Plant Cell*, 26:2249–2264.

Zhang, X., Zhang, D., Sun, W. y Wang, T. (2019). The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 2424.

Zhong, L., Fang, Z., Wahlqvist, M.L., Wu, G., Hodgson, J.M. y Johnson, S.K. (2018). Seed coats of pulses as a food ingredient: characterization, processing, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 80:1-50.

VIII. ANEXOS

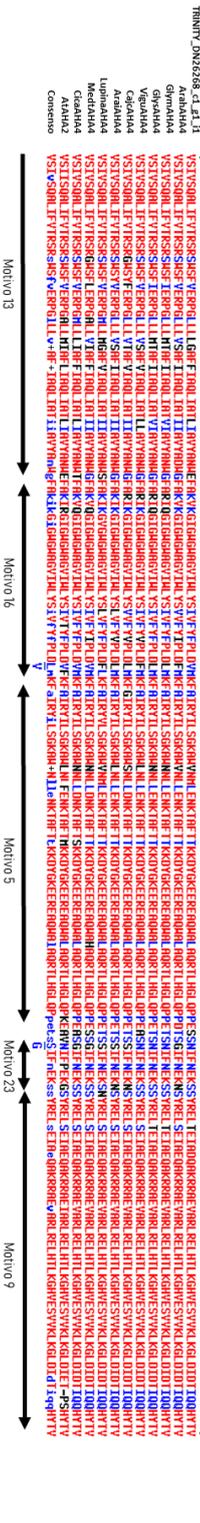
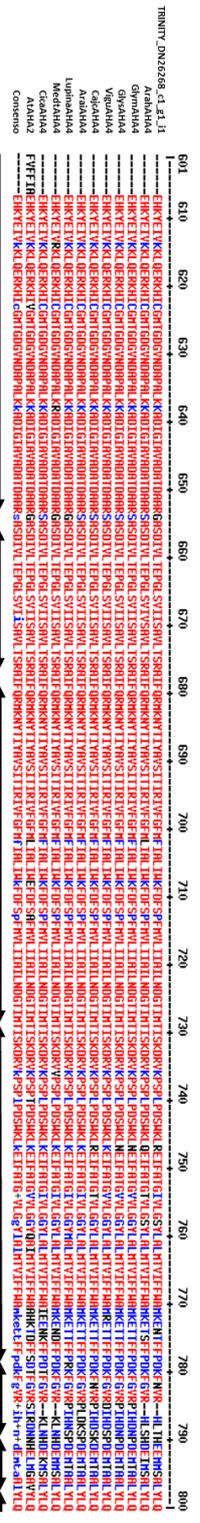
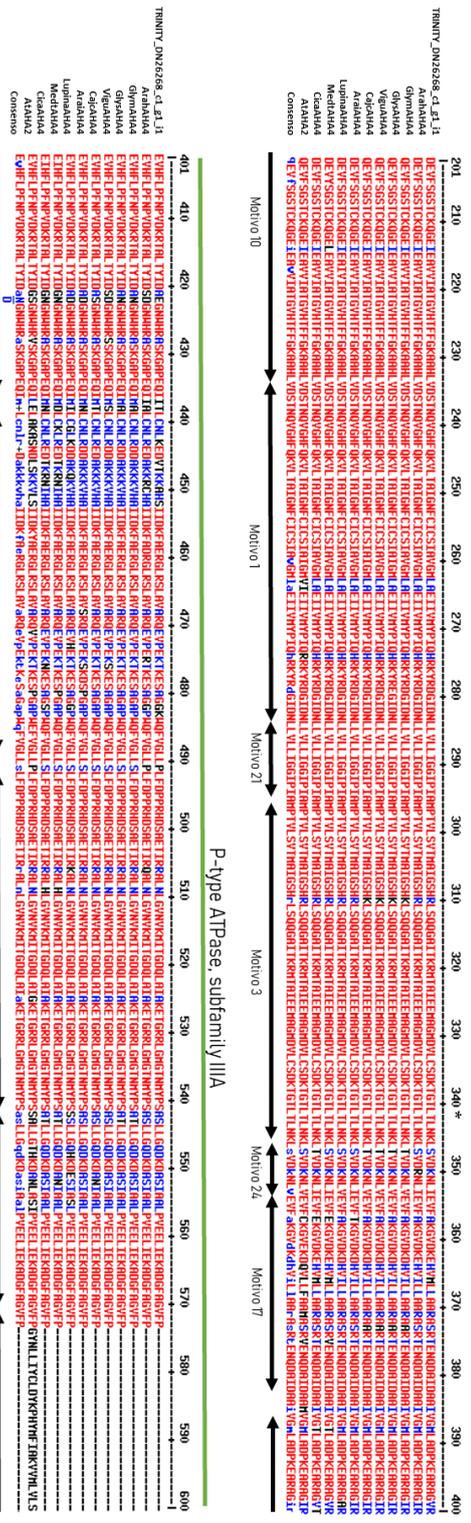
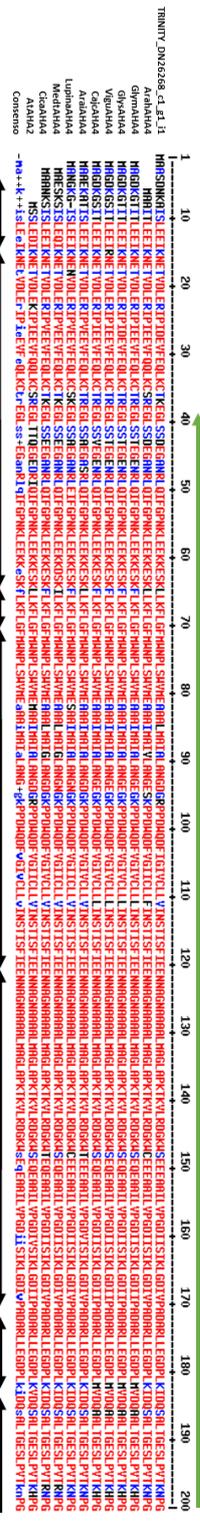
Anexo 1. Tabla resumen del contenido de micronutrientes y características morfológicas de las semillas de las accesiones precoces y tardías de tarwi seleccionadas

