

**“Identificación y predicción funcional de ARNs largos no codificantes (lncRNAs)
asociados a respuesta inmune en *Lupinus luteus* ante la infección por *Colletotrichum
lupini*”**

Tesis

Entregada a la
Universidad de Valparaíso,
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas mención Biodiversidad y Conservación
Instituto de Biología, Facultad de Ciencias

Por

Almendra Paz Hidalgo Cabrera

Marzo, 2025

INSTITUTO DE BIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister
presentada por el candidato

Almendra Paz Hidalgo Cabrera

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis, como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Biodiversidad y Conservación, en el examen de defensa de tesis rendido el día 07 de marzo de 2025.

Directores de Tesis:

Prof. Dr. Pablo Conejeros Abraham

Prof. Dr. J. Eduardo Martínez Hernández

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Prof. Dr. Pablo Conejeros Abraham

Prof. Dr. J. Eduardo Martínez Hernández

Prof. Dra. Carmen Gloria Ossa

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue desarrollada como parte del proyecto R20F0003 “*Grain legume signalling and responding to environmental stresses*”, adjudicado por el Centro de Genómica Nutricional Agrícola (CGNA) en la Araucanía. Agradezco el recibimiento del centro y sus investigadores, en particular al Dr. J. Eduardo Martínez por su motivación, disposición y guía constante para el desarrollo de esta tesis y fomentar mi participación en la III reunión anual de la Sociedad Chilena de Bioinformática. Agradezco también a la Dra. Grace Armijo Godoy, por su colaboración en la investigación y disposición a la ayuda durante todo el proceso.

Por otra parte, agradecer a todo el trabajo detrás de los avances tecnológicos, cada código, herramienta bioinformática, divulgadores científicos y tutoriales de acceso público que permiten hoy en día investigar secuencias que antes eran imposibles. El acceso al conocimiento y la colaboración es clave para un desarrollo íntegro en las ciencias.

De manera personal, quisiera agradecerme por haber ido más allá y haberme atrevido a desarrollar un trabajo en áreas desconocidas, en donde sólo con paciencia hacia mí y constancia, pude enfrentar los desafíos. Estoy agradecida de los conocimientos aprendidos, de los investigadores que pude conocer, de las experiencias adquiridas, del Magíster, los profesores que apoyaron el desarrollo de la tesis y de mi madre...por su ejemplo de constante alegría, perseverancia y profesionalismo, que me ha ayudado en gran medida a enfrentar mis miedos y recibir con brazos abiertos todo lo que está por venir.

Gracias mamá!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Principales impactos ambientales de la agricultura	8
1.2 <i>Lupinus luteus</i> como una fuente de proteína vegetal alternativa y sustentable	12
1.3 La antracnosis como amenaza para el desarrollo de cultivos de <i>L. luteus</i>	17
1.4 Mecanismos de resistencia ante patógenos en plantas.....	21
1.5 ARNs largos no codificantes (lncRNAs) y sus implicancias en resistencia.....	26
1.6 Estudios de lncRNAs en plantas de lupino	30
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 Obtención de librerías de RNA-seq de <i>L. luteus</i>	34
3.2 Mapeo y ensamble a partir de librerías de RNA-seq de <i>L. luteus</i>	35
3.3 Identificación de ARNs largos no codificantes	36
3.4 Análisis de expresión diferencial de lncRNAs entre genotipos de <i>L. luteus</i> resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis.....	37
3.5 Análisis de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes de <i>L. luteus</i> en genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis	37
3.6 Predicción funcional de lncRNAs de <i>L. luteus</i> y sus <i>targets</i>	39
3.7 Predicción de mecanismo de regulación entre lncRNAs y sus <i>targets</i>	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Identificación de lncRNAs a partir de librerías de RNA-seq de <i>L. luteus</i> resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis.....	40
4.2 Análisis de expresión diferencial de lncRNAs entre genotipo de <i>L. luteus</i> resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis.....	43
4.3 Análisis de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes de <i>L. luteus</i> en genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis	47
4.4 Predicción funcional de lncRNAs y <i>targets</i> de <i>L. luteus</i> asociados a respuesta inmune....	50
4.5 Predicción de mecanismo de regulación entre <i>lncRNA25730</i> , <i>lncRNA24719</i> y sus <i>targets</i>	57
5. DISCUSIÓN	58
6. CONCLUSIONES	67
7. REFERENCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas como fertilizante natural	10
Figura 2. <i>Lupinus luteus</i>	14
Figura 3. Hipocótilos de <i>Lupinus luteus</i> infectados por <i>Colletotrichum lupini</i> en genotipo resistente (C98) y susceptible (C195).....	16
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum lupini</i>	19
Figura 5. Mecanismos de defensa ante patógenos en plantas.....	25
Figura 6. Principales ARNs no codificantes descritos en plantas.....	27
Figura 7. Mecanismos funcionales de lncRNAs.....	28
Figura 8. Flujo de trabajo para la predicción del lncRNAs y genes <i>target</i> a partir de librerías de RNA-seq de <i>Lupinus luteus</i>	35
Figura 9. Identificación de lncRNAs de <i>Lupinus luteus</i> a partir de librerías de RNA-seq.....	42
Figura 10. Proporción de lncRNAs y genes codificantes diferencialmente expresados por genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) a diferentes horas post-infección.....	43
Figura 11. Contraste de genes de lncRNAs y genes codificantes diferencialmente expresados en genotipo resistente (R, C98) y susceptible (S, C195) ante la infección.....	45
Figura 12. Mapa de calor de resultados de co-expresión de WGCNA entre módulos de genes de <i>Lupinus luteus</i> y su asociación ante la resistencia e infección por <i>Colletotrichum lupini</i>	49
Figura 13. Redes de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes de <i>Lupinus luteus</i> ante la infección por <i>Colletotrichum lupini</i>	52
Figura 14. Sub-redes de co-expresión entre lncRNAs de <i>Lupinus luteus</i> y sus <i>targets</i>	55
Figura 15. Niveles de expresión de <i>lncRNA25730</i> y <i>lncRNA24719</i> de <i>Lupinus luteus</i> , junto a sus <i>targets</i>	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Librerías de RNA-seq utilizadas.....	41
Tabla 2. Número de genes de lncRNAs y genes codificantes (cRNAs) diferencialmente expresados (DE) en genotipo de <i>Lupinus luteus</i> resistente (C98) y susceptible (C195) ante la infección por <i>Colletotrichum lupini</i>	44
Tabla 3. Niveles de expresión diferencial de 20 lncRNAs diferencialmente expresados (DE) en todas las horas post-infección en el genotipo C98 de <i>Lupinus luteus</i> ante la infección por <i>Colletotrichum lupini</i>	45
Tabla 4. Módulos de co-expresión de genes de <i>Lupinus luteus</i> y su asociación ante la infección por <i>Colletotrichum lupini</i>	48
Tabla 5. Anotación funcional de <i>targets</i> de lncRNAs.....	54
Tabla 6. Localización de <i>lncRNA25730</i> y <i>lncRNA24719</i> junto a sus respectivos <i>targets</i>	57

RESUMEN

Lupinus luteus es una leguminosa destacada por sus propiedades nutricionales y ecosistémicas, siendo considerada como una alternativa sustentable de proteína vegetal ante los desafíos actuales en la agricultura y el cambio climático. Sin embargo, su cultivo es principalmente amenazado por la antracnosis provocada por el hongo *Colletotrichum lupini*, la cual es controlada mediante el uso de pesticidas. Previamente, se ha reportado que ARNs largos no codificantes (lncRNAs) estarían involucrados en la regulación de la resistencia a patógenos en plantas. Sin embargo, no hay antecedentes publicados sobre el rol de lncRNAs en respuesta inmune en *L. luteus* ante la antracnosis, pudiendo conformar nuevas estrategias sustentables para el control de la enfermedad. En este estudio fueron identificados por primera vez lncRNAs de *L. luteus* involucrados en respuesta inmune ante la antracnosis, mediante el reanálisis de 32 librerías de RNA-seq provenientes de genotipos de *L. luteus* resistentes (C98) y susceptibles (C195) a la enfermedad, sometidos previamente a la infección de *C. lupini*. Un total de 109,443 transcritos (41,646 genes) fueron ensamblados, de los cuales 6,737 (2,785 genes) correspondieron a lncRNAs. Los análisis de expresión diferencial reportaron un mayor número de lncRNAs diferencialmente expresados (DE) en el genotipo C98, destacándose 20 lncRNAs DE presentes en todas las horas post-infección. De ellos, *lncRNA25730* y *lncRNA24719*, fueron lncRNAs destacados debido a su co-expresión con genes codificantes asociados a respuesta inmune. En particular, el *lncRNA25730* co-expresó con proteínas LRR-RKs y proteasas subtilisinas, comprometiendo vías de defensa inmune del tipo MTI y ETI. Además, presentó una diferencia de expresión considerable entre genotipos, por lo que este gen podría conformar un nuevo marcador molecular de resistencia en hipocótilos de C98. Este estudio es uno de los primeros avances en el entendimiento de la regulación de la resistencia a la antracnosis en *L. luteus* desde la perspectiva de lncRNAs.

ABSTRACT

Lupinus luteus has proven its highly valuable nutritional quality and ecosystemic benefits, being considered a sustainable alternative for diversifying vegetal protein sources facing actual agriculture and climate change challenges. Nonetheless, their crops are mainly threatened due to anthracnose infections caused by the fungi *Colletotrichum lupini* which is controlled mainly by pesticides. Previously, it had been reported that long non-coding RNA (lncRNA) are involved in resistance response against pathogens. However, there is no published background on the role of lncRNAs in the immune response of *L. luteus* against anthracnose, which could contribute to the development of new sustainable molecular strategies for the management of anthracnose. In this study, lncRNAs involved in defense against anthracnose in *L. luteus* were identified by the re-analysis of 32 RNA-seq libraries from *L. luteus* resistant (C98) and susceptible (C195) genotypes to anthracnose, previously subjected to *C. lupini* infection at different times. A total of 109,443 transcripts (41,646 genes) were assembled, and 6,737 transcripts (2,785 genes) were identified as lncRNAs. Differential expression analysis reported a higher number of differentially expressed (DE) lncRNAs in C98; notably, 20 lncRNAs were DE in all times post-infection. Of them, *lncRNA25730* y *lncRNA24719*, were distinguished because of their co-expression with coding genes associated with immune response. In particular, *lncRNA25730* was co-expressed with LRR-RKs and subtilisin proteases. Besides, showed a greater difference in expression between both genotypes, and it was considered a new putative molecular marker of resistance to anthracnose in C98 hypocotyl. This study is the first approach in the understanding anthracnose resistance regulation in *L. luteus* from the lncRNAs perspective.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Principales impactos ambientales de la agricultura

La agricultura ha sido a través de la historia parte fundamental de la producción de alimentos que abastecen a la población, la que actualmente consta de 8 billones de personas y se estima que en el 2050 será de entre 9 a 10 billones de habitantes (Monteiro et al., 2021; Yazdinejad et al., 2021). Como consecuencia, se proyecta que la producción de alimentos en la agricultura deberá aumentar entre un 60 a un 100% (Monteiro et al., 2021; Yazdinejad et al., 2021). Este escenario junto al contexto de cambio climático, forman parte de los principales desafíos que enfrenta la agricultura moderna (Adedibu, 2023; van Dijk et al., 2021).

El cambio climático ha generado alteraciones en los patrones de temperaturas y precipitaciones, escasez hídrica, cambios en la calidad de los suelos, entre otras consecuencias que afectan directamente la producción agrícola (Adedibu, 2023). Si bien esta industria es una de las más vulnerables ante las consecuencias del cambio climático, también ha contribuido a este fenómeno aportando con cerca del 12% de los gases invernadero emitidos por actividades antrópicas, incluyendo dióxido de carbono (CO₂) que representa cerca del 50% de los gases emitidos por la agricultura, mientras que el otro 50% está representado por la emisión de metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) (Chataut et al., 2023; Linqvist et al., 2012; Shakoor et al., 2021). Actividades como la quema de combustible fósil, producción de fertilizantes y deforestación, han logrado incrementar la concentración de CO₂ en la atmósfera de 280 a 387 ppm (Shakoor et al., 2021). Por otro lado, las consecuencias de las emisiones de metano son aún más críticas, debido a que este gas posee un potencial de calentamiento global (Global warming potential, GWP) 34 veces mayor al del CO₂ (Weller et al., 2015). El metano es emitido por actividades agrícolas como cultivo de cereales inundados (Linqvist et al., 2012) y uso de fertilizantes en base a abono animal (Shakoor

et al., 2021). Por otra parte, se ha mencionado que el óxido nitroso presenta un potencial de calentamiento global de 200 veces más que el CO₂ y favorece la destrucción del ozono (O₃) (Charles et al., 2017), cuya principal fuente de emisión provienen del uso y producción de fertilizantes químicos y de origen animal (Shakoor et al., 2021). Se estima que los incrementos en la emisión de gases invernadero aumentarán en un 50% entre los años 2000 y 2030, contribuyendo al aumento de la temperatura global (Chataut et al., 2023).

Otros impactos ambientales de la industria agrícola se relacionan con degradación de los suelos, pérdida de biodiversidad, deforestación, contaminación de aguas y suelos, debido al uso y producción de fertilizantes, pesticidas y fungicidas (Adedibu, 2023). Uno de los contaminantes más destacados en lo que respecta a fertilizantes utilizados en agricultura es el nitrógeno (N), cuya manufactura contribuye en un 1.2% a los gases invernaderos emitidos por acciones humanas y su uso indiscriminado contribuye a la contaminación y eutrofización de aguas aledañas (Abd-Alla et al., 2023). Tanto la biomasa vegetal como la productividad de los cultivos y ecosistemas, están limitados por la disponibilidad de este nutriente, el cual compone un 78% del gas atmosférico y debe ser reducido para que este sea utilizado como nutriente para los organismos (Olivares et al., 2013). De manera natural, una de las estrategias biológicas que las plantas utilizan para obtener el N como nutriente, proviene de la interacción simbiótica con microorganismos fijadores de N (Geddes & Oresnik, 2016). Estos organismos poseen la capacidad de producir la enzima nitrogenasa y reducir el nitrógeno atmosférico (N₂) en amonio (NH₃), permitiendo a la planta utilizar el nutriente para su desarrollo (Geddes & Oresnik, 2016). Si bien, esta estrategia es ampliamente implementada en los vegetales, los niveles de fijación de N son particularmente destacables en leguminosas (Kebede, 2021; Raza et al., 2020; Shah et al., 2021).

Por lo general, los cultivos de legumbres no requieren de una adición considerable de N, y se ha estimado que logran reducir una cantidad aproximada de 80 Tg de N por año, de los 175 Tg totales fijados incluyendo la producción industrial (Raza et al., 2020; Shah et al., 2021). Por otra parte, la reducción biológica del N provoca un enriquecimiento natural de los suelos de cultivo en lo que respecta a nutrientes y diversidad de microorganismos (Abd-Alla et al., 2023; Kebede, 2021). Este aspecto es notable en leguminosas debido a la alta actividad de fijación de N, además, se ha observado que los remanentes de sus cultivos provocan un enriquecimiento de N natural en los suelos beneficiando la producción posterior, por lo que sus cultivos son considerados alternativas sustentables como tratamiento natural de los suelos disminuyendo el uso de fertilizantes químicos (Figura 1) (Abd-Alla et al., 2023; Espinoza et al., 2012; Kebede, 2021).

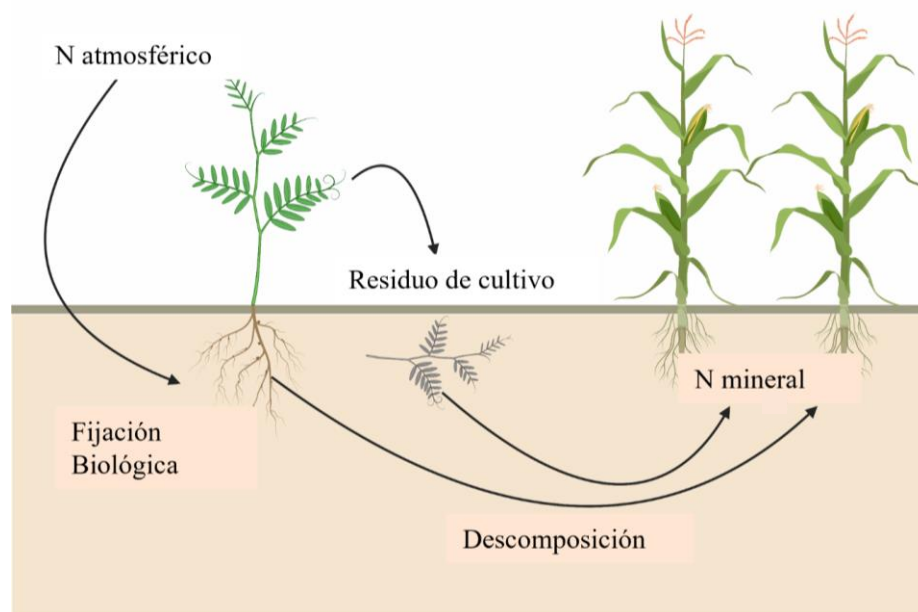


Figura 1. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas como fertilizante natural de cultivos. El nitrógeno atmosférico no biodisponible es fijado por bacterias simbiotas presentes en las raíces de las leguminosas. Los residuos del cultivo nutren de nitrógeno los suelos dejando el mineral biodisponible para los cultivos posteriores, lo que reduce el uso de fertilizantes químicos. Imagen modificada de: <https://extension.umn.edu/yard-and-garden-news/inoculating-garden-legumes>

Recientemente, el estudio y mejoramiento de cultivos de leguminosas ha sido de interés no solo por sus ventajas como estrategias sustentables para el tratamiento de suelos de cultivo, sino también por su aporte nutricional en lo que respecta a la obtención de proteína alimentaria, la cual representa ventajas nutricionales y menores costos ambientales en contraste con la producción de proteína animal (Espinosa-Marrón et al., 2022). Sin embargo, la sobreproducción de una sola especie de leguminosa también ha generado graves consecuencias ambientales (Suarez & Gwozdz, 2023). Actualmente uno de los monocultivos de leguminosas más explotados para la obtención de proteína vegetal es la soja *Glycine max*, lo que ha generado problemas de deforestación y pérdida de biodiversidad principalmente en el hemisferio sur, Brasil (Gollnow & Lakes, 2014; Hamza et al., 2024; Suarez & Gwozdz, 2023). El cultivo de una sola especie vegetal en grandes extensiones de terreno es una práctica que genera a largo plazo pérdida de biodiversidad, reduciendo la diversidad de hábitats para otras especies, incrementando la vulnerabilidad de los cultivos ante pestes, enfermedades y estresores ambientales, generando un deterioro en la variabilidad genética de la especie lo cual es fundamental para la adaptabilidad y resiliencia de la especie (Suarez & Gwozdz, 2023). Además, otras prácticas industriales como la extracción de aceite de soja, son altamente contaminantes debido al uso de solventes orgánicos (Burgos-Díaz et al., 2019; Hamza et al., 2024). Finalmente, cabe mencionar que gran parte de la soja cultivada proviene de organismos genéticamente modificados (OGM), cuyos impactos en el medio ambiente no están esclarecidos en su totalidad, por lo que su uso requiere de precaución (Noack et al., 2024). Esto ha provocado el cuestionamiento de su cultivo en gobiernos extranjeros y nacionales, siendo en Chile ilegal la producción para consumo nacional (Resolución N°1.523 del año 2001).

En síntesis, la creciente demanda alimentaria, los efectos del cambio climático y la necesidad de reducir los impactos ambientales de la industria agrícola, han generado un interés por el

mejoramiento y la diversificación en la obtención de alimentos de alto valor nutricional (Adedibu, 2023; van Dijk et al., 2021). Ante esto los cultivos de leguminosas han sido observados como alternativas sustentables para tratamiento de suelos y la búsqueda de nuevas fuentes de proteína vegetal es clave para la diversificación de las prácticas de monocultivos de soja (Abd-Alla et al., 2023; Adedibu, 2023; Shah et al., 2021).

Particularmente en Chile las fuentes de proteína vegetal son reducidas, y las condiciones climáticas no permiten el desarrollo de cultivos de soja *G. max*, siendo su importación cada vez más costosa (Mera et al., 2016). Esto ha generado un fomento en la producción local de proteína vegetal de orígenes alternativos a la soja, y es aquí, en donde el género de leguminosas *Lupinus* ha despertado un interés para el escalamiento de sus cultivos, ya que históricamente se han cultivado de manera local y presentan diversas ventajas en lo que respecta a beneficios medio ambientales y nutricionales (Baer, 1989; Mera et al., 2016.; Musco et al., 2017; van de Noort, 2024).

1.2 *Lupinus luteus* como una fuente de proteína vegetal alternativa y sustentable

El género *Lupinus* cuenta con alrededor de 300 especies encontradas principalmente en el Mediterráneo, norte y este de África, América del Norte y Sur (Ishaq et al., 2022). Históricamente, los lupinos han sido cultivados de manera local principalmente para forrajeo y suplemento de consumo humano, en donde la continua selección de plantas para cultivo ha reducido la variabilidad genética dentro de las poblaciones (Berger et al., 2012; Osorio, Udall, et al., 2018; Parra-González et al., 2012; van de Noort, 2024). Las especies de lupino mayormente cultivadas en el mundo son: *L. mutabilis*, *L. Albus* o lupino blanco, *L. Angustifolius* o lupino azul, y *L. luteus* o lupino amarillo (Ishaq et al., 2022; van de Noort, 2024). Siendo en Chile cultivadas en la IX región las especies de *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, cuya producción se ha destinado mayormente a alimentación de animales de cultivo en la industria salmonera y ganadera (Mera et

al., 2016; Mera & Galdames, 2007). Estas plantas han presentado una mejor adaptabilidad a estresores ambientales, ambientes fríos y suelos pobres en nutrientes, lo que es ventajoso para el desarrollo de sus cultivos en el sur del país (Baer, 1989; Mera et al., 2016).

Algunos beneficios ambientales del cultivo de lupino tienen relación con su uso histórico como tratamiento para la mejora de la calidad de los suelos de cultivo, habiendo ya en 1989 antecedentes de campesinos quechua en Perú que se referían a su cultivo como: “Siembro lupino cuando el suelo está cansado” (Baer, 1989). Los cultivos de lupino son capaces de enriquecer los suelos de manera natural con nutrientes como N y fósforo (Espinoza et al., 2012; Mera et al., 2016), generando en los suelos una relación de Carbono/Nitrógeno (C/N) particularmente baja (30-40) a diferencia de los suelos cultivados con cereales (80-90) (Mera et al., 2016). Esto es importante ya que una mayor cantidad de N en los suelos fomenta la actividad microbiana, acelera la descomposición de materia orgánica y mineralización, aumentando la disponibilidad de nutrientes en los suelos, lo que también incrementa la biomasa microbiana mejorando la estructura del sedimento (Mera et al., 2016). Otro beneficio ecosistémico del cultivo de lupino es su desarrollo radicular, en donde su raíz primaria al ser gruesa y descomponerse, crea espacios en la tierra que mejoran la infiltración de agua y la penetración de las raíces de otros vegetales (Baer, 1989; Mera et al., 2016). Estas razones han hecho del cultivo de lupino una alternativa óptima para su uso como mejorador de suelos de manera orgánica y sustentable, mejorando incluso la rentabilidad de cultivos posteriores (Baer, 1989; Espinoza et al., 2012; Mera et al., 2016).

Dentro de los lupinos cultivados en Chile, se destaca particularmente *L. luteus* (Figura 2) por su elevado contenido de proteína y su mejor adaptabilidad a suelos ácidos y húmedos, similar al clima de la Araucanía (Baer, 1989; Mera et al., 2016; Burgos-Díaz et al., 2019).



Figura 2. *Lupinus luteus*. Fotografías tomadas en cultivos experimentales de *Lupinus luteus* en el Centro de Genómica Nutricional Agrícola (CGNA) en la Araucanía, Chile.

Con respecto a la calidad nutricional, la concentración de proteína de *L. luteus* fluctúa entre los 75 a 95 g por cada 100 g de semilla (Burgos-Díaz et al., 2019), en contraste *L. albus* no supera los 40 g de proteína x 100 g de semilla, lo que es similar al contenido proteico de leguminosas de mayor consumo como el poroto (*Phaseolous vulgaris*), el garbanzo (*Cicer erietinum*) e incluso la soja *G. max* (Jha et al., 2022). Otros beneficios alimentarios corresponden al contenido de ácidos grasos polinsaturados de *L. luteus*, el cual es de 569 g por kilo de semilla, mayor que en *L. angustifolius* con 400 g x kg de semilla y *L. albus* con 287 g x kg de semilla (Musco et al., 2017). Por otro lado, la concentración de alcaloides en *L. luteus* es considerablemente baja, con un 1,07 mg cada 100 g de semilla, lo que refleja su baja toxicidad (Musco et al., 2017). Desde el punto de vista medicinal, los lupinos se han relacionado con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Belski, 2012; Caramona et al., 2024). Siendo particularmente, *Lupinus luteus* y *Lupinus mutabilis*, empleados como tratamiento para la reducción de glucosa en

la sangre, riesgos de cáncer de colon, y mejora en el funcionamiento intestinal y cardiovascular (Belski, 2012).

A pesar de las ventajas alimentarias, medicinales y ambientales que presenta el cultivo de *L. luteus*, su producción se encuentra principalmente limitada por su vulnerabilidad ante la enfermedad de la antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum lupini* (Mera et al., 2016.; Samad et al., 2023). Las pérdidas generadas por esta enfermedad son muy variables, pero en parcelas experimentales de *L. albus* se han registrado pérdidas del 60% de la cosecha a causa de la antracnosis (Mera et al., 2016).

Actualmente uno de los centros de investigación más destacados en el estudio de *L. luteus* para el fomento de su producción en el país y el enfrentamiento a la antracnosis, es el Centro de Genómica Nutricional Agrícola (CGNA) en la Araucanía. Los primeros estudios moleculares en *L. luteus* publicados han sido desarrollados con énfasis en la búsqueda de marcadores moleculares para el mejoramiento genético de las especies mediante selección asistida de plantas para cultivo, sin la intervención directa del genoma (Lichtin et al., 2020; Martínez-Hernández et al., 2024; Ogura et al., 2014; Osorio, Amiard, et al., 2018; Osorio et al., 2019; Osorio, Udall, et al., 2018; Parra-González et al., 2012). Recientemente Lichtin et al., (2020) lograron identificar un genotipo de *L. luteus* resistente a la antracnosis llamado C98 (Figura 3), a través del marcador molecular *Llr1* el cual es ortólogo al gen *Lanr1* presente exclusivamente en plantas de *L. angustifolius* resistentes a la antracnosis (Hane et al., 2017; Książkiewicz et al., 2022). La rápida identificación de genotipos de *L. luteus* resistentes a la antracnosis a través del marcador *Llr1*, ha permitido un mayor desarrollo de investigaciones asociadas al fenómeno de resistencia en estas plantas (Figura 3) (Armijo-Godoy et al., 2024). Este hito abrió una nueva ventana de conocimiento para la investigación y desarrollo de estrategias de mitigación de la antracnosis, mediante herramientas

moleculares o biotecnológicas, que son consideradas altamente selectivas y sustentables para ser utilizadas en el manejo de problemáticas asociadas a cultivos agrícolas (Bigini et al., 2021; Tibebe & Nuh, 2019).



Figura 3. Hipocótilos de *Lupinus luteus* infectados por *Colletotrichum lupini* en genotipo resistente (C98) y susceptible (C195). Síntomas de antracnosis (flechas) han sido visibles a las 84 horas post-infección en C195, estando ausentes en genotipo C98. Fotografía de Armijo-Godoy et al., (2024).

1.3 La antracnosis como amenaza para el desarrollo de cultivos de *L. luteus*

El estrés biológico producido por patógenos es el principal factor limitante reconocido en la agricultura, siendo la antracnosis una de las principales enfermedades en cultivos de leguminosas (Kaur et al., 2023). Esta enfermedad es producida por hongos del género *Colletotrichum* afectando a un amplio espectro de plantas, sin embargo, algunas especies son patógenas específicamente de leguminosas, como los hongos; *C. acutatum*, *C. orbiculare*, *C. truncatum*, *C. destructivum*, *C. orchidearum*, *C. dematium*, *C. spae-thianum*, *C. magnum*, *C. gloeosporioides*, *C. chloro-phyti*, y *C. coccodes*, siendo *C. lupini* un patógeno específico de leguminosas del género *Lupinus* (A. K. Pandey et al., 2023).

Colletotrichum lupini es el principal patógeno de plantas de lupino en el mundo (Guilengue et al., 2022; Mera et al., 2016; Samad et al., 2023). En Chile, cultivos comerciales y experimentales de *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus* han sido afectados por la enfermedad, la que ha causado pérdidas cercanas al 60% de la cosecha e incluso pérdidas totales, mientras que otros lupinos silvestres como *L. arboreus*, también han sido afectados por la enfermedad (Mera et al., 2016).

El comportamiento infectivo del patógeno es hemibiotrófico, contemplando una primera fase de infección biotrófica y una última fase necrotrófica (Guilengue et al., 2022; Siddiqui & Ali, 2014) (Figura 4). El proceso de infección comienza en cuanto las esporas detectan señales químicas provenientes de exudados de la planta, las cuales pueden ser ceras o incluso superficies sólidas hidrofóbicas (Barhoom & Sharon, 2004; Neshet et al., 2008). Ha sido descrito que dentro de las primeras 24 horas posteriores al contacto (patógeno-planta), sucede la formación de un apresorio melanizado especializado en la penetración de la pared celular de la planta hospedera (Guilengue et al., 2022; Siddiqui & Ali, 2014). Una vez el hongo logra romper la pared celular e ingresar a la planta, coloniza el espacio interno y crece mientras se alimenta de metabolitos de la planta sin

provocar muerte celular (Guilengue et al., 2022; Siddiqui & Ali, 2014). La siguiente fase de la enfermedad es la necrotrófica, si bien no se sabe exactamente que gatilla el cambio de fase, hay antecedentes que lo relacionan a las condiciones climáticas y maduración de la planta (De Silva et al., 2017). En ensayos experimentales con hongos *C. lupini* en plantas de *L. mutabilis* con un 1 mes de edad, el cambio de fase ha sido observado principalmente después de 2 o 3 días post-infección (Guilengue et al., 2022), similar a lo observado en hipocótilos susceptibles de *L. luteus* (Armijo-Godoy et al., 2024), y en frutos de nuez infectados por *C. gloeosporioides* (Feng et al., 2021). En esta fase avanzada de la enfermedad, el hongo provoca muerte celular y los síntomas son visibles como heridas de color amarillo-marrón en la superficie de los tejidos infectados (Figura 3 y 4) (Armijo-Godoy et al., 2024; De Silva et al., 2017; Guilengue et al., 2022; Lichtin et al., 2020; Siddiqui & Ali, 2014).

La infección puede ocurrir en todos los estados del ciclo de vida de la planta, en semillas es capaz de reducir la tasa de germinación (Pandey et al., 2023). En cotiledones infectados, logra retrasar el crecimiento observándose lesiones de tonalidades oscuras, mientras que en hipocótilos infectados las heridas han sido descritas como lesiones hundidas (Figura 3) (A. K. Pandey et al., 2023).

Los tratamientos ante esta enfermedad comprenden principalmente fungicidas foliares químicos y tratamientos de esterilidad de semillas (Samad et al., 2023). Sin embargo, se ha observado que la respuesta del patógeno a un determinado fungicida es particular a cada especie de *Colletotrichum*, por lo que además de ser químicos contaminantes, no son eficaces ante el tratamiento de la enfermedad (Dias et al., 2016).

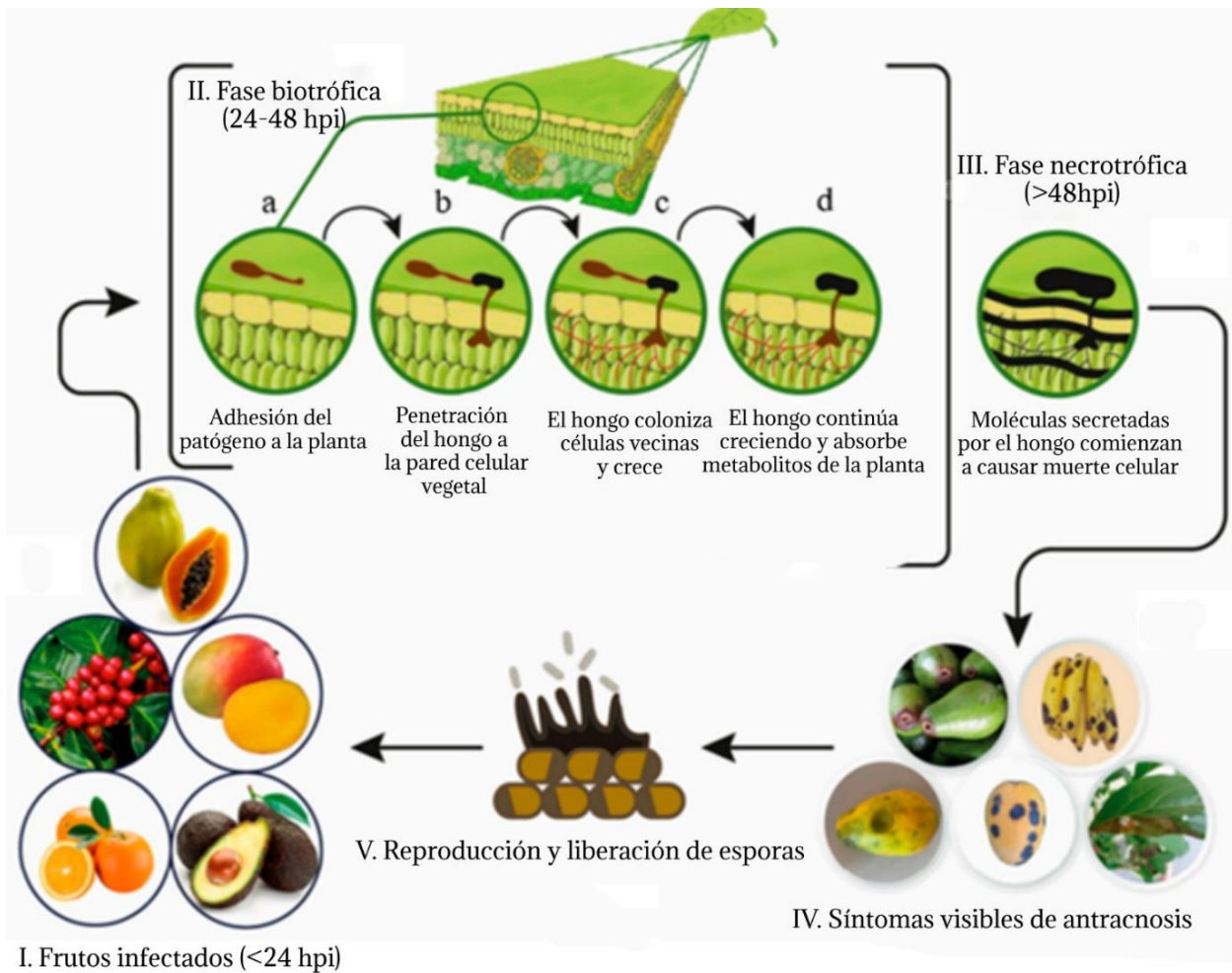


Figura 4. Ciclo de vida de *Colletotrichum lupini*. I. Frutos infectados por *C. lupini*. II. Fase biotrófica. III. Fase necrotrófica, etapa avanzada de la enfermedad. IV. Frutos y hojas con síntomas visibles de antracnosis. V. Reproducción, la que puede ocurrir de manera sexual o asexual en hongos *Colletotrichum*. Tiempos (horas post-infección, hpi) estimados de acuerdo a estudios en lupinos de 84 horas a 1 mes de vida. Ilustración modificada de Siddiqui & Ali (2014).

Algunos genotipos de lupinos han generado resistencia a la antracnosis, lo que ha sido asistido mediante el desarrollo de marcadores y la cruce selectiva de progenitores (Anilkumar et al., 2022; Deng et al., 2020). No obstante, una problemática ante la selección y búsqueda de marcadores moleculares asociados a resistencia en *L. luteus*, es la reducida variabilidad genética dentro de las poblaciones debido a la histórica selección de plantas para su cultivo (Berger et al., 2012). Ello incita a la investigación de marcadores moleculares alternativos que presenten una mayor variabilidad como; microsatélites, marcadores polimórficos de inserción/delección (InDel), genes no codificantes, entre otros (Kumar, 2023; Osorio, Udall, et al., 2018; Parra-González et al., 2012). En ausencia de un control efectivo y sustentable ante la antracnosis, comprender los mecanismos de resistencia en las plantas de lupino es una de las soluciones más consideradas (Samad et al., 2023), lo cual es clave para el desarrollo de estrategias sustentables y efectivas para el tratamiento de la enfermedad, siendo actualmente incipiente la investigación a nivel molecular de la resistencia a la antracnosis en *L. luteus* (Armijo-Godoy et al., 2024; Martinez-Hernandez et al., 2024).

1.4 Mecanismos de resistencia ante patógenos en plantas

En general, se han descrito dos vías principales de respuesta inmune en plantas; 1. Mecanismo de inmunidad innata activado por patrones moleculares asociados a microbios (MTI o PTI), y 2. Mecanismo de inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Bentham et al., 2020; Muthamilarasan & Prasad, 2013).

Primero, el mecanismo MTI o PTI involucra el reconocimiento de moléculas elicitoras a través de receptores extracelulares superficiales de las células llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Bigeard et al., 2015; Muthamilarasan & Prasad, 2013). Los elicitores son moléculas presentes en patógenos que en su mayoría corresponden a componentes estructurales de la pared celular del patógeno, como glucano, quitina, flagelina y lipopolisacáridos (LPS) (Malik et al., 2020). Algunos elicitores son clasificados como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs), patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Malik et al., 2020). Los receptores celulares de elicitores (PPRs) actúan en esta vía MTI. Estos incluyen proteínas transmembrana de la familia *receptor-like kinases* (RLK) y *receptor-like proteins* (RLP) (Bentham et al., 2020; Muthamilarasan & Prasad, 2013; Zipfel, 2008). Los receptores RLK están compuestos por un dominio de unión a ligando extra celular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de serina/treonina quinasa. En contraste, los RLP, carecen de dominio intracelular y requieren de otras moléculas adaptadoras para conducir la señal al espacio intracelular (Muthamilarasan & Prasad, 2013; Zipfel, 2008). En específico, proteínas RLKs, del tipo lisina (LysM-RKs) han sido reconocidas por ser claves para el reconocimiento de quitina ante patógenos fúngicos (Kaku et al., 2006). Una vez reconocido el elicitor, este induce un cambio conformacional en receptores PRRs resultando en la fosforilación de dominios quinasa, que una vez activados

desencadenan cascadas de respuesta inmune ante la infección (Malik et al., 2020; Zipfel, 2008). La primera respuesta de defensa y resistencia derivada de la activación de PRRs vía elicitors es la alcalinización del medio, mediante la acumulación de iones de hidrógeno, potasio, cloro y calcio (Bigeard et al., 2015; Malik et al., 2020). Además, se ha observado que la elevación en la concentración de iones de calcio produce el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNIs) que generan un ambiente tóxico para el patógeno, pueden inducir un aumento de ácido salicílico (SA) y el cierre de estomas, que son los principales canales de ingreso de bacterias patógenas (Marcec et al., 2019; Nomura et al., 2008). La producción de hormonas tipo ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) se ha descrito como indispensable para la generación de respuestas inmunes y resistencia tanto de la vía MTI, como ETI (Aerts et al., 2021; Andersen et al., 2018). Además, se ha descrito que la producción de JA/ET inhibe o regula negativamente las vías activadas por SA (Aerts et al., 2021). Respuestas inmunes mediadas por JA en co-regulación con ET, son activadas principalmente por la infección de patógenos necrotróficos, mientras que aquellas estimuladas por la producción de SA, son más enriquecidas ante patógenos biotróficos (Aerts et al., 2021; Muthamilarasan & Prasad, 2013). Considerando que *C. lupini* es un patógeno del tipo hemibiotrófico, ambas vías hormonales podrían estar implicadas en la defensa a la antracnosis.

El segundo mecanismo de defensa ante patógenos en plantas es el activado por efectores (ETI) (Muthamilarasan & Prasad, 2013). Activado mediante el reconocimiento intracelular de moléculas efectoras secretadas por patógenos, que en este caso son proteínas específicas producidas por el patógeno que logran insertar al interior de la célula (Lovelace et al., 2023). Estas proteínas efectoras pueden actuar como factores de transcripción que activan la transcripción en células infectadas, pueden afectar el empaquetamiento de cromosomas de la célula hospedera y promover

la liberación de nutrientes beneficiosos para el patógeno (Lovelace et al., 2023). Estos efectores son reconocidos de manera intracelular por genes de resistencia R, en donde la mayoría de proteínas R pertenecen a la familia *intracellular nucleotide-binding leucine-rich repeat* (NB-LRR) (Muthamilarasan & Prasad, 2013). Estas contienen un dominio LRR (*leucine-rich repeat*) en el extremo C-terminal, un dominio efector N-terminal y un dominio central NB (*nucleotide-binding*) regulador de la actividad de la proteína (Eitas & Dangl, 2010). El contacto entre los efectores y las proteínas NB-LRR, produce cambios conformacionales en la proteína que activa el dominio N-terminal para interactuar con otras moléculas asociadas a la vía ETI (Eitas & Dangl, 2010). Estas proteínas pueden inducir factores de transcripción como WRKY en *Arabidopsis*, que logran unirse a sitios promotores de genes asociados a respuesta inmune (Pandey & Somssich, 2009). La cascada de señalización activada por ETI, es similar a MTI, incluyendo proteínas *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), que inducen la transcripción de genes de resistencia, los que a su vez conducen a la producción de hormonas de SA, JA, ET, pudiendo promover el endurecimiento de la pared celular, la síntesis de compuestos antimicrobianos, entre otras respuestas (Aerts et al., 2021; Andersen et al., 2018; Bentham et al., 2020; Muthamilarasan & Prasad, 2013). Recientemente, proteínas tipo NB-LRR han sido descritas en ejemplares de *L. luteus* C98 resistentes a la antracnosis sometidos a infección por *C. lupini* (Armijo-Godoy et al., 2024).

Otras respuestas que pueden inducir las plantas pueden resultar en una muerte celular programada llamada respuesta de hipersensibilidad (HR). Esta respuesta puede ser inducida por SA mediante la degradación de supresores de muerte celular tipo *nonexpressor of pathogenesis related genes 1* (NPR1), lo que conduce a un tipo de muerte celular programada a modo de controlar la propagación de la enfermedad (Fu et al., 2012).

Adicionalmente a las vías MTI y ETI, existe un sistema de resistencia adquirido (SAR), que permite que la señal de una célula infectada se disperse a tejidos de la planta no infectados, generando una hipersensibilidad a la presencia del patógeno a largo plazo y permitiendo una activación más rápida de la respuesta inmune en una próxima infección (Mareri et al., 2022; Muthamilarasan & Prasad, 2013; Tian et al., 2024). Este sistema requiere de la acumulación de SA que genera un mecanismo de transportarse de señal célula a célula que permite la temprana activación de la respuesta inmune en toda la planta ante la amenaza del patógeno (Park et al., 2007). Este transporte de la señal entre varios tejidos de la planta puede ocurrir a través de plasmodesmos o mediante el floema (Tian et al., 2024). Otros mecanismos de defensa inmune en plantas están mediados por ARN interferente (ARNi), que pueden degradar secuencias de ARN ingresadas por patógenos virales (Muhammad et al., 2019).

Estos antecedentes resumen los principales actores de la respuesta inmune en plantas y la modulación de mecanismos de resistencia, contemplando desde la detección del patógeno (Vía MTI o ETI), la transducción de señal (Vía iones, proteínas, fitohormonas JA, SA, entre otros componentes), hasta la generación final de la respuesta (e.g producción de antimicrobianos, degradación de efectores, engrosamiento de la pared celular, entre otras respuestas) (Figura 5). Cabe mencionar que algunos genes que otorgan resistencia se encuentran presentes en genotipos susceptibles a la enfermedad, sin embargo, sólo en genotipos resistentes se ha observado una sobreexpresión de éstos ante una infección (Armijo-Godoy et al., 2024; Chakraborty et al., 2019; Ksiazkiewicz et al., 2021; Z. Li et al., 2024). Esta inducción en la expresión, puede estar mediada por factores de transcripción, fitohormonas, entre otros (Andersen et al., 2018). Sin embargo, diversos estudios vinculan la participación de ARNs largos no codificantes en la regulación de

genes de resistencia ante patógenos en plantas (Gareev et al., 2023; Zhang et al., 2022 a, b; Zhao et al., 2024; Zhou et al., 2023).

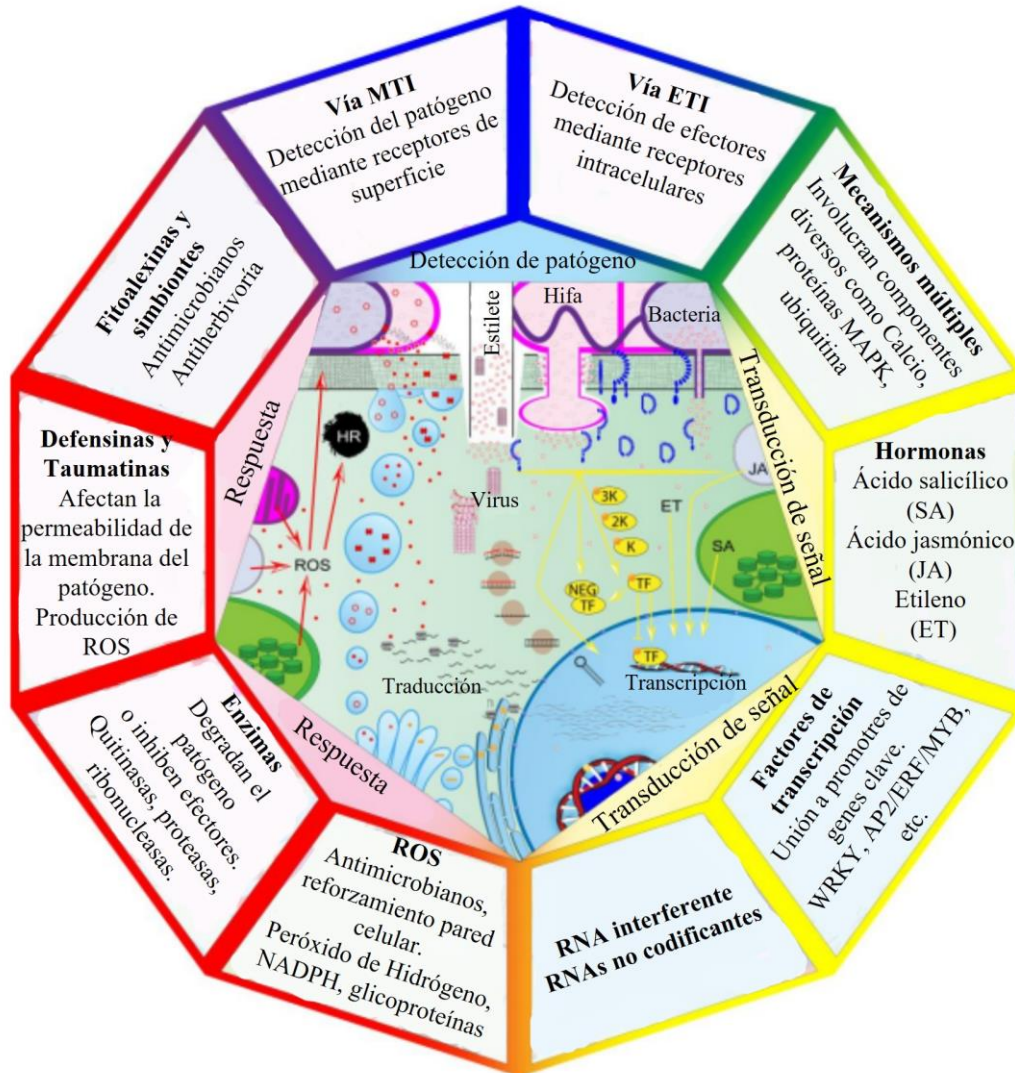


Figura 5. Mecanismos de defensa ante patógenos en plantas. El comienzo del diagrama tiene lugar en la detección del patógeno (en azul), se ilustran Hifa, bacterias y virus. Las vías principales de inmunidad son vía MTI o ETI por las que se detecta el patógeno. Seguido a la detección, la transducción de la señal (en amarillo) puede ser mediada por múltiples moléculas como Hormonas, Factores de transcripción, etc. Finalmente, las respuestas de defensa se detallan en rojo. Abreviaciones: AP2/ERF: *APETALA2/ethylene responsive factor*, HR: respuesta de hipersensibilidad, K: quininas, MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*, MYB: *myeloblastosis*, NEG: regulador negativo, ROS: Especies reactivas de oxígeno, TF: Factor de transcripción, WRKY: *WRKYGQK transcription factor*. Ilustración modificada de Andersen et al., (2018).

1.5 ARNs largos no codificantes (lncRNAs) y sus implicancias ante la resistencia a patógenos en plantas

El ácido ribonucleico (ARN) es una molécula fundamental para la biología celular, la cual ha sido tradicionalmente reconocida por su papel en la síntesis de proteínas a través de la transcripción de ARN mensajero codificante (ARNm o mRNA) (Tomita et al., 2021). Sin embargo, el ARNm representa sólo el 2% del ARN total, mientras que el ARN restante no es traducido a proteínas y se denomina ARN no codificante (ARNnc) (Mattick et al., 2023). Los ARNnc son un grupo diverso de transcritos que por mucho tiempo no fueron estudiados hasta el avance de las nuevas tecnologías de secuenciación (Kung et al., 2013).

Los ARNnc pueden ser clasificados en dos grandes categorías: constitutivos y reguladores (Chao et al., 2022). Los constitutivos son abundantes y se expresan de manera ubicua en todos los tipos celulares (Fu, 2014). Entre ellos se encuentran; ARN pequeño nucleolar (snoRNA) (60-400 nucleótidos (nt)), ARN de transferencia (tRNA) (76-90 nt) y ARN ribosomal (rRNA) (~5 kb), implicados en modificaciones de ARNs (snoRNA) y síntesis de proteínas (tRNA y rRNA) (Figura 6) (Chao et al., 2022; Fu, 2014). En contraste, los ARNs reguladores, están asociados directamente a la regulación de la expresión génica de genes blanco o *targets*, cuyos niveles de expresión no son ubicuos en el organismo y dependen del tejido y la condición en la que se encuentre la célula (Chao et al., 2022). Entre ellos están los microARNs (miRNAs) (<30 nt), ARNs pequeños interferentes (siRNAs) (20-23 nt), Piwi RNAs (piRNA) (21-32 nt), y ARNs largos no codificantes (lncRNA) (>200nt), entre otros (Figura 6) (Ma et al., 2013; Mattick et al., 2023). Algunos ARNnc reguladores son específicos para animales no siendo descritos en plantas, como piRNAs (Ozata et al., 2019), ARN potenciador (eRNA) relacionado a transcripción (Hetzl et al., 2016), e YRNAs implicados en replicación de ADN (Guglas et al., 2020).

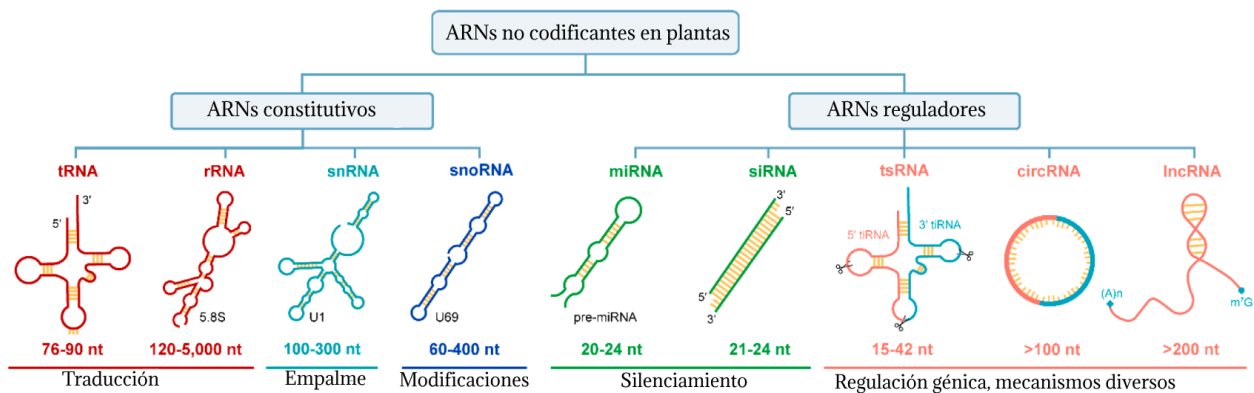


Figura 6. Principales ARNs no codificantes descritos en plantas. Abreviaciones: tRNA: ARN transferencia, rRNA: ARN ribosomal, snRNA: ARN pequeño nuclear, snoRNA: ARN pequeño nucleolar, miRNA: micro ARN, siRNA: ARN pequeño interferente, tsRNA: ARN pequeño derivado de tRNA, circRNA: ARN circular, lncRNA: ARN largo no codificante. Tamaños aproximados se indican en nucleótidos (nt). Ilustración modificada de Chao et al., (2022).

Los lncRNAs son hoy en día considerados uno de los grupos de ARNs no codificantes más amplios y heterogéneos (Chao et al., 2022; Chekanova, 2015). Éstos han sido reportados en una gran diversidad de organismos que incluyen animales, plantas, levaduras, procariontes y virus (L. Ma et al., 2013). Estas secuencias se han definido como ARNs de tamaños ≥ 200 nt que no codifican proteínas funcionales (Mattick et al., 2023). Sin embargo, se han reportado lncRNAs capaces de codificar pequeños péptidos (<100 nt) requeridos en ciertos procesos celulares (Matsumoto & Nakayama, 2018; Nelson et al., 2016).

Los lncRNAs han sido asociados a diversos procesos biológicos como diferenciación celular, conformación estructural de la cromatina y regulación génica, siendo incluso precursores de miRNAs (Mattick et al., 2023; Statello et al., 2021; Zhang et al., 2019). La regulación de genes *target* puede ser a niveles transcripcionales, post-transcripcionales (*splicing*) e incluso a nivel de traducción, pudiendo conformar complejos estructurales de lncRNA-proteína (Figura 7) (Mattick et al., 2023; Naseer et al., 2024; Wekesa et al., 2020). Estos mecanismos de regulación pueden o

no implicar una unión directa del lncRNA a su gen *target*. Una de las formas indirectas en las que lncRNAs regulan la expresión de genes *targets* es a través de un efecto “señuelo” que tendrían sobre miRNAs. Esto se explica debido a que los lncRNAs tienen en su estructura múltiples sitios de unión a miRNAs, por esta razón logran secuestrar secuencias de miRNAs impidiendo que éstos silencien a sus genes *target* (Figura 7, B) (Naseer et al., 2024).

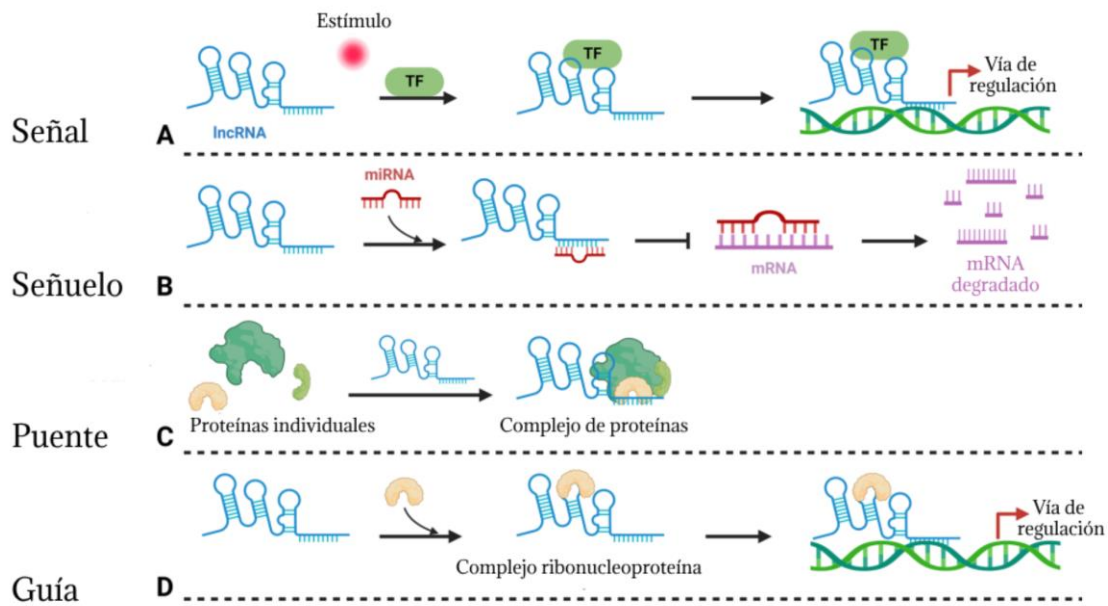


Figura 7. Mecanismos funcionales de lncRNAs. A. Señal: En respuesta a diversos estímulos, los lncRNAs pueden unirse a factores de transcripción de un gen *target*. B. Señuelo: La unión del miRNA al lncRNA impide la unión del miRNA a su mRNA *target*. C. Puente: lncRNAs actúan como puentes estructurales entre proteínas. D. Guía: lncRNAs pueden guiar proteínas a los sitios de regulación. Ilustración de Naseer et al., (2024).

Además, estos mecanismos de regulación pueden suceder entre lncRNAs y *targets* cercanos o lejanos en el genoma, siendo estas interacciones clasificadas como *cis* o *trans* respectivamente (Mattick et al., 2023). Algunos estudios consideran que la regulación es del tipo *cis* si el gen *target* se encuentra a no más de 100 kb de distancia, de lo contrario la interacción se clasifica como *trans* (Stam et al., 2002.; Zhao et al., 2019).

En plantas, los lncRNAs han sido asociados a una amplia gama de procesos biológicos como; reproducción, maduración de fruto, crecimiento, floración y pigmentación (Chao et al., 2022; Chekanova, 2015; Liu et al., 2015). Interesantemente, estudios previos han relacionado estas secuencias de lncRNAs a mecanismos de defensa, observado una sobreexpresión de genes de lncRNAs y genes codificantes relacionados a respuesta ante estresores abióticos (Aslam et al., 2022; Ding et al., 2019; Hidalgo et al., 2023) y bióticos (Samarfard et al., 2022; Zamora-Ballesteros et al., 2022; Zhang et al., 2022a; Zhou et al., 2023). Sin embargo, en modelos animales también se ha reportado que los niveles de expresión de lncRNAs se alteran ante enfermedades, por lo que se ha planteado que su estudio y detección podría ser de utilidad para el desarrollo de biomarcadores de patologías (López-Urrutia et al., 2019; Naseer et al., 2024). Estudios previos en plantas infectadas por patógenos, han reportado que los niveles de expresión de lncRNAs alcanzan niveles significativamente más altos en plantas resistentes al patógeno que en plantas susceptibles, co-expresando a su vez con genes de resistencia, lo que sugiere un rol activo en la regulación de la resistencia a patógenos en plantas (Fang et al., 2021; Feng et al., 2021; Zhang et al., 2022a). Además, en experimentos *knock-out* de lncRNAs co-expresados con genes de respuesta inmune, se ha descrito que líneas de plantas resistentes con lncRNAs eliminados presentan un decaimiento significativo en la expresión de genes de resistencia y una mayor susceptibilidad al patógeno, confirmando su rol esencial en la regulación de la respuesta inmune ante la infección (Feng et al., 2021; Zhang et al., 2022a). Cabe mencionar que las investigaciones de lncRNAs en plantas han sido principalmente desarrolladas en organismos de interés científico y comercial como: *Arabidopsis*, arroz, tomate, pepino, melón y trigo, siendo las leguminosas un ítem reciente de estudios en lncRNAs (Chand Jha et al., 2021; Huang et al., 2023).

En la última década los avances en tecnologías de secuenciación masiva han permitido conseguir una mayor profundidad y precisión de secuenciación, por lo que actualmente ha sido posible la identificación de un mayor número de secuencias de ncRNAs (Glazinska et al., 2020). A la fecha, han sido publicadas algunas bases de datos de lncRNAs en plantas como: AlncC (Singh et al., 2021), EVLncRNAs (Zhou et al., 2021), PLncDB (Jin et al., 2021), CANTATAdb (Szcześniak et al., 2019), NONCODEV (Zhao et al., 2021) y LuluDB de *Lupinus luteus* (Glazinska et al., 2020), lo que facilita la identificación de secuencias de lncRNAs en especies poco estudiadas.

1.6 Estudios de lncRNAs en plantas de lupino

En lupinos, la mayoría de los estudios se han enfocado en la relación de lncRNAs ante estresores ambientales (Aslam et al., 2022; Hidalgo et al., 2023). Reportándose que en *L. albus*, la deficiencia de fósforo provoca una expresión diferencial de 600 genes de lncRNAs (Aslam et al., 2022), mientras que en *L. mutabilis*, se han encontrado respuestas similares ante experimentos de estrés hídrico (Hidalgo et al., 2023). En relación con estudios de lncRNAs en *Lupinus* ante patógenos, los antecedentes son muy escasos. En plantas de *L. angustifolius* infectadas por el hongo *Diaporthe toxica*, se ha observado una rápida sobreexpresión de genes codificantes asociados al procesamiento de ncRNAs, lo que podría dar indicios de la participación de ARN no codificante en la respuesta inmune ante la infección (Książkiewicz et al., 2021). Hoy en día, la mayoría de los estudios de patogenicidad publicados en lupino se han enfocado principalmente en la observación de genes codificantes (Książkiewicz et al., 2021; Książkiewicz et al., 2022), de los cuales solo un estudio se ha realizado en lupino amarillo ante la antracnosis producida por *C. lupini* (Armijo-Godoy et al., 2024). Mientras que, en otros géneros de plantas, existen mayores antecedentes sobre la relación entre la expresión de lncRNAs y la antracnosis provocada por hongos *Colletotrichum*.

Por ejemplo, en el árbol del caucho *Hevea brasiliensis* se ha evaluado la respuesta en la expresión de lncRNAs ante la infección por *C. gloesporioides*, en donde se han identificado lncRNAs asociados a la respuesta a la infección, cuya función de defensa inmune estaría asociada a la interacción con miRNAs patógenos (Yin et al., 2019). En el nogal común *Juglans regia*, se logró validar la presencia de 5 lncRNAs sobreexpresados únicamente en líneas resistentes a la infección por *C. gloesporioides*, los cuales fueron incluso validados junto a sus posibles ARNm *targets*, generando un conjunto de lncRNAs asociados a la resistencia (Feng et al., 2021). Además R. Zhou et al., (2023), identificaron que el *lncRNA109897* de *J. regia* en conjunto con el gen *CCR4-TLPI*, participaban positivamente en la regulación de la resistencia ante *C. gloesporioides*. En el árbol frutal de la papaya *Carica papaya*, también hay antecedentes que validan la participación de lncRNAs en la resistencia a la antracnosis, en donde se han identificado 5.983 lncRNAs, de los cuales 73 fueron diferencialmente expresados en líneas resistentes al hongo (Yang et al., 2022). Por último, Bhatia et al. (2021) reconocen que a los lncRNAs como importantes nodos de regulación de respuesta inmune en plantas ante infecciones por hongos, y que el estudio de estas interacciones a una mayor profundidad tendría un impacto positivo en la implementación de nuevas estrategias en el mejoramiento de la resistencia a estos fitopatógenos.

Con respecto a *L. luteus*, su estudio a nivel molecular es incipiente. Últimamente se han logrado secuenciar el transcriptoma (Parra-González et al., 2012) y proteoma (Ogura et al., 2014) de diferentes tejidos, mientras que el genoma ha sido publicado recientemente (Martinez-Hernandez et al., 2024). En el 2020 se logró la identificación de un genotipo resistente de *L. luteus* (C98) a la antracnosis provocada por *C. lupini* (Lichtin et al., 2020), mismo año en que fue publicada la base de datos de secuencias de ARN de *L. luteus* denominada LuluDB donde se identificaron 31.718 secuencias putativas de lncRNAs en *L. luteus* que resultaron ser homólogas a secuencias

de lncRNAs de soja (Glazinska et al., 2020). Sin embargo, esta base de datos es descriptiva, no habiendo un análisis de las funciones biológicas asociadas a esos lncRNAs presentes.

Actualmente, no hay estudios publicados sobre la identificación de lncRNAs asociados a respuesta inmune en *L. luteus* ante la antracnosis, lo que podría mejorar el entendimiento actual a nivel molecular de la regulación de la respuesta a la antracnosis mediante mecanismos no codificantes, siendo posible que estos conformen un nuevo grupo de marcadores moleculares asociados a resistencia y control de la enfermedad. Esto aportaría al manejo de prácticas de selección de plantas para cultivo sin la modificación genética directa (como en OGMs), además promovería el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas sustentables y selectivas para el control de la antracnosis en lupino amarillo, que es una de la principal enfermedad que limita el desarrollo de sus cultivos (Pandey et al., 2023, Mera et al., 2016). Su contenido de proteína vegetal podría ser de utilidad para la diversificación de las fuentes de proteína (Boukid & Pasqualone, 2022; van de Noort, 2024) y también, para la implementación de metodologías sustentables de producción de acuerdo a la variedad de beneficios que presentan los lupinos para los suelos de cultivo disminuyendo el uso de fertilizantes químicos (Abd-Alla et al., 2023; Espinoza et al., 2012; Mera et al., 2016).

De acuerdo a antecedentes previos, los lncRNAs podrían estar asociados a la resistencia a la antracnosis en genotipos de *L. luteus* resistentes mediante la regulación de genes codificantes relacionados a respuesta inmune. Por esta razón, en este estudio se llevó a cabo la identificación de lncRNAs asociados a respuesta inmune a partir de bases de datos de RNA-seq de genotipos de *L. luteus* resistentes (C98) y susceptibles (C195) a la antracnosis sometidos previamente a la infección por *C. lupini* (Armijo-Godoy et al., 2024).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La interacción entre el hongo patógeno *Colletotrichum lupini* y la planta *Lupinus luteus*, promueve la expresión diferencial de ARNs largos no codificantes involucrados en la respuesta inmune de plantas resistentes a la infección.

Objetivo general:

Analizar patrones de expresión de ARNs largos no codificantes en genotipos de *L. luteus* resistentes y susceptibles a la infección por *C. lupini*, identificando su relación con la respuesta inmune de la planta.

Objetivo específico 1:

Contrastar la expresión de ARNs largos no codificantes en *L. luteus*, evaluando la respuesta a la infección por *C. lupini* en líneas resistentes y susceptibles a la antracnosis.

Objetivo específico 2:

Asignar la función de ARNs largos no codificantes diferencialmente expresados en genotipos de *L. luteus* resistentes infectados por *C. lupini* y su relación con mecanismos de respuesta inmune en plantas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de librerías de RNA-seq de genotipo de *L. luteus* resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis

Los datos de RNA-seq utilizados fueron obtenidos a partir de 32 librerías de secuencias de ARN (RNA-seq) anteriormente publicadas (Número de acceso: PRJNA1169352) (Armijo-Godoy et al., 2024). Las muestras fueron secuenciadas en plataforma NovaSeq 6000 (Illumina®) utilizando una configuración de corrida de 2x150 lecturas emparejadas (paired-end) en CD Genomics Inc. (NY, USA). En adelante, todos los análisis bioinformáticos (Figura 8), fueron realizados en servidores de CGNA del NLHPC (*National Laboratory of High Performance Computing, Chile*).

En breve, las 32 librerías de RNA-seq provienen de los estudios de Armijo-Godoy et al., (2024) quienes realizaron ensayos de infección en dos genotipos: *L. luteus* Core 98 (resistente a antracnosis) y Core 195 (susceptible a antracnosis), obtenidos desde la colección de germoplasma del Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola (CGNA, Temuco). El hongo *Colletotrichum lupini* fue aislado y caracterizado a partir de plantas infectadas desde cultivos de AluProt-CGNA (Core 195) cultivados en la estación experimental de CGNA en la localidad de Huichahue, Araucanía. La inoculación de *C. lupini* en ambos genotipos se realizó mediante suspensión de conidios en una herida de 2 mm de longitud en la superficie superior de hipocótilos. El tejido inoculado fue incubado en placas de Petri humedecidas y las muestras de hipocótilo se recolectaron a las 0 (control no inoculado), 24, 60 y 84 horas post infección (hpi), considerando cuatro réplicas por tratamiento que fueron almacenadas a -80°C para su posterior extracción de ARN y secuenciación.

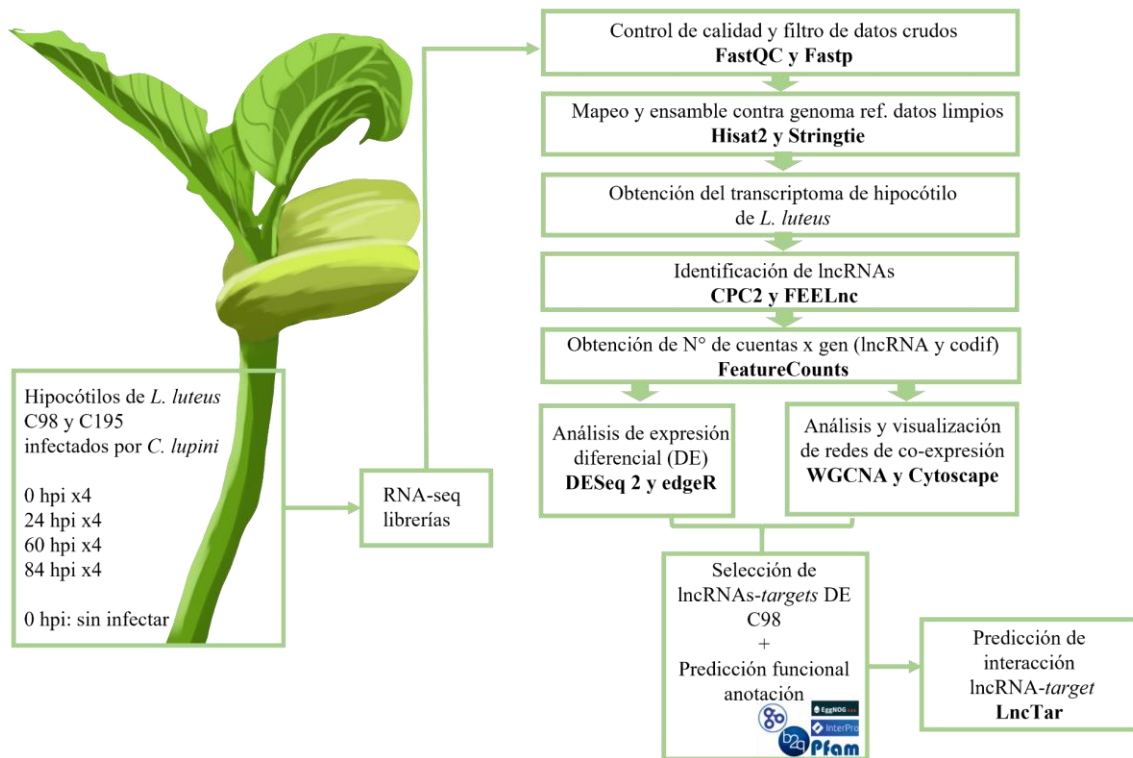


Figura 8. Flujo de trabajo para la predicción del lncRNAs y genes *target* a partir de librerías de RNA-seq de *Lupinus luteus*. Las librerías correspondieron a ARN de hypocótilos de *L. luteus* de genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis, sometidos previamente a la infección por *C. lupini* a diferentes horas post-infección (hpi).

3.2 Mapeo y ensamble a partir de librerías de RNA-seq de *L. luteus*

Análisis de datos fueron realizados generando scripts automatizados en Python v3.10. La calidad de secuencias crudas o *reads* fue evaluada mediante la implementación de reportes de calidad en FastQC v0.11.9 (Andrews S., 2010), y los datos fueron procesados mediante la herramienta Fastp v0.23.2 (Chen, 2023). Secuencias con valores de calidad de Phred ($Q > 30$), de tamaños menores a 50 nt de largo, y adaptadores detectados, fueron removidas según lo descrito en (Martinez-Hernandez et al., 2021). Posteriormente, los *reads* limpios fueron alineados contra el genoma de

referencia de *L. luteus* (número de acceso: GCA_964019355.1) (Martinez-Hernandez et al., 2024) utilizando Hisat2 v2.2.165 (Kim et al., 2019). Una vez mapeados contra el genoma de referencia, los *reads* fueron ensamblados usando Stringtie v2.2.2 (Pertea et al., 2015). Finalmente, la herramienta Gffcompare v0.11.2 (Pertea & Pertea, 2020), fue utilizada para comparar los transcritos ensamblados contra el archivo de anotaciones del genoma de referencia de *L. luteus*.

3.3 Identificación de ARNs largos no codificantes (lncRNAs) en genotipo de *L. luteus* resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis

La predicción de lncRNAs se realizó mediante el uso de CPC2 v1.0.1 (Kang et al., 2017) y FEELnc v3 (Wucher et al., 2017). El resultado consenso entre ambas predicciones fue considerado como lncRNAs, utilizando criterios de corte similares a los utilizados por Feng et al., (2021) y X. Zhao et al., (2019), los cuales fueron: Potencial de codificación <0.5 , tamaños ≥ 200 nt, porcentaje de cobertura de ORF $<50\%$ y presencia de 2 o más exones. En breve, CPC2 emplea metodologías propuestas por Fickett (Fickett, 1982) que consideran la frecuencia y posición de cada nucleótido para la diferenciación entre secuencias codificantes y no codificantes, junto con el porcentaje de cobertura de cada secuencia sobre los marcos de lectura abierto (ORF) de los transcritos codificantes (Kang et al., 2017). Por otro lado, FEELnc presenta 3 módulos de análisis de lncRNAs: 1) Filtro: considera número de exones descartando secuencias sin exones identificados y elimina secuencias menores a 200 nt, 2) Potencial de codificación: utiliza cálculos de multi K-meros para la distinción entre secuencias codificantes y no codificantes, y su algoritmo está basado en el uso de bosques aleatorios (*random forest*) para la toma de decisiones finales y, 3) Clasificación: El programa utiliza el genoma de referencia para localizar el gen anotado más adyacente al lncRNA, clasificándolo según su ubicación; intergénica (posición entre genes) o

génica (dentro de la secuencia de un gen), entre otras subclases (Wucher et al., 2017). Este último módulo fue utilizado para la clasificación de los lncRNAs predichos por ambas herramientas.

3.4 Análisis de expresión diferencial de lncRNAs entre genotipos de *L. luteus* resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis a diferentes horas post infección

Los datos de cuentas de cada gen fueron obtenidos a partir de la herramienta FeatureCounts v1.22.2 (Y. Liao et al., 2014). Los análisis de expresión diferencial se llevaron a cabo a partir de cuentas normalizadas en TMM (*Trimmed Mean of M-values*) (Robinson & Oshlack, 2010). Secuencias con niveles de expresión <1.5 TMM en todos los tratamientos, fueron descartadas. Para los análisis posteriores se utilizaron scripts en lenguaje R v2024.12.0+467 (RStudio, 2020). Los análisis de expresión diferencial fueron desarrollados mediante el uso de paquetes de R: edgeR v3.26.8 (Robinson et al., 2009) y DESeq2 v1.46.0 (Assefa et al., 2018). Los contrastes utilizados fueron diseñados de la siguiente manera para cada genotipo: 0hpi vs 24 hpi, 0 hpi vs 60 hpi y 0 hpi vs 84 hpi, siendo 0 hpi el control no infectado. Se consideraron como genes diferencialmente expresados aquellos que presentaron un *p-valor* ajustado o FDR <0.05 y un $\log_2\text{foldchange} >1$. Genes predichos como diferencialmente expresados por ambas herramientas fueron considerados como diferencialmente expresados (DE). La visualización de los contrastes se realizó en diagramas de Venn en <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>.

3.5 Análisis de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes de *L. luteus* en genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis a diferentes horas post-infección

El uso de análisis de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes se ha utilizado ampliamente para la predicción de sus genes codificantes *target* y su función regulatoria (Montenegro, 2022;

Piro & Marsico, 2019; Stuart et al., 2003). Los datos utilizados para los análisis de co-expresión correspondieron a genes y su número de cuentas en TMM anteriormente filtradas. Estos genes fueron agrupados en módulos según sus niveles de correlación de expresión utilizando el paquete de R WGCNA v.1.67 (Langfelder & Horvath, 2008). En breve, los datos en TMM fueron normalizados, para luego construir matrices de correlación de Pearson, en donde WGCNA calcula la relación entre los niveles de expresión de cada par de genes presentes en los datos, de acuerdo con lo descrito por Liao et al., (2011) y Montenegro (2022). A continuación, los datos se ajustan a un modelo de ley de poder, el cual representa el comportamiento de co-expresión por defecto de genes a nivel biológico, donde se ha descrito que un número limitado de genes o nodos concentran la gran mayoría de las conexiones (Montenegro, 2022). Esto, para determinar el valor de *Soft Threshold power* (sft), parámetro necesario para la construcción de matrices posteriores que consideran la fuerza de conexión entre genes (*weight*). Para el análisis de datos en este estudio fue definido un sft de 12 con un R^2 de 0.9, similar a lo utilizado por (Feng et al., 2021). Finalmente, WGCNA agrupó genes con niveles de correlación similares (significancia de correlación ≥ 0.8 , *p*-valor < 0.05), en diferentes módulos asociados a colores mediante el cálculo de valores TOM (*Topological Overlap Measure*) que estiman el grado o fuerza (*weight*) de conectividad entre pares de genes, obteniendo así un estimado de relación entre lncRNAs y genes codificantes.

La visualización de las redes de co-expresión se realizó en Cytoscape v3.10.2 (Shannon et al., 2003), mientras que la selección final de lncRNAs y genes codificantes co-expresados, se llevó a cabo considerando los siguientes criterios estadísticos por gen: Module Membership $|0.8|$ con un *p*-valor $< 1e-5$ y *Gene significance* > 0.5 con un *p*-valor < 0.01 (Feng et al., 2021; Montenegro, 2022). Los filtros de co-expresión aplicados por conexión entre genes, correspondieron a: una fuerza de conexión o *weight* > 0.02 (Feng et al., 2021; Montenegro, 2022) y un valor de cuantil de

0.75, por lo que sólo aquellas co-expresiones dentro del 25% de las conexiones más fuertes fueron visualizadas en redes de co-expresión para la selección de lncRNAs y genes codificantes *target*, junto con su predicción funcional.

3.6 Predicción funcional de lncRNAs y *targets* de *L. luteus* mediante redes de co-expresión

Redes de co-expresión construidas fueron sometidas a enriquecimiento funcional mediante términos Gene Ontology (GO: <https://geneontology.org/>) con la herramienta BiNGO (Maere et al., 2005) presente en Cytoscape v3.10.2 (Shannon et al., 2003). Además, la predicción funcional de genes codificantes co-expresados con lncRNAs, fue realizada mediante la búsqueda de genes anotados en el genoma de referencia de *L. luteus* a partir de bases de datos como InterProScan v5.62-94.0 (Quevillon et al., 2005), EggNOG v5.0.2 (Huerta-Cepas et al., 2019) y BLAST v2.14.1 (Altschul et al., 1990) y UniProt (SwissProt + TrEMBL) (UniProt Consortium, 2023) (<https://www.uniprot.org/>, descargado el 25 de septiembre, 2023), utilizando un *e-value* <1e-10. Seguidamente, se seleccionaron todos aquellos *targets* de lncRNAs anotados como genes codificantes asociados a respuesta inmune, suplementando la anotación con literatura actualizada.

3.7 Predicción de mecanismo de regulación entre lncRNAs y sus genes *targets*

La ubicación en el genoma de lncRNAs y sus *targets*, fue visualizada en IGV v2.18.2 (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Se consideró una regulación del tipo *cis* cuando el gen *target* se encontrase ubicado dentro de 100 kb adyacentes al lncRNA a partir del extremo 5' y 3' del gen, y se consideró una regulación *trans*, cuando la distancia fuese mayor a 100 kb (Stam et al., 2002.; Zhao et al., 2019). Por otro lado, la predicción de interacción directa entre las secuencias de lncRNAs y sus *targets*, se realizó mediante el programa LncTar v1.0 (J. Li et al., 2014), el cual

considera los niveles de energía normalizados (ndG) emitidos por las secuencias, considerando valores > -0.1 ndG como indicadores de interacción directa entre ambas secuencias.

4. RESULTADOS

4.1 Identificación de lncRNAs a partir de librerías de RNA-seq de *L. luteus* resistente (C98) y susceptible (C195) a antracnosis

Con el objetivo de identificar lncRNAs relacionados a respuesta inmune ante la antracnosis en genotipos de *L. luteus* C195 (susceptible) y C98 (resistente) a la infección, se analizaron datos provenientes de 32 librerías de RNA-seq de hipocótilos de *L. luteus* C195 y C98, infectados por *C. lupini* a diferentes hpi: (0 (no infectado, control), 24, 60 y 84 hpi) (Número de acceso: PRJNA1169352, Armijo-Godoy et al., 2024). Las secuencias crudas provenientes de las librerías de RNA-seq fueron filtradas, mediante la remoción de secuencias cortas o *reads* de baja calidad, adaptadores y duplicaciones. Finalmente se trabajó con *reads* limpios, que representaron cerca del 50% de las librerías crudas de RNA-seq (Tabla 1). Los *reads* limpios fueron utilizados para el mapeo y posterior ensamble del transcriptoma, los cuales se llevaron a cabo a partir del genoma de referencia de *L. luteus*, número de acceso: GCA_964019355.1 (Martinez-Hernandez et al., 2024). Se lograron ensamblar 109.443 transcritos provenientes de 41.646 genes, además al contrastar el transcriptoma ensamblado contra el genoma de referencia, se detectaron 5.198 nuevos genes putativos de *L. luteus* adicionales a los 36.895 genes codificantes anotados previamente en el genoma. De un total de 109.443 transcritos provenientes de 41.646 genes reconstruidos en el transcriptoma de hipocótilo, 6.737 transcritos (2.785 genes), correspondieron a lncRNAs identificados en conjunto por las herramientas CPC2 y FEELnc (Figura 9 A). En detalle, ambas

herramientas de predicción de lncRNAs lograron identificar 20.598 y 6.932 transcritos putativos de lncRNAs respectivamente.

Tabla 1. Librerías de RNA-seq utilizadas. Nomenclatura Librería: Genotipo, C195 (Susceptible) y C98 (Resistente), horas post infección (0, 24, 60 y 84 HPI), y el número de réplica (1 a 4). Se detalla el número de acceso de cada librería obtenida por el equipo de Armijo-Godoy et al., (2024), las cuales fueron filtradas para los análisis de este estudio. Los *reads* crudos correspondieron a las secuencias provenientes de las librerías de RNA-seq y los *reads* limpios a las secuencias filtradas.

Librería	Número de acceso	<i>Reads</i> crudos	<i>Reads</i> limpios
C195_0HPI_1	SRX26297109	30187838	15225413
C195_0HPI_2	SRX26297110	24067015	12729646
C195_0HPI_3	SRX26297111	38903599	18734439
C195_0HPI_4	SRX26297112	35157418	17696888
C195_24HPI_1	SRX26297105	26361681	13690634
C195_24HPI_2	SRX26297106	28583584	14128350
C195_24HPI_3	SRX26297117	30819711	15127217
C195_24HPI_4	SRX26297128	26539585	12306678
C195_60HPI_1	SRX26297131	23658659	12482655
C195_60HPI_2	SRX26297132	33371303	15831078
C195_60HPI_3	SRX26297133	25247577	12145714
C195_60HPI_4	SRX26297134	28445278	14427351
C195_84HPI_1	SRX26297135	35730132	17186308
C195_84HPI_2	SRX26297136	29084539	14559633
C195_84HPI_3	SRX26297107	33769099	15671332
C195_84HPI_4	SRX26297108	31168480	16354511
C98_0HPI_1	SRX26297126	34915058	17994781
C98_0HPI_2	SRX26297127	20120767	10634769
C98_0HPI_3	SRX26297129	28882710	15356137
C98_0HPI_4	SRX26297130	27386247	14657222
C98_24HPI_1	SRX26297113	24545771	12688665
C98_24HPI_2	SRX26297114	31298090	15024613
C98_24HPI_3	SRX26297115	26664351	13485988
C98_24HPI_4	SRX26297116	33463387	16370513
C98_60HPI_1	SRX26297118	33212655	16112654
C98_60HPI_2	SRX26297119	29321911	13546612
C98_60HPI_3	SRX26297120	31716604	14940347
C98_60HPI_4	SRX26297121	37312444	18343231
C98_84HPI_1	SRX26297122	32195082	16468687
C98_84HPI_2	SRX26297123	32185138	14726476
C98_84HPI_3	SRX26297124	31279228	14530123
C98_84HPI_4	SRX26297125	36742565	17793844

Con respecto a la clasificación de lncRNAs identificados, se utilizó el módulo FEELnc *classifier*, que considera genes cercanos al transcrito para realizar la clasificación, en donde lncRNAs resultaron ser anotados con más de un tipo de interacción respecto a genes vecinos diferentes. Por esta razón a partir de 6.737 transcritos, se detectaron 15.475 interacciones entre lncRNAs y genes vecinos. Cabe destacar que, de todas las interacciones observadas 13.241 correspondieron a lncRNAs intergénicos, lo que significa que la ubicación en el genoma de un lncRNA se encuentra preferentemente entre dos genes. Mientras que, sólo 2.234 transcritos fueron clasificados como génicos, lo que significa que su secuencia se encuentra ubicada completa o parcialmente dentro de un gen (Figura 9, B).

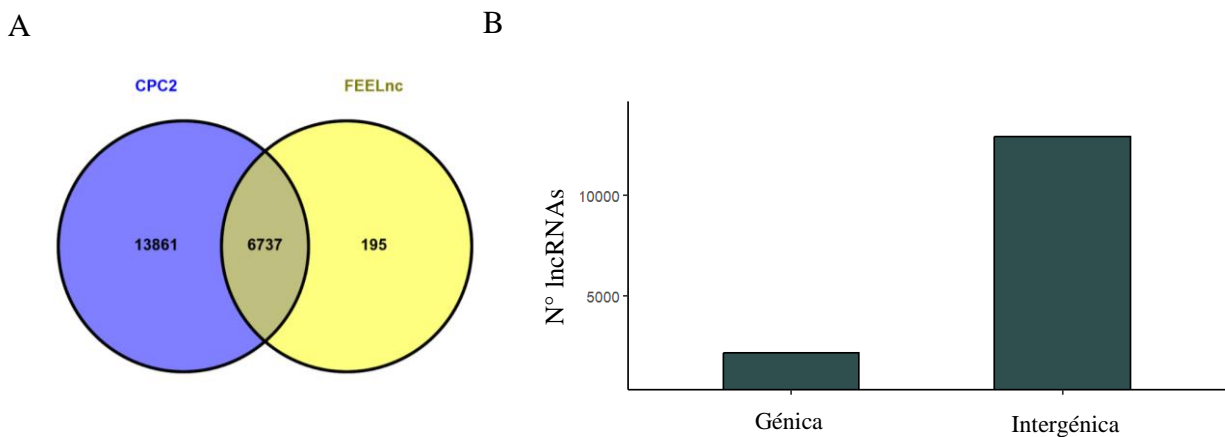


Figura 9. Identificación de lncRNAs de *Lupinus luteus* a partir de librerías de RNA-seq. A. Diagrama de Venn, presentando resultados de predicción de transcritos de lncRNAs en CPC2 y FEELnc, nótese los 6.737 transcritos consensos. B. Clasificación de transcritos de lncRNAs predichos según su ubicación en el genoma.

4.2 Análisis de expresión diferencial de lncRNAs entre genotipo de *L. luteus* resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis a diferentes horas post-infección

A partir del ensamble construido en este trabajo se obtuvieron los datos de cuentas de cada gen, las que fueron normalizadas a TMMs. Aquellos genes con <1.5 TMMs sumados en todos los tratamientos fueron considerados como genes no expresados y descartados para los análisis de expresión diferencial. De esta manera de 41.646 genes totales, 33.030 genes fueron considerados aptos para los análisis de expresión diferencial, los que incluyeron genes codificantes y lncRNAs. En general, las proporciones de lncRNAs y genes codificantes diferencialmente expresados (DE) se observaron similares en todas las horas post-infección independiente del genotipo (Figura 10). Cabe notar que a las 24 hpi el número de genes tanto de lncRNAs como genes codificantes fue mayor en el genotipo C195, lo que disminuyó considerablemente con el tiempo de infección, alcanzando diferencias considerables entre genotipos a las 60 hpi (Figura 10, Tabla 2).

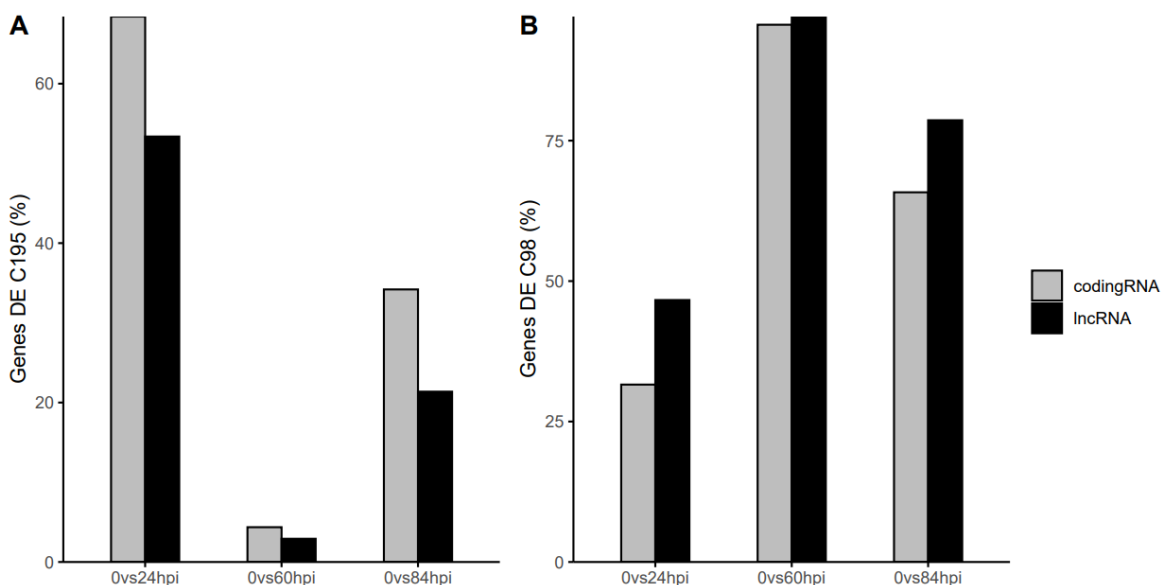


Figura 10. Proporción de lncRNAs y genes codificantes diferencialmente expresados por genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) de *Lupinus luteus* a diferentes horas post-infección por *Colletotrichum lupini*. En eje Y, porcentaje de genes lncRNAs y genes codificantes (codingRNA), diferencialmente expresados (DE). En eje X, contrastes analizados a diferentes horas post-infección (hpi).

Considerando lo anterior, a las 60 hpi el genotipo C98 presentó 100 genes de lncRNAs y 1.631 genes codificantes por sobre sólo 3 genes de lncRNAs y 78 genes codificantes DE en el genotipo C195, mientras que a las 84 hpi el genotipo C98 presentó 92 genes de lncRNAs DE y 1376 genes codificantes DE por sobre 25 lncRNAs y 715 genes codificantes DE en C195 (Tabla 2).

En general, el número de genes DE ante la infección fue mayor en el genotipo C98 con 182 genes de lncRNAs y 2.452 genes codificantes por sobre C195 con 110 genes de lncRNAs y 1804 genes codificantes. De manera destacada, en plantas resistentes C98 hubo un mayor número de genes DE compartidos en todos los tiempos post-infección (Figura 11). En C195 no se encontraron genes de lncRNAs DE compartidos en todas las horas post-infección (Figura 11, A), mientras que en plantas resistentes se destacaron 20 genes de lncRNAs DE de manera constante en todos los tiempos (Figura 11, B, Tabla 3). Con respecto a genes codificantes, C195 presentó sólo 4 genes DE compartidos en todos los tiempos (Figura 11, C) vs 254 genes DE presentes en todos los tiempos en el genotipo C98 (Figura 11, D). Esto indicaría una respuesta génica compartida predominante de lncRNAs y genes codificantes en todas las horas post-infección en C98 por sobre lo observado en C195 y qué estos genes podrían estar asociados a mecanismos de respuesta inmune que podrían ser claves para la modulación de la resistencia a la antracnosis en todas las etapas infectivas analizadas. Para confirmar su asociación con respuesta inmune, posteriormente se realizaron análisis de co-expresión y predicción funcional.

Tabla 2. Número de genes de lncRNAs y genes codificantes (cRNAs) diferencialmente expresados (DE) en genotipo de *Lupinus luteus* resistente (C98) y susceptible (C195) ante la infección por *Colletotrichum lupini*. Se detalla el número total de genes DE para cada hora post-infección (hpi).

Genotipo	Tipo de gen DE	0 vs 24 hpi	0 vs 60 hpi	0 vs 84 hpi
C98	lncRNA	83	100	92
C195	lncRNA	95	3	25
C98	cRNA	672	1709	1376
C195	cRNA	1456	78	715

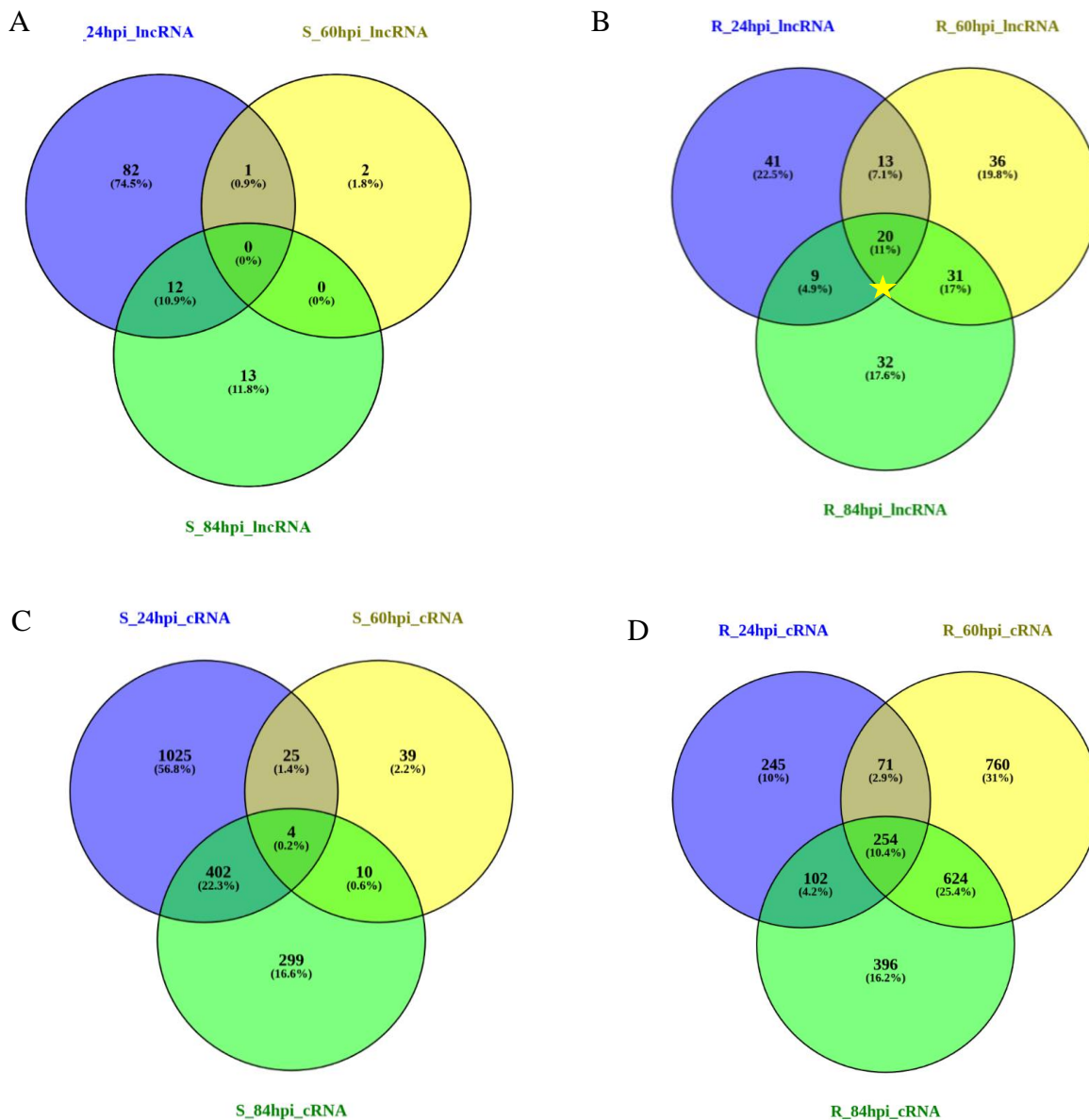


Figura 11. Contrastes de genes de lncRNAs y genes codificantes (cRNA) diferencialmente expresados (DE) en genotipo resistente (R, C98) y susceptible (S, C195) de *Lupinus luteus* ante la infección por *Colletotrichum lupini* a diferentes horas post-infección (hpi). A. lncRNAs DE en las distintas hpi de genotipo susceptible. B. lncRNAs DE en las distintas hpi de genotipo C98 resistente, se destacan 20 lncRNAs compartidos. C. cRNAs DE en las distintas hpi de genotipo C195 susceptible. D. cRNAs DE en las distintas hpi de genotipo C98 resistente.

Siguiente página: Tabla 3. Niveles de expresión diferencial de 20 lncRNAs diferencialmente expresados (DE) en todas las horas post-infección en el genotipo C98 de *Lupinus luteus* ante la infección por *Colletotrichum lupini*. Expresión diferencial en Log2FC para ambos genotipos; susceptible (C195) y resistente (C98) y se indica su significancia en *p-value*. Celdas de genes DE (Log2FC>1) son destacadas en color y *p-value* significativos (<0.05) en **negrita**. Resultados DESeq2.

C195	Ovs24hpi	<i>P-value</i>	Ovs60hpi	<i>P-value</i>	Ovs84hpi	<i>P-value</i>
lncRNA_11150	1,07	5,47E-02	-0,34	5,40E-01	-1,91	7,04E-04
lncRNA_11151	1,79	1,78E-03	-0,35	5,36E-01	-1,01	7,76E-02
lncRNA_11154	0,72	2,05E-01	-0,45	4,34E-01	-2,01	5,29E-04
lncRNA_11155	0,98	1,00E-01	-0,33	5,75E-01	-1,83	2,28E-03
lncRNA_11157	0,73	1,22E-01	-1,00	3,65E-02	-2,00	4,10E-05
lncRNA_11159	1,81	1,19E-04	-0,05	9,22E-01	-0,91	5,83E-02
lncRNA_11160	0,47	3,67E-01	-0,40	4,49E-01	-1,68	1,44E-03
lncRNA_12140	-2,51	2,01E-07	0,11	8,16E-01	0,40	3,84E-01
lncRNA_16410	0,00	9,97E-01	-0,30	7,30E-01	0,94	2,65E-01
lncRNA_16894	-2,60	3,46E-04	0,34	6,07E-01	-0,28	6,77E-01
lncRNA_24719	-2,29	3,09E-03	-0,01	9,85E-01	-0,34	6,47E-01
lncRNA_25701	1,10	1,05E-01	0,89	1,89E-01	-0,31	6,53E-01
lncRNA_25730	0,62	4,42E-01	0,85	2,88E-01	1,78	1,69E-02
lncRNA_32144	0,28	5,99E-01	-0,18	7,37E-01	-0,24	6,59E-01
lncRNA_32308	-1,90	2,82E-07	0,67	6,73E-02	0,70	5,60E-02
lncRNA_3927	-2,22	1,42E-04	0,37	5,11E-01	-0,27	6,35E-01
lncRNA_4056	-0,19	7,26E-01	0,38	4,76E-01	0,48	3,77E-01
lncRNA_430	-2,12	1,20E-03	1,50	1,74E-02	-1,60	1,32E-02
lncRNA_6595	2,25	1,20E-01	0	1	0	1
lncRNA_8965	0,06	9,18E-01	-0,41	5,03E-01	-1,79	3,88E-03
C98	Ovs24hpi	<i>P-value</i>	Ovs60hpi	<i>P-value</i>	Ovs84hpi	<i>P-value</i>
lncRNA_11150	5,41	6,29E-21	4,96	7,85E-18	3,71	1,32E-10
lncRNA_11151	5,17	2,41E-18	4,84	3,03E-16	3,71	4,13E-10
lncRNA_11154	4,72	3,14E-14	4,49	5,20E-13	3,44	3,49E-08
lncRNA_11155	5,09	1,49E-16	4,42	7,36E-13	3,22	1,81E-07
lncRNA_11157	6,40	4,28E-37	6,22	4,67E-35	5,21	4,11E-25
lncRNA_11159	4,99	1,12E-15	4,61	1,40E-13	3,86	7,60E-10
lncRNA_11160	5,16	1,20E-17	5,05	6,01E-17	3,83	2,73E-10
lncRNA_12140	2,26	2,25E-06	5,94	2,80E-36	5,57	4,66E-32
lncRNA_16410	7,43	1,64E-08	5,78	1,41E-05	6,19	2,92E-06
lncRNA_16894	4,64	2,23E-04	7,92	6,88E-11	6,30	2,68E-07
lncRNA_24719	4,97	1,02E-04	9,01	4,16E-13	6,53	1,91E-07
lncRNA_25701	6,87	2,43E-08	6,76	4,24E-08	6,94	1,67E-08
lncRNA_25730	2,61	5,46E-08	2,62	5,24E-08	3,71	1,20E-14
lncRNA_32144	2,26	1,26E-04	2,29	9,63E-05	2,39	4,55E-05
lncRNA_32308	3,86	1,30E-17	5,35	7,62E-33	5,35	8,06E-33
lncRNA_3927	3,34	4,18E-04	6,18	1,81E-11	6,78	1,55E-13
lncRNA_4056	2,42	8,16E-06	2,21	4,53E-05	2,85	1,38E-07
lncRNA_430	4,54	2,16E-09	6,31	6,07E-17	4,97	5,05E-11
lncRNA_6595	2,49	1,13E-04	2,29	4,04E-04	2,81	1,35E-05
lncRNA_8965	3,82	3,88E-09	4,90	3,86E-14	4,24	6,21E-11

4.3 Análisis de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes de *L. luteus* en genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis a diferentes horas post-infección

El análisis de WGCNA agrupó los 33.030 genes filtrados anteriormente en 19 módulos de co-expresión (Tabla 4), en donde se considera que genes provenientes del mismo módulo presentan funciones similares, actuando en conjunto o regulados de manera similar (Montenegro, 2022; Stuart et al., 2003). El nivel de correlación de estos módulos ante los tratamientos por genotipo y horas post-infección, fue evaluado. El primer tratamiento de análisis fue la asociación de la totalidad de los módulos a la condición de respuesta a la antracnosis de resistencia (C98) o susceptibilidad (C195), cuyos resultados de correlación se ilustran en las primeras dos columnas en un mapa de calor, evaluándose posteriormente cada una de las horas post-infección en ambos genotipos de manera individual (Figura 12).

De manera destacada, el módulo *Turquoise* obtuvo un valor de correlación de 0.99 (en una escala de -1 a 1), y una significancia de 4×10^{-32} , exclusivamente para la condición de resistencia a la antracnosis (Figura 12). Además, este módulo mostró un comportamiento de correlación constante y similar para la totalidad de las horas post-infección únicamente en C98, incluso en condiciones de control (Figura 12). Este módulo en particular presentó la mayor cantidad de genes de lncRNAs (792) de todos los módulos analizados (Tabla 4). En detalle, de 3.805 genes totales: 3.013 genes resultaron ser codificantes, y 792 lncRNAs. Los valores de correlación de este módulo asociados a los tratamientos en el genotipo C98 correspondieron a: 0.38 (0hpi), 0.37 (24hpi), 0.34 (60hpi) y 0.42 (84hpi) (Figura 12). Esto indicaría que lncRNAs y genes codificantes presentes en este módulo podrían estar involucrados en la regulación de resistencia a la antracnosis en el genotipo C98 en todas las horas post-infección de manera exclusiva, ya que este módulo no muestra una correlación positiva en ninguno de los ensayos del genotipo susceptible (Figura 12, Susceptible

(S)_hpi). Este módulo podría ser de interés para la búsqueda de marcadores moleculares asociados a resistencia. Si bien otros módulos también fueron exclusivos de tratamientos resistentes, estos fueron destacados de manera individual en determinadas horas post-infección (Tabla 4).

Tabla 4. Módulos de co-expresión de genes de *Lupinus luteus* y su asociación ante la infección por *Colletotrichum lupini*. Se observan 19 módulos construidos por WGCNA. El número de genes codificantes (codRNA), lncRNAs y genes totales (Total), son detallados para cada módulo. El tratamiento asociado más representativo de cada módulo también es indicado. Se destacan en negrita módulos exclusivos para el genotipo resistente.

N°	Módulo	codRNA	lncRNA	Total	Tratamiento asociado
1	Brown	1603	43	1646	Resistente y susceptible a las 24hpi
2	Darkslateblue	105	9	114	Resistente y susceptible a las 84hpi
3	Thistle2	54	52	106	Resistente a las 24hpi
4	Brown4	126	2	128	Resistente a las 24hpi
5	Bisque4	87	27	114	Resistente a las 24hpi
6	Darkorange	467	10	477	Resistente y susceptible a las 24hpi
7	Salmon4	102	3	105	Susceptible a las 84hpi
8	Floralwhite	144	5	149	Susceptible a las 84hpi
9	Lightpink4	44	6	50	Susceptible a las 60hpi
10	Blue	1602	59	1661	Resistente y susceptible a las 60hpi
11	Lightsteelblue1	185	2	187	Susceptible a las 84hpi y Resistente a las 60hpi
12	Darkgrey	518	17	535	Resistente a las 60 hpi
13	Ivory	153	8	161	Resistente a las 84 hpi
14	Sienna3	260	8	268	Resistente a las 84 hpi
15	Magenta	919	45	964	Resistente a las 0 hpi (control)
16	Navajowhite2	63	3	66	Susceptible a las 0 hpi (control)
17	Darkmagenta	279	19	298	Resistente a las 60 hpi
18	Grey	1099	125	1224	Resistente y susceptible a las 84 hpi
19	Turquoise	3013	792	3805	Resistente a todas las hpi

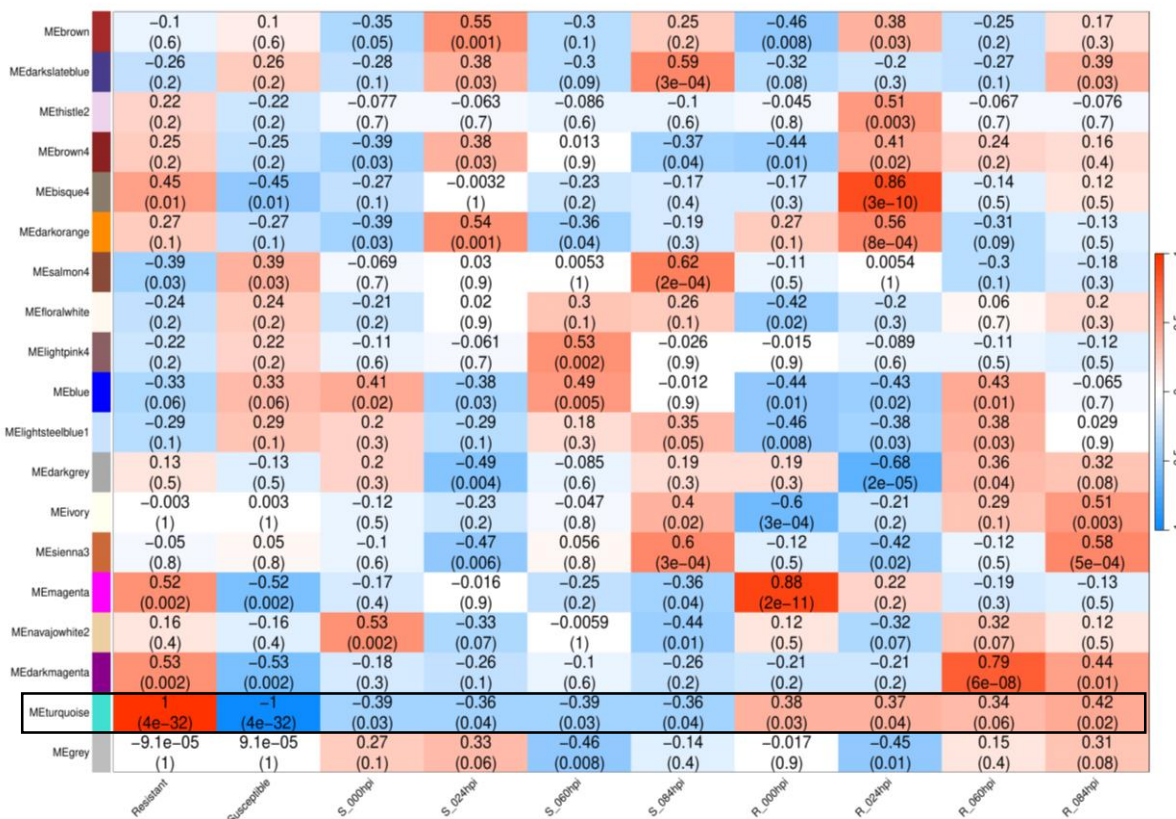


Figura 12. Mapa de calor de resultados de co-expresión de WGCNA entre módulos de genes de *Lupinus luteus* y su asociación ante la resistencia e infección por *Colletotrichum lupini*. En el eje Y se ilustran los 19 módulos predichos, mientras que en el eje X, los tratamientos evaluados por WGCNA. De izquierda a derecha, el primer tratamiento corresponde a la condición de resistencia o susceptibilidad, seguido de los tratamientos en genotipo susceptible (S: C195) y resistente (R: C98) a diferentes horas post-infección (hpi), considerando 0 hpi como control no infectado. Se destaca el módulo *Turquoise* (MEturquoise) por estar altamente correlacionado de manera exclusiva al genotipo R y presente en todas las hpi. Escala de correlación de -1 a 1 y nivel de significancia de correlación entre módulos y cada uno de los tratamientos, fueron anotados.

A continuación, las relaciones de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes fueron visualizadas en redes de co-expresión para la posterior predicción de genes codificantes *target* de lncRNAs y su relación con respuesta inmune.

4.4 Predicción funcional de lncRNAs y targets de *L. luteus* asociados a respuesta inmune ante la antracnosis

Para la predicción funcional, datos de co-expresión obtenidos en el paso anterior fueron visualizados en redes de co-expresión. Los atributos de co-expresión entre genes y los niveles de significancia asociados a cada módulo se utilizaron para filtrar por fuerza de conexión de acuerdo a lo detallado en metodología (3.5). Para una mayor robustez en los resultados, se trabajó con el 25% de las conexiones más fuertes encontradas entre genes para cada tratamiento, considerando un valor mínimo de fuerza de conexión (*weight*) de 0.02.

En primer lugar, se construyó una red con el 25% de las conexiones más fuertes entre la totalidad de los genes (considerando ambos genotipos) asociados a la condición de resistencia (Figura 13, A). Es así como de 33.030 genes, 969 genes totales fueron asociados al genotipo resistente considerando los filtros de conexión. Interesantemente, casi la totalidad de los genes de esta red pertenecieron al módulo *Turquoise*, representado por 531 genes codificantes y 374 lncRNAs. El otro módulo presente en la red fue Magenta con 48 genes codificantes y sólo 16 lncRNAs. De los 20 lncRNAs anotados como DE exclusivos de resistencia en análisis anteriores (Tabla 3), en el módulo *Turquoise* destacó el gen *lncRNA 25730* por su fuerte co-expresión con genes codificantes. El enriquecimiento funcional de la red arrojó que los procesos más enriquecidos fueron: GO:009987 procesos celulares (75,2%), GO: 050896 respuesta a estímulos (35,5%) y GO:042221 respuesta a estímulos químicos (20,9%), lo que podría tener relación con una eventual respuesta a la infección por *C. lupini*. De la misma manera, se construyeron redes de co-expresión individuales para cada tratamiento. Notablemente, la participación del módulo *Turquoise* fue observada en todas las redes construidas (Figura 13).

La red de 24 hpi presentó 1089 genes en total, de los cuales 117 genes fueron identificados como lncRNAs (Figura 13, B). En este caso, ningún lncRNA perteneció al grupo de 20 lncRNAs DE del genotipo resistente C98 (Tabla 3). En esta red no hubo un módulo predominante, sin embargo, el módulo mayormente representado fue *Darkorange* con 326 genes totales y 12 lncRNAs. En particular, este módulo estuvo altamente asociado a las 24hpi en ambos genotipos (C98 y C195) (Tabla 4), lo que podría significar que la respuesta ante 24 hpi es relativamente similar en ambos genotipos. En la red 24 hpi, las funciones más enriquecidas en términos GO correspondieron a procesos de modificación de proteínas GO:006464 (15%), respuesta a sustancia orgánica GO:010033 (14,6%) y modificación de proteínas post-traduccionales GO:043687 (13,5%). Si bien hubo funciones asociadas a respuesta ante estímulos, las frecuencias de éstas fueron bajas con respecto a la totalidad de los procesos biológicos encontrados. Esto sugiere que a las 24 hpi la respuesta inmune podría no estar tan activa.

En la red 60 hpi, se destacaron 506 genes totales, de los cuales sólo 26 correspondieron a lncRNAs (Figura 13, C). De ellos, se identificó el gen *LncRNA24719* perteneciente al módulo *Blue*, el cual fue identificado como parte del grupo de 20 lncRNAs de respuesta exclusiva de C98 ante la infección (Tabla 3). En la red de este tratamiento no hubo módulos dominantes (Figura 13, C), sin embargo, *Darkmagenta* fue el más representado con 188 genes totales y 9 lncRNAs, seguido del módulo *Blue* con 183 genes totales y sólo 3 lncRNAs dentro de los cuales se destacó *LncRNA24719*. Los términos GO observados a las 60 hpi, estuvieron asociados a procesos de biosíntesis y crecimiento, no habiendo una tendencia clara hacia un proceso celular en específico. Es más, el proceso que tuvo mayor frecuencia fue de un 6,7% en funciones de síntesis de moléculas pequeñas GO:044283. Estos resultados funcionales no arrojaron resultados claros asociados a respuesta inmune.

Por último, la red de 84 hpi presentó 209 genes totales y 46 lncRNAs, en donde el módulo mayormente representado fue el módulo *Turquoise* con 101 genes totales y 40 lncRNAs (Figura 13, D). Entre los lncRNAs, se identificó el gen *LncRNA25730*, el cual estuvo representado en la red de resistencia y perteneció al grupo de 20 lncRNAs de respuesta exclusiva de C98 ante la infección (Tabla 3).

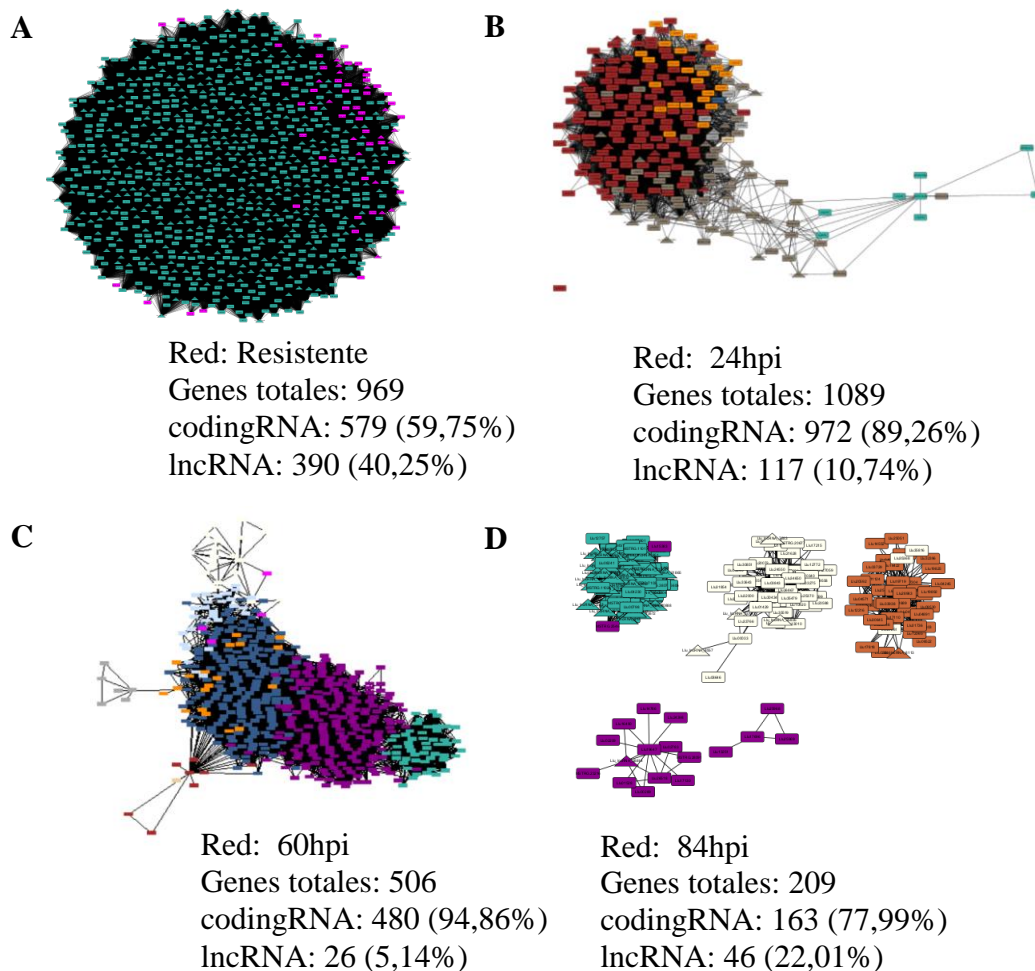


Figura 13. Redes de co-expresión entre genes de lncRNAs y genes codificantes de *Lupinus luteus* asociados a diferentes tratamientos ante la infección por *Colletotrichum lupini*. Cada nodo corresponde a un gen, nodos triangulares corresponden a lncRNAs y nodos rectangulares a genes codificantes (codingRNA). El módulo de origen de cada gen es representado por su respectivo color. Tratamiento de red, número de genes totales, codingRNAs, lncRNAs, y sus porcentajes con respecto al total de genes, son detallados para cada red.

En este caso, la anotación funcional GO arrojó que el 37,1% y 34.4% de los genes totales, se encontraban asociados a funciones de procesos metabólicos de macromoléculas GO:043170 y procesos metabólicos celulares de macromoléculas GO:044260 respectivamente. Esto revelaría procesos activos de síntesis molecular a las 84hpi, en donde es posible que haya una regulación activa de expresión génica y producción de moléculas asociadas a respuesta inmune.

En síntesis, al observar el comportamiento general de genes asociados a resistencia, la red global de resistencia fue la que presentó un mayor número de lncRNAs, y asociación a procesos de respuesta ante estímulos, lo que sugiere que la resistencia podría estar dada por procesos asociados a respuesta. Para una mayor precisión en la predicción funcional de lncRNAs ante respuesta inmune en C98, se realizó la anotación funcional de genes directamente co-expresados con lncRNAs de interés, en este caso *lncRNA25730* y *lncRN24719*, debido a sus antecedentes como genes DE en C98 (Tabla 3). De esta manera, se construyeron sub-redes, en donde ambos lncRNAs resultaron co-expresar fuertemente con genes codificantes asociados a respuesta inmune (Tabla 5). En específico, el gen *lncRNA25730*, co-expresó fuertemente con *Llu00152*, perteneciente al módulo *Turquoise* de la red resistente (Tabla 5, Figura 14 A). Sorprendentemente, la anotación funcional de *Llu00152*, se relacionó a proteínas *Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases* (LRR-RKs), asociadas a respuesta ante estímulos biológicos en plantas (Chakraborty et al., 2019). Además, el *lncRNA25730*, también co-expresó con *Llu31459* del módulo *Turquoise* en la red de 84 hpi (Figura 14, B), el cual fue anotado como codificante para proteasas, también relacionadas a respuesta inmune en plantas (Tabla 4) (Figueiredo et al., 2021).

Tabla 5. Anotación funcional de *targets* de lncRNAs. Se indica la fuerza de co-expresión entre lncRNA-*target* (*weight*>0.02), y su anotación funcional. Entre paréntesis se indica la especie, y el porcentaje de identidad entre el *target* y secuencias encontradas en NCBI. Datos revisados el 26 de diciembre de 2024.

lncRNA	Target	Weight	Anotación
<i>lncRNA25730</i>	<i>Llu00152</i>	0.269	Proteínas LRR-RKs GSO2 (<i>L. angustifolius</i> , 80.04%, XP_019428774.1)
<i>lncRNA25730</i>	<i>Llu31459</i>	0.245	Proteasa subtilisina Glyma18g48580 (<i>L. angustifolius</i> , 81.13%, XP_019460236.1)
<i>lncRNA24719</i>	<i>Llu19789</i>	0.104	Proteínas LRR-RKs At1g60630 (<i>L. angustifolius</i> , 92.33%, XP_019413766.1)
<i>lncRNA24719</i>	<i>Llu09149</i>	0.090	Proteína G lectina S-receptor-like ser/thr quinasa (<i>L. angustifolius</i> , 96.19%, XP_019452768.1)
<i>lncRNA24719</i>	<i>Llu26895</i>	0.098	Aspartil proteasas AED3 (<i>L. angustifolius</i> , 94.06%, XP_019449311.1)
<i>ncRNA24719</i>	<i>Llu01283</i>	0.102	Fosfolipasa A1 PLIP2 (<i>Abrus precatorius</i> , 73.18%, XP_027366091.1)
<i>lncRNA24719</i>	<i>Llu07035</i>	0.115	MYC1 factor de transcripción (<i>L. angustifolius</i> , 89.03%, XP_019459412.1)
<i>lncRNA24719</i>	<i>Llu19259</i>	0.096	WRI1, AP2/EREBP factores de transcripción (<i>L. angustifolius</i> , 90.74%, XP_019465169.1)
<i>lncRNA24719</i>	<i>Llu04928</i>	0.099	Regulador quinasa asociada a membrana 4 (<i>L. angustifolius</i> , 89.76%, XP_019439054.1)

En el caso de *lncRNA24719*, este co-expresó de manera predominante a las 60 hpi con genes del módulo *Blue* (Figura 14, C) que correspondieron a; *Llu19789* anotado como proteína LRR-RKs, *Llu26895* anotado como aspartil proteasas AED3 con antecedentes en inmunidad en plantas (Figueiredo et al., 2021), *Llu01283* identificado como Fosfolipasa A1 PLIP2 asociada a respuesta inmune (Cook et al., 2021), *Llu07035* factor de transcripción MYC1 pertenecientes a familias AP2 (Li et al. 2024), *Llu19259* factor de transcripción Wrinkled 1 también perteneciente también a familia de factores de transcripción AP2 y, por último, el gen *Llu04928* asociado a proteínas quinasa (Tabla 4).

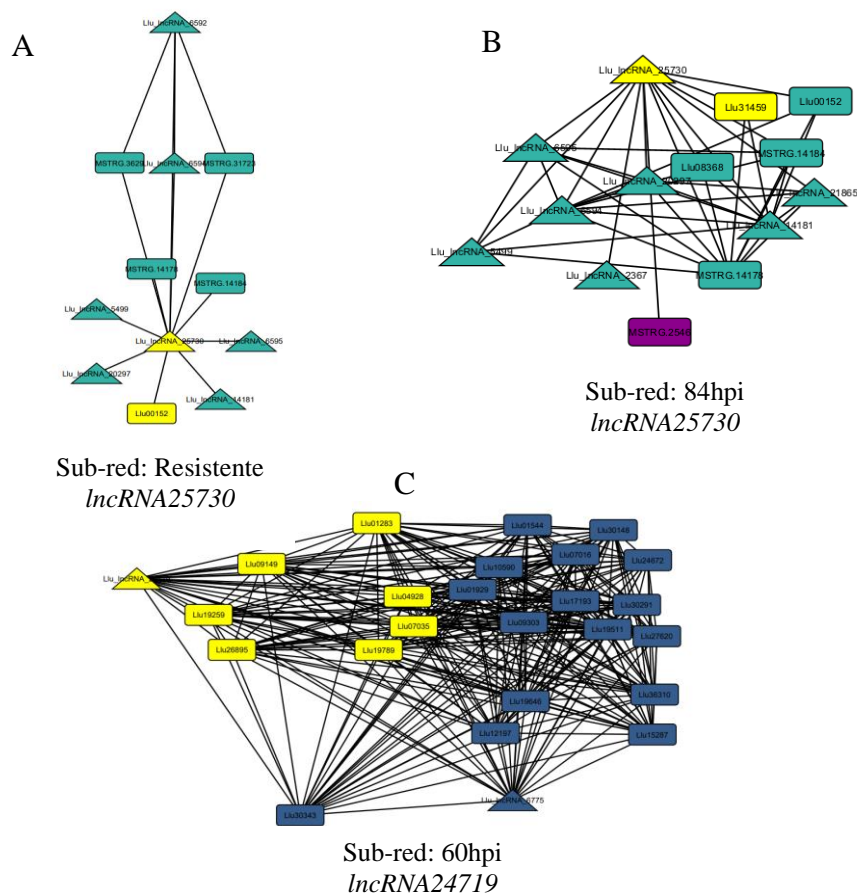


Figura 14. Sub-redes de co-expresión entre lncRNAs de *Lupinus luteus* y sus *targets*. Se muestran en amarillo las conexiones más significativas entre lncRNAs (nodos triangulares) diferencialmente expresados exclusivos de genotipo C98 y *targets* codificantes asociados a respuesta inmune (nodos rectangulares). A. Sub-red de co-expresión para *lncRNA25730* y sus *targets* en red resistente, B. Sub-red de co-expresión para *lncRNA25730* y sus *targets* en red 84hpi y C. Sub-red de co-expresión para *lncRNA24719* y sus *targets* en red 60hpi.

Genes codificantes con altos niveles de co-expresión con lncRNAs ($weight > 0.02$) fueron considerados sus *targets* (Tabla 4, Figura 14). La búsqueda en literatura de los antecedentes funcionales de genes *targets* arrojó relaciones directas con procesos defensa ante patógenos en plantas, las que han sido profundizados en discusión. Ello confirmaría que ambos lncRNAs identificados estarían involucrados en procesos de resistencia ante la antracnosis.

Por último, se visualizaron los niveles de expresión de lncRNAs y sus *targets*, para cada hora post-infección y genotipo (Figura 15). En general, niveles de expresión de lncRNAs y sus *targets* se mantuvieron similares entre sí, lo que sugiere una estrecha relación entre lncRNA-*target*. Uno de los resultados más destacados fue observado en los niveles de expresión del *lncRNA25730* y sus *targets*, los que alcanzaron niveles considerablemente más altos en C98 en todas las horas post-infección, en comparación con C195 (Figura 15, A-B). Por otro lado, el gen *lncRNA24719* y sus *targets* no mostraron diferencias de expresión tan evidentes entre genotipos, sin embargo, sí presentaron niveles de expresión relativamente más altos en plantas C98 (Figura 15, C-D).

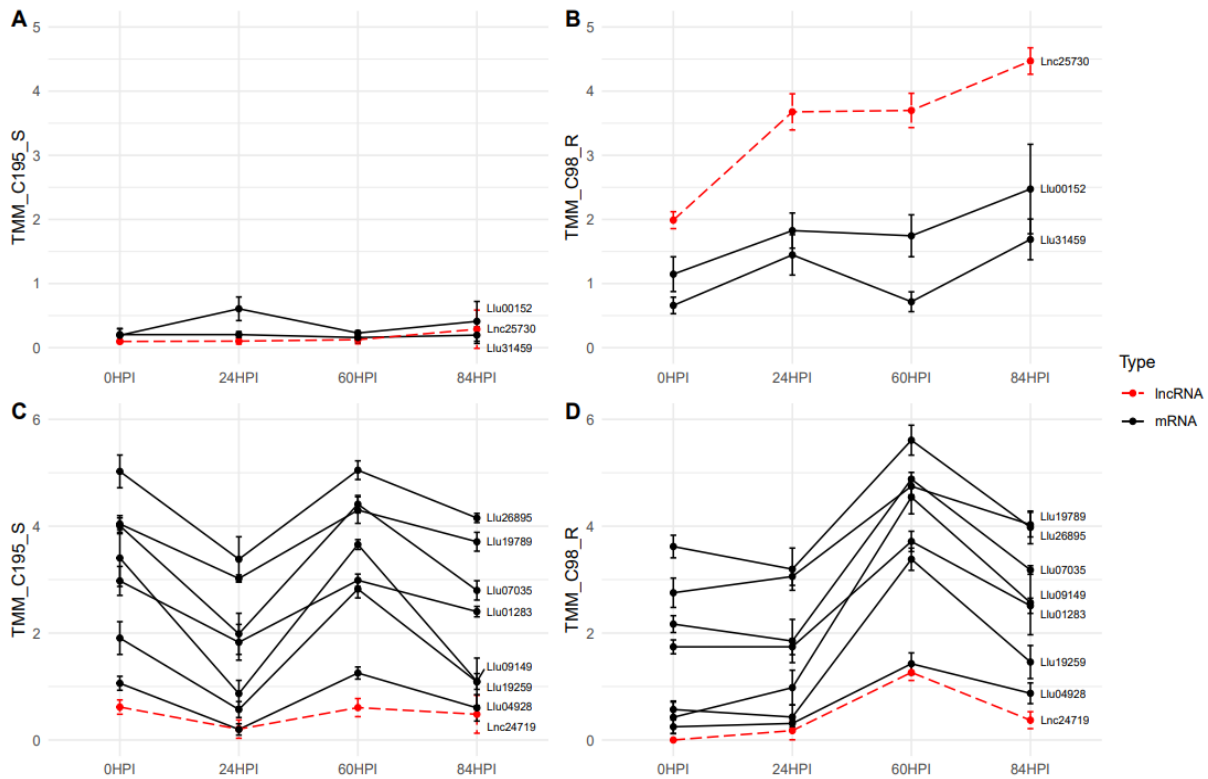


Figura 15. Niveles de expresión de *lncRNAs25730* y *lncRNA24719* de *Lupinus luteus* junto a sus *targets*. A. *lncRNA25730* en rojo y sus *targets* en negro, en genotipo susceptible (C195), B. *lncRNA25730* y sus *targets* en genotipo resistente (C98), C. *lncRNA24719* y sus *targets* en genotipo susceptible (C195), y D. *lncRNA24719* y sus *targets* en genotipo resistente (C98).

4.5 Predicción de mecanismo de regulación entre *lncRNA25730*, *lncRNA24719* y sus *targets*.

De acuerdo a antecedentes en literatura, los lncRNAs regulan la expresión de genes codificantes *target* mediante una interacción directa o indirecta (Naseer et al., 2024). Mediante la visualización de la base de datos del genoma de *L. luteus* enriquecida con genes de lncRNAs, se logró obtener la localización de lncRNAs y sus *targets*. Tanto para *lncRNA25730* como *lncRNA24719*, la regulación sobre sus *targets* fue clasificada del tipo *trans* debido a que todos sus *targets* se localizaron a más de 100kb de distancia (Stam et al., 2002.; Zhao et al., 2019) (Tabla 6).

Tabla 6. Localización de *lncRNA25730* y *lncRNA24719* junto a sus respectivos *targets*.

ID lncRNA y <i>targets</i>	Cromosoma	Coordenadas
<i>lncRNA25730</i>	YL-20	25234119-25235943
<i>Llu00152</i>	YL-01	1951517-1954858
<i>Llu31459</i>	YL-06	25749464-25750200
<i>lncRNA24719</i>	YL-19	30768116-30772630
<i>Llu01283</i>	YL-01	41339958-41343368
<i>Llu04928</i>	YL-12	2477061-2479015
<i>Llu07035</i>	YL-13	13283498-13286700
<i>Llu09149</i>	YL-15	393426-397153
<i>Llu19259</i>	YL-21	24259359-24263643
<i>Llu19789</i>	YL-21	30011515-30016898
<i>Llu26895</i>	YL-03	36664259-36667508

Finalmente, la herramienta LncTar se utilizó para predecir interacciones directas entre los lncRNAs y sus *targets*. Como resultado, no se encontraron interacciones significativas con un ndG >-0.1, entre los *lncRNA25730*, *lncRNA24719*, y sus genes *targets*. Estos resultados sugieren una posible regulación del tipo *trans*, en donde el lncRNA regularía la expresión de un gen codificante lejano en el genoma sin necesidad de una interacción directa, pudiendo estar relacionado a mecanismos de regulación del tipo señuelo de miRNAs o *decoy* (Figura 7) (Naseer et al., 2024).

5. DISCUSIÓN

Los ARNs largos no codificantes en plantas han sido asociados a un amplio espectro de procesos biológicos, así como también a la regulación de la respuesta inmune ante patógenos (Gareev et al., 2023; Ma et al., 2022; Wang et al., 2023; Zhao et al., 2024). Sin embargo, la información disponible con respecto al rol de lncRNAs en respuesta inmune de leguminosas ante la antracnosis es limitada. En este estudio se analizaron 32 librerías de RNA-seq provenientes de hipocótilos de *L. luteus* de genotipo resistente (C98) y susceptible (C195) a la antracnosis previamente sometidos a la infección por *C. lupini* (Armijo-Godoy et al., 2024). A partir de datos de transcriptoma, se lograron identificar 6.737 transcritos provenientes de 2.785 genes de lncRNAs en lupino amarillo (*L. luteus*), en donde más del 80% de éstos se clasificó como intergénico, una de las clases más abundantes de lncRNAs encontradas en plantas (Feng et al., 2021; Zamora-Ballesteros et al., 2022; Zhou et al., 2023). Por medio de análisis de expresión diferencial, se identificó un mayor número de genes de lncRNAs diferencialmente expresados (DE) en genotipo resistente C98 en comparación al genotipo susceptible C195 (C98: 182 genes de lncRNAs DE vs en C195: 110 genes de lncRNAs DE). Este comportamiento también ha sido observado en nogal *J. regia*, en donde Feng et al., (2021) y R. Zhou et al., (2023), observaron un mayor número de lncRNAs DE en frutos resistentes a la antracnosis producida por *Colletotrichum gloeosporioides*, lo que fue descrito incluso en condiciones de control sin infectar. Ante otros hongos como *Verticillium dahliae* e insectos del tipo mosca blanca *Aleurodicus dispersus* en plantas de algodón *Gossypium hirsutum*, también se ha reportado un mayor número de lncRNAs DE en genotipos resistentes (Zhang et al., 2022a, b). En estos estudios en *G. hirsutum*, algunos lncRNAs DE fueron apagados en ensayos de *knock-out*, obteniendo como resultado que plantas resistentes perdían su efectividad de defensa ante el patógeno (Zhang et al., 2022a, b), mismos resultados se han obtenido en ensayos de

silenciamiento de lncRNAs en *Arabidopsis*, comprometiendo la resistencia de la planta y la expresión de genes de resistencia (Seo et al., 2017).

Los resultados obtenidos en este estudio, en conjunto con los antecedentes de lncRNAs en plantas bajo estrés biológico, sugiere que los lncRNAs tendrían una incidencia clave en la respuesta inmune de genotipos resistentes de *L. luteus* C98 ante *C. lupini*. De manera destacada, por medio del mismo análisis de expresión diferencial se identificaron 20 genes de lncRNAs DE únicamente en genotipo resistente C98, y presentes de manera constante en todas las horas post-infección. Para definir el rol de estos genes de lncRNAs en respuesta inmune, se realizaron análisis de co-expresión en conjunto con genes codificantes de *L. luteus* ante la infección por *C. lupini*.

Con respecto a los resultados en los análisis de co-expresión, el módulo *Turquoise* presentó la máxima correlación con respecto a la condición de resistencia durante todas las horas post-infección. Así mismo, la red de genes asociados a resistencia fue constituida en más del 90% por genes del módulo *Turquoise* y, además, presentó el mayor número de lncRNAs en comparación con las otras redes construidas por tratamiento. Las funciones GO relacionadas a la condición de resistencia, presentó un enriquecimiento para funciones de respuesta ante estímulos, lo que daría indicios de la función de los genes de la red ante estímulos de patógenos en defensa inmune. Curiosamente, las funciones genéticas analizadas en redes individuales por tratamiento, arrojaron resultados diferentes para cada hora post-infección, sugiriendo mecanismos de defensa específicos para cada tiempo. A las 24 hpi, funciones de respuesta ante sustancias orgánicas fueron enriquecidas, lo que puede deberse a la respuesta de la planta ante la invasión por *C. lupini*. Esta invasión ocurriría cerca de las 24 horas post-infección según lo observado por Guilengue et al., (2022), en donde las esporas desarrollan un apresorio mielinizado para la rotura de la pared celular de la planta, esta actividad podría estar desencadenando las funciones de respuesta ante sustancias

orgánicas observadas a las 24 hpi. En contraste, el enriquecimiento funcional de la red 60 hpi, no presentó procesos específicos de respuesta inmune bajo términos GO, lo que podría ocurrir por una eventual disminución en la actividad invasiva del patógeno, dando paso a la fase biotrófica a las 60 hpi (Feng et al., 2021; Guilengue et al., 2022). Se ha observado que esta etapa ocurriría entre las 24 y las 72 horas post-infección (Feng et al., 2021; Guilengue et al., 2022), en donde el hongo no produce daños a las células de la planta y se alimenta de los metabolitos secundarios de esta (Siddiqui & Ali, 2014), lo que podría traducirse en una disminución en la actividad de defensa inmune de la planta. Por último, la red 84 hpi presentó funciones enriquecidas de metabolismo de macromoléculas, lo que podría significar una alta actividad química que puede estar asociada a defensa, debido a que en este tiempo estaría ocurriendo la fase necrotrófica (Armijo-Godoy et al., 2024). Esta fase ha sido reconocida a partir de las 84 hpi en hipocótilos de *L. luteus* (Armijo-Godoy et al., 2024) debido a la aparición de los primeros síntomas de antracnosis provocados por la muerte celular (Guilengue et al., 2022). Según los patrones de expresión de lncRNAs vistos en este estudio, no hay una tendencia clara en lo que respecta a un incremento constante de su expresión a medida aumenta el tiempo post infección, lo que también ha sido observado en patrones de expresión de lncRNAs ante antracnosis en *J. regia*, en donde la regulación de la resistencia mediante lncRNAs parece ser mediante pulsos de expresión a determinadas horas post-infección (Feng et al., 2021; Zhou et al., 2023). Esto sugiere que cada etapa post-infectiva es regulada de manera diferente mediante mecanismos de lncRNAs.

Resultados de expresión diferencial arrojaron 20 lncRNAs DE exclusivamente en genotipo C98, de los cuales destacaron *lncRNA25730* y *lncRNA24719*, debido a sus niveles de co-expresión con genes codificantes relacionados a procesos de respuesta inmune en plantas, siendo *lncRNA25730* y sus *targets* mayormente expresados a las 84 hpi, mientras que *lncRNA24719* y sus *targets*

estuvieron mayormente co-expresados a las 60 hpi. Esto sugiere que ambos lncRNAs estarían involucrados en la regulación de la respuesta a la antracnosis en etapas infectivas diferentes.

La anotación funcional específica de genes *target* de *lncRNAs25730* y *lncRNA24719*, confirmó la relación de éstos a procesos de respuesta inmune. En primer lugar, la red resistente, mostró una co-expresión significativa entre *lncRNA25730* y el gen *Llu00152*, anotado como proteína LRR-RK GSO2. Las proteínas “*Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase*” (LRR-RK) son reconocidas por ser receptores de membrana de señales asociadas a patógenos, contemplando vías de respuesta inmune innata MTI (Chakraborty et al., 2019). En específico las proteínas GSO2 y su homólogo (GSO1), se han descrito como receptores transmembrana que regulan la permeabilidad de membranas internas como la banda de Caspary en la endodermis de tejidos juveniles de cotiledón e hipocótilo, lo que podría explicar la presencia del gen en hipocótilo de *L. luteus* (He et al., 2024; Nakayama et al., 2017; Tsuwamoto et al., 2008). Además, en semillas GSO2 se relaciona al desarrollo de la cutícula embrionaria y en polen conforma la pared celular (He et al., 2024).

Curiosamente, se ha observado en ensayos de estrés salino que estas proteínas participarían en la reducción de la permeabilidad y la disminución del ingreso de sales al interior de los tejidos vasculares de la planta, mejorando así su resistencia a suelos hipersalinos (Chen et al., 2023). Si bien la información sobre el rol de estas proteínas bajo estrés biótico es escasa, de acuerdo con estos antecedentes, estas proteínas podrían estar implicadas en la disminución de la permeabilidad de membranas y la reducción del ingreso de patógenos hacia tejidos vasculares. En segundo lugar, *lncRNA25730* estuvo fuertemente asociado al gen *Llu31459* a las 84hpi, el cual fue anotado como Proteasa subtilisina ortólogo del gen *Glyma18g48580* de la soja *G. max*. En este caso, *Glyma18g48580* es un gen que codifica proteínas subtilasas únicas en leguminosas, las cuales contienen péptidos de 12 aminoácidos (NTPPRRAKSRPH) aislados y nombrados como

GmSubPep, cuya actividad promueve la transcripción de genes asociados a resistencia (Pearce et al., 2010). La actividad de este péptido se presume que tendría interacción directa con el patógeno, la que ocurriría en el apoplasto o espacio extracelular, por lo que estarían involucrados mecanismos de regulación vía ETI (Pearce et al., 2010). Los niveles de expresión de *Glyma18g48580* son altos exclusivamente en tejidos en crecimiento en plantas como hipocótilo, estando ausentes en plantas maduras (Pearce et al., 2010), lo que explicaría la expresión del gen en hipocótilo de *L. luteus*. Ensayos experimentales de inducción de la expresión del gen con fitohormonas tipo ácido jasmónico (JA) o ácido salicílico (SA), han demostrado que estas no alteran su expresión, por lo que se presume que el gen participaría de una vía de respuesta independiente (Pearce et al., 2010; S. Singh & Mehrotra, 2024). Por esta razón, los resultados obtenidos en este estudio podrían indicar que el *lncRNA25730* actuaría como regulador de la expresión de *subtilisina Llu31459* en hipocótilo de C98 de *L. luteus*.

Con respecto al *lncRNA24719* y sus *targets*, se encontraron 7 interacciones mayormente co-expresadas a las 60 hpi. La primera interacción correspondió al gen *Llu19789*, cuyos niveles de expresión fueron los más altos de los *targets* de *lncRNA24719* en C98, el cual fue anotado como proteína LRR-RKs. Anteriormente genes asociados a estas proteínas también co-expresaron con *lncRNA25730*, las que han sido ampliamente estudiadas en las vías de inmunidad innata MTI (Chakraborty et al., 2019). Además, genes asociados a proteínas LRR-RKs, se han observado sobre-expresados en genotipos de nogal *J. regia* resistentes a la antracnosis ante la infección por *Colletotrichum* y co-expresados con lncRNAs (Feng et al., 2021), lo que es similar a lo observado en este estudio. El segundo gen co-expresado con *lncRNA24719* correspondió a *Llu09149* anotado como “*G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase*” (GsSRK). En general, las proteínas receptoras tipo quinasa (RLKs) pertenecen al grupo más extenso de proteínas

transmembrana, transductores de señales en plantas y son agentes activos de vías MTI (Bouwmeester & Govers, 2009). Dentro del cual, se diferencian aquellas con un motivo extracelular de lectina, existiendo tres clases de lectinas: G, C y L (Bouwmeester & Govers, 2009). En este trabajo se identificó un gen del tipo G, el cual estaría implicado en mecanismos de defensa (Bouwmeester & Govers, 2009).

En ensayos con plantas mutantes en donde se promovió la sobreexpresión de *GsSRK* ante estrés biótico en *Morus multicaulis*, se ha observado que luego de las 72 hpi ante hongos y bacterias, las plantas transgénicas no generan síntomas visibles a las enfermedades (C. Liu et al., 2021). Por otra parte, se ha descrito que la estimulación exógena de fitohormonas de ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA), promueven la expresión de *Mu-GsSRK* (C. Liu et al., 2021), confirmando la relación de este gen a respuesta inmune en plantas. En tercer lugar, el gen co-expresado *Llu26895* codificó putativamente para una proteína del tipo proteasa aspártica AED3. Las proteasas aspárticas son enzimas proteolíticas implicadas en varios procesos biológicos y su rol en respuesta inmune es variado (Figueiredo et al., 2021). Recientemente en vías ETI, se ha descrito la degradación extracelular de efectores patógenos de *Phytophthora sojae* en *G. max* a partir de una proteasa aspártica GmAP5, conformando así un control de virulencia del patógeno de manera directa (Xia et al., 2020).

Adicionalmente, Niu & Wang (2018), mencionan que AED3 estaría implicada en mecanismos de inmunidad sistémicos de resistencia adquirida (SAR) ante patógenos fúngicos como *Ustilago maydi* en plantas de maíz, observándose una sobreexpresión del gen en condiciones de post-infección, similar a lo observado en este estudio. El cuarto gen co-expresado correspondió a *Llu01283* que codificaría proteínas del tipo fosfolipasas A1 PLIP2. Fosfolipasas de cloroplastos tipo PLIP han sido descritas en *A. thaliana*, siendo PLIP1 asociada a biosíntesis de aceites, y en

específico PLIP2 y 3, asociadas a respuesta inmune a través de la regulación de JA (K. Wang et al., 2018). En particular, PLIP2 se encuentra ubicada de manera ubicua en membrana de cloroplastos, estroma y tilacoides (K. Wang et al., 2018). Estudios previos reportaron que la sobreexpresión de *PLIP2* conduce a la acumulación de la forma bioactiva de JA, implicado en vías de respuesta inmune innata ante patógenos en plantas (Cook et al., 2021; K. Wang et al., 2018). El gen *Llu07035* asociado al factor de transcripción MYC1, es el quinto gen relacionado a *lncRNA24719*.

En plantas, factores de transcripción de mielocitomatosis (MYC) estarían asociados directamente a la producción de JA y glicoalcaloides esteroidales (SAGs) (Z. Li et al., 2024). En tomate, *Solanum lycopersicum*, MYC1 interactúa con factores de transcripción del tipo AP2-ERF TF GAME9 regulando la producción de SAGs (Swinnen et al., 2022). Factores de transcripción del tipo AP2-ERF (*APETALA2/ethylene responsive factors*) han sido descritos como sobre-regulados en horas post-infección en genotipos C98 de *L. luteus* ante la antracnosis en hipocótilo (Armijo-Godoy et al., 2024), encontrándose entonces que el *lncRNA24719* podría estar co-regulando la expresión de factores de transcripción relacionados a respuesta inmune. El siguiente gen co-expresado fue *Llu19259* anotado como Wrinkled-1 (WRI1) AP2/ERE BP, en donde Wrinkled-1 (WRI1) corresponde a un factor de transcripción que se ha estudiado mayormente en procesos de desarrollo, crecimiento, y biosíntesis de aceites en plantas (Fei et al., 2020). Este pertenece a una super familia de 146 factores de transcripción del tipo AP2/ERE BP (*APETALA2/ethylene responsive element binding protein*) caracterizados por presentar dominios AP2 (Fei et al., 2020; Wang et al., 2023), de los que se lograron identificar dos en *Llu19259*.

Los factores de transcripción pertenecientes a esta familia se han reportado como reguladores de respuesta inmune asociados al mecanismo de defensa mediante SA y etileno (Giri et al., 2014; C.

Li et al., 2011; Ma et al., 2024). Sin embargo, no hay antecedentes del rol específico de WRI1 en respuesta inmune en plantas, pudiendo ser este uno de los primeros estudios que vinculan el gen a respuesta ante infección por *C. lupini* en *L. luteus*. En séptimo lugar, el gen *Llu04928* fue predicho como “MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 4-RELATED”. En particular, la información del gen es limitada, no habiendo un vínculo claro entre el gen y procesos de defensa inmune, sin embargo, las proteínas quinasas han sido reconocidas por participar en mecanismos de resistencia, dentro de las cuales están las proteínas LRR-RKs y GsSRKs, descritas previamente (Tena et al., 2011).

Cabe destacar que dentro de los antecedentes de los *targets* de *lncRNA24719*, varios de ellos están asociados a la síntesis de ácido jasmónico (JA), ello concuerda con que esta fitohormona modula los principales mecanismos de defensa ante patógenos del tipo hemibiotróficos y necrotróficos, lo que concuerda con el ciclo infectivo de *C. lupini* (Guilengue et al., 2022; Macioszek et al., 2023). Además, en vista general de las vías de regulación de respuesta inmune asociadas a los *targets* de *lncRNAs* identificados, se concluye que ambas vías de inmunidad; MTI y ETI estarían actuando en la resistencia a la antracnosis en *L. luteus* C98.

Por otro lado, algunos genes *target* han sido observados exclusivamente en tejidos juveniles como hipocótilo, por lo que el rol en la regulación de la antracnosis mediante los *lncRNAs* seleccionados podría ser tejido-específico. Por ello, se sugiere realizar ensayos de infección sobre otros tejidos infectados, así como también otras etapas del ciclo de vida de *L. luteus*.

Finalmente, los mecanismos de regulación predichos en este estudio arrojaron que ambos *lncRNAs* y sus *targets*, estarían siendo regulados de manera *trans* y que, además, la probabilidad de interacción directa entre sus secuencias es baja. Por esta razón se sugiere que el mecanismo de regulación que podría estar ocurriendo es el *decoy* o efecto “esponja de miRNAs”, en donde por

competencia endógena de unión a miRNAs, estos lncRNAs se unen y secuestran múltiples secuencias de miRNAs reduciendo la actividad de silenciamiento de estos sobre sus genes *target*, impidiendo la degradación y promoviendo la continuación de su traducción (Gareev et al., 2023; Naseer et al., 2024). Sin embargo, para confirmar esta interacción, es necesario un estudio más profundo de miRNAs en *L. luteus* C98, su asociación a la antracnosis y lncRNAs.

En conclusión, estos antecedentes forman parte de los primeros avances en el entendimiento de la regulación de la resistencia a la antracnosis desde la perspectiva de lncRNAs en *L. luteus* ante *C. lupini*, lo que fomenta la investigación de lncRNAs como posibles marcadores moleculares de resistencia y el desarrollo de nuevas herramientas moleculares para un control y monitoreo más sustentable de la enfermedad (Bigini et al., 2021; Tibebu & Nuh, 2019).

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren una estrecha relación entre lncRNAs y la resistencia a la antracnosis en hipocótilos resistentes de *L. luteus*.

El genotipo C98 presentó un mayor número de genes de lncRNAs diferencialmente expresados relacionados a mecanismos de respuesta inmune ante la infección por *C. lupini*. La anotación funcional de genes *target* de lncRNAs del genotipo C98: *lncRNA25730* y *lncRNA24719*, mostró una activa co-expresión con genes codificantes asociados a respuesta inmune en vías MTI y ETI. En particular, el gen *lncRNA25730* mostró una destacada diferencia de expresión entre genotipos, siendo propuesto como un marcador molecular putativo de resistencia en hipocótilos C98. Sin embargo, para evaluar su aplicabilidad, se sugiere su evaluación en otros tejidos y genotipos de *L. luteus*.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo no rechazarían la hipótesis planteada en este estudio, en donde efectivamente la interacción entre el hongo *C. lupini* y *L. luteus*, generó una expresión diferencial en genes de lncRNAs asociados respuesta inmune, la cual resultó ser predominante en el genotipo resistente C98.

Este estudio es el primer acercamiento al entendimiento de la regulación de la resistencia a la antracnosis de *L. luteus* ante *C. lupini* en el contexto de lncRNAs, conformando así información base para el desarrollo de futuros estudios asociados a resistencia en lupinos, la búsqueda de nuevos marcadores moleculares y la implementación de herramientas biotecnológicas selectivas y sustentables ante el manejo de los cultivos y el control de la enfermedad. Estos avances pondrían llegar a fomentar la producción de este lupino en Chile, logrando diversificar las alternativas de alimentarias de proteína vegetal y promoviendo su uso como tratamiento natural de suelos en rotación, conduciendo así a prácticas agrícolas más sustentables.

7. REFERENCIAS

- Abd-Alla, M. H., Al-Amri, S. M., & El-Enany, A. W. E. (2023). Enhancing Rhizobium–Legume Symbiosis and Reducing Nitrogen Fertilizer Use Are Potential Options for Mitigating Climate Change. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agriculture13112092>
- Adedibu, P. A. (2023). Ecological problems of agriculture: impacts and sustainable solutions. *Science Open*. <https://doi.org/10.14293/PR2199.000145.v1>
- Aerts, N., Pereira Mendes, M., & Van Wees, S. C. M. (2021). Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *Plant Journal*, 105(2), 489–504. <https://doi.org/10.1111/tpj.15124>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. In *Genes* (Vol. 9, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available Online at: <Http://Www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc>.
- Anilkumar, C., Sunitha, N. C., Harikrishna, Devate, N. B., & Ramesh, S. (2022). Advances in integrated genomic selection for rapid genetic gain in crop improvement: a review. In *Planta* (Vol. 256, Issue 5). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03996-y>
- Armijo-Godoy, G., Levicoy, D., Martínez-Hernández, J. E., Rupayan, A., Hernández, S., Carrasco, M., Caligari, P. D., Baroncelli, R., & Salvo-Garrido, H. (2024). Defense mechanisms in *Lupinus luteus* against *Colletotrichum lupini*, involving TIR-NBS-LRR protein, hypersensitive response and phenylpropanoid pathways. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.10.15.618496>
- Aslam, M. M., Waseem, M., Xu, W., Ying, L., Zhang, J., & Yuan, W. (2022). Global Identification of White Lupin lncRNAs Reveals Their Role in Cluster Roots under Phosphorus Deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23169012>
- Assefa, A. T., De Paepe, K., Everaert, C., Mestdagh, P., Thas, O., & Vandesompele, J. (2018). Differential gene expression analysis tools exhibit substandard performance for long non-coding RNA-sequencing data. *Genome Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1466-5>
- Baer, Erik von. (1989). *Lupino, complemento económico en la rotación de cultivos [en línea]*. Temuco: Serie Carillanca. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/34867> (Consultado: 1 de marzo de 2025).

- Barhoom, S., & Sharon, A. (2004). cAMP regulation of “pathogenic” and “saprophytic” fungal spore germination. *Fungal Genetics and Biology*, 41(3), 317–326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.11.011>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Belski, R. (2012). Fiber, Protein, and Lupin-Enriched Foods: Role for Improving Cardiovascular Health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 66, 147–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00004-5>
- Bentham, A. R., de la Concepcion, J. C., Mukhi, N., Zdrzałek, R., Draeger, M., Gorenkin, D., Hughes, R. K., & Banfield, M. J. (2020). A molecular roadmap to the plant immune system. *Journal of Biological Chemistry*, 295(44), 14916–14935. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010852>
- Berger, J. D., Buirchell, B. J., Luckett, D. J., & Nelson, M. N. (2012). Domestication bottlenecks limit genetic diversity and constrain adaptation in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 124(4), 637–652. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1736-z>
- Bhatia, G., Upadhyay, S. K., Upadhyay, A., & Singh, K. (2021). Investigation of long non-coding RNAs as regulatory players of grapevine response to powdery and downy mildew infection. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03059-6>
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). In *Molecular Plant* (Vol. 8, Issue 4, pp. 521–539). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Bigini, V., Camerlengo, F., Botticella, E., Sestili, F., & Savatin, D. V. (2021). Biotechnological resources to increase disease-resistance by improving plant immunity: A sustainable approach to save cereal crop production. In *Plants* (Vol. 10, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10061146>
- Boukid, F., & Pasqualone, A. (2022). Lupine (*Lupinus* spp.) proteins: characteristics, safety and food applications. In *European Food Research and Technology* (Vol. 248, Issue 2, pp. 345–356). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03909-5>
- Bouwmeester, K., & Govers, F. (2009). *Arabidopsis* L-type lectin receptor kinases: Phylogeny, classification, and expression profiles. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4383–4396. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp277>
- Burgos-Díaz, C., Opazo-Navarrete, M., Wandersleben, T., Soto-Añual, M., Barahona, T., & Bustamante, M. (2019). Chemical and Nutritional Evaluation of Protein-Rich Ingredients Obtained

through a Technological Process from Yellow Lupin Seeds (*Lupinus luteus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(4), 508–517. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00768-0>

Caramona, A., Martins, A. M., Seixas, J., & Marto, J. (2024). The use, reuse and valorization of lupin and its industry by-products for dermocosmetics applications. In *Sustainable Chemistry and Pharmacy* (Vol. 38). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101477>

Chakraborty, S., Nguyen, B., Wasti, S. D., & Xu, G. (2019). Plant leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK): Structure, ligand perception, and activation mechanism. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24173081>

Chand Jha, U., Nayyar, H., Mantri, N., & Siddique, K. H. M. (2021). Non-coding RNAs in legumes: Their emerging roles in regulating biotic/abiotic stress responses and plant growth and development. In *Cells* (Vol. 10, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10071674>

Chao, H., Hu, Y., Zhao, L., Xin, S., Ni, Q., Zhang, P., & Chen, M. (2022). Biogenesis, Functions, Interactions, and Resources of Non-Coding RNAs in Plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073695>

Charles, A., Rochette, P., Whalen, J. K., Angers, D. A., Chantigny, M. H., & Bertrand, N. (2017). Global nitrous oxide emission factors from agricultural soils after addition of organic amendments: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 236, 88–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.11.021>

Chataut, G., Bhatta, B., Joshi, D., Subedi, K., & Kafle, K. (2023). Greenhouse gases emission from agricultural soil: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11, 100533. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100533>

Chekanova, J. A. (2015). Long non-coding RNAs and their functions in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 207–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.003>

Chen, C., He, G., Li, J., Perez-Hormaeche, J., Becker, T., Luo, M., Wallrad, L., Gao, J., Li, J., Pardo, J. M., Kudla, J., & Guo, Y. (2023). A salt stress-activated GSO1-SOS2-SOS1 module protects the *Arabidopsis* root stem cell niche by enhancing sodium ion extrusion. *The EMBO Journal*, 42(13). <https://doi.org/10.15252/embj.2022113004>

Chen, S. (2023). Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *IMeta*, 2(2). <https://doi.org/10.1002/imt2.107>

Cook, R., Lupette, J., & Benning, C. (2021). The role of chloroplast membrane lipid metabolism in plant environmental responses. In *Cells* (Vol. 10, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10030706>

De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. J. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 31, Issue 3, pp. 155–168). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>

- Deng, Y., Ning, Y., Yang, D. L., Zhai, K., Wang, G. L., & He, Z. (2020). Molecular Basis of Disease Resistance and Perspectives on Breeding Strategies for Resistance Improvement in Crops. *Molecular Plant*, 13(10), 1402–1419. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2020.09.018>
- Dias, M. D., Pinheiro, V. F., & Café-Filho, A. C. (2016). Impacto da antracnose na produtividade de soja sob controle químico na região norte do Brasil. *Summa Phytopathologica*, 42(1), 18–23. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2114>
- Ding, Z., Tie, W., Fu, L., Yan, Y., Liu, G., Yan, W., Li, Y., Wu, C., Zhang, J., & Hu, W. (2019). Strand-specific RNA-seq based identification and functional prediction of drought-responsive lncRNAs in cassava. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5585-5>
- Eitas, T. K., & Dangl, J. L. (2010). NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 472–477. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2010.04.007>
- Espinosa-Marrón, A., Adams, K., Sinno, L., Cantu-Aldana, A., Tamez, M., Marrero, A., Bhupathiraju, S. N., & Mattei, J. (2022). Environmental Impact of Animal-Based Food Production and the Feasibility of a Shift Toward Sustainable Plant-Based Diets in the United States. In *Frontiers in Sustainability* (Vol. 3). *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/frsus.2022.841106>
- Espinoza, S., Ovalle, C., Zagal, E., Matus, I., Tay, J., Peoples, M. B., & Del Pozo, A. (2012). Contribution of legumes to wheat productivity in Mediterranean environments of central Chile. *Field Crops Research*, 133, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.03.006>
- Fang, H., Liu, X., Dong, Y., Feng, S., Zhou, R., Wang, C., Ma, X., Liu, J., & Yang, K. Q. (2021). Transcriptome and proteome analysis of walnut (*Juglans regia* L.) fruit in response to infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03042-1>
- Fei, W., Yang, S., Hu, J., Yang, F., Qu, G., Peng, D., & Zhou, B. (2020). Research advances of WRINKLED1 (WRI1) in plants. *Functional Plant Biology*, 47(3), 185–194. <https://doi.org/10.1071/FP19225>
- Feng, S., Fang, H., Liu, X., Dong, Y., Wang, Q., & Yang, K. Q. (2021). Genome-wide identification and characterization of long non-coding RNAs conferring resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* in walnut (*Juglans regia*). *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07310-6>
- Fickett, J. W. (1982). Recognition of protein coding regions in DNA sequences. In *Nucleic Acids Research*, 10(17):5303-18. doi: 10.1093/nar/10.17.5303
- Figueiredo, L., Santos, R. B., & Figueiredo, A. (2021). Defense and offense strategies: The role of aspartic proteases in plant–pathogen interactions. In *Biology* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology10020075>

- Fu, X. D. (2014). Non-coding RNA: A new frontier in regulatory biology. In *National Science Review* (Vol. 1, Issue 2, pp. 190–204). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwu008>
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S. H., Tada, Y., Zheng, N., & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature11162>
- Gareev, I., de Jesus Encarnacion Ramirez, M., Goncharov, E., Ivliev, D., Shumadalova, A., Ilyasova, T., & Wang, C. (2023). MiRNAs and lncRNAs in the regulation of innate immune signaling. In *Non-coding RNA Research* (Vol. 8, Issue 4, pp. 534–541). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2023.07.002>
- Geddes, B. A., & Oresnik, I. J. (2016a). The Mechanism of Symbiotic Nitrogen Fixation. (pp. 69–97). https://doi.org/10.1007/978-3-319-28068-4_4
- Giri, M. K., Swain, S., Gautam, J. K., Singh, S., Singh, N., Bhattacharjee, L., & Nandi, A. K. (2014). The *Arabidopsis thaliana At4g13040* gene, a unique member of the AP2/EREBP family, is a positive regulator for salicylic acid accumulation and basal defense against bacterial pathogens. *Journal of Plant Physiology*, 171(10), 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.12.015>
- Glazinska, P., Kulasek, M., Glinkowski, W., Wysocka, M., & Kosiński, J. G. (2020). LuluDB—The Database Created Based on Small RNA, Transcriptome, and Degradome Sequencing Shows the Wide Landscape of Non-coding and Coding RNA in Yellow Lupine (*Lupinus luteus L.*) Flowers and Pods. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00455>
- Gollnow, F., & Lakes, T. (2014). Policy change, land use, and agriculture: The case of soy production and cattle ranching in Brazil, 2001–2012. *Applied Geography*, 55, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2014.09.003>
- Guglas, K., Kołodziejczak, I., Kolenda, T., Kopczyńska, M., Teresiak, A., Sobocińska, J., Bliźniak, R., & Lamperska, K. (2020). YRNAs and YRNA-derived fragments as new players in cancer research and their potential role in diagnostics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 16, pp. 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21165682>
- Guilengue, N., Silva, M. do C., Talhinas, P., Neves-Martins, J., & Loureiro, A. (2022). Subcuticular–Intracellular Hemibiotrophy of *Colletotrichum lupini* in *Lupinus mutabilis*. *Plants*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223028>
- Hamza, M., Basit, A. W., Shehzadi, I., Tufail, U., Hassan, A., Hussain, T., Siddique, M. U., & Hayat, H. M. (2024). Global Impact of Soybean Production: A Review. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 16(2), 12–20. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2024/v16i2357>
- Hane, J. K., Ming, Y., Kamphuis, L. G., Nelson, M. N., Garg, G., Atkins, C. A., Bayer, P. E., Bravo, A., Bringans, S., Cannon, S., Edwards, D., Foley, R., Gao, L. L., Harrison, M. J., Huang, W., Hurgobin, B., Li, S., Liu, C. W., McGrath, A., ... Singh, K. B. (2017). A comprehensive draft

genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant–microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnology Journal*, 15(3), 318–330. <https://doi.org/10.1111/pbi.12615>

He, L., Wu, L., & Li, J. (2024). Sulfated peptides and their receptors: Key regulators of plant development and stress adaptation. In *Plant