Características	Accesiones	Fe (ppm)			Zn (ppm)			B (ppm)		
		P14	P16	P21	P14	P16	P21	P14	P16	P21
Accesiones	Floración precoz	P14	P16	P21	P14	P16	P21	P14	P16	P21
Mínimo		62.00	69.00	69.00	36.00	35.00	35.00	25.00	27.00	27.00
Máximo		67.00	87.00	87.00	45.00	38.00	38.00	33.00	38.00	38.00
Promedio		64.67	76.33	76.33	40.67	36.33	36.33	29.33	31.33	31.33
Desviación estandar		2.52	9.45	9.45	4.51	1.53	1.53	4.04	5.86	5.86
CV (%)		3.89	12.38	12.38	11.09	4.20	4.20	13.78	18.70	18.78
Accesiones	Floración tardía	T05	T08	T25	T05	T08	T25	T05	T08	T25
Mínimo		63.00	51.00	44.00	36.00	36.00	38.00	22.00	24.00	25.00
Máximo		78.00	54.00	53.00	45.00	49.00	48.00	24.00	26.00	29.00
Promedio		70.33	52.67	47.00	39.67	40.33	43.67	23.00	25.00	27.33
Desviación estandar		7.51	1.53	5.20	4.73	7.51	5.13	1.00	1.00	2.08
CV (%)		10.67	2.90	11.06	11.91	18.61	11.75	4.35	4.00	7.62

Características	Accesiones	Cu (ppm)			Mn (ppm)			CVM ≤ 10%		
		P14	P16	P21	P14	P16	P21	P14	P16	P21
Accesiones	Floración precoz	P14	P16	P21	P14	P16	P21	4.78	7.51	10
Mínimo		8.00	6.00	6.00	24.00	25.00	25.00			
Máximo		9.00	7.00	7.00	25.00	26.00	26.00			
Promedio		8.00	6.33	6.33	24.67	25.33	25.33			
Desviación estandar		0.58	0.00	0.58	0.58	0.58	0.57			
CV (%)		7.22	0.00	9.22	2.34	2.28	7.22			
Accesiones	Floración tardía	T05	T08	T25	T05	T08	T25	9.72	6.94	6.53
Mínimo		7.00	10.00	9.00	21.00	25.00	25.00			
Máximo		9.00	10.00	9.00	25.00	21.00	26.00			
Promedio		8.00	10.00	9.00	22.67	22.67	25.67			
Desviación estandar		1.00	0.00	0.00	2.08	2.08	0.58			
CV (%)		12.50	0.00	0.00	9.18	9.18	2.25			

Características	Accesiones	Ancho de semilla (mm)			Largo de semilla (mm)			Peso de 100 semillas (g)		
		P14	P16	P21	P14	P16	P21	P14	P16	P21
Accesiones	Floración precoz	P14	P16	P21	P14	P16	P21	P14	P16	P21
Mínimo		9.02	8.53	9.33	11.05	10.40	11.50	27.35	27.37	30.11
Máximo		9.50	8.88	9.35	11.73	10.57	11.84	28.88	28.78	31.06
Promedio		9.29	8.76	8.58	11.43	10.50	10.53	28.04	28.16	26.42
Desviación estandar		0.24	0.20	0.27	0.34	0.09	0.16	0.78	0.72	0.87
CV (%)		2.63	2.24	3.11	3.02	0.84	1.50	2.77	2.56	3.30
Accesiones	Floración tardía	T05	T08	T25	T05	T08	T25	T05	T08	T25
Mínimo		7.21	8.53	7.87	9.30	9.65	9.95	20.59	21.99	20.24
Máximo		7.64	8.88	8.05	9.70	9.83	10.47	21.40	22.49	20.74
Promedio		7.39	7.81	7.97	9.46	9.78	10.27	20.94	22.29	20.52
Desviación estandar		0.23	0.06	0.09	0.21	0.11	0.28	0.42	0.27	0.26
CV (%)		3.05	0.79	1.17	2.25	1.17	2.73	1.99	1.20	1.25

Anexo 2. Dominio, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína AHA2



P-type ATPase subfamily IIIA

Anexo 4. Dominios, motivos y secuencia consenso determinados para la proteína NAS1

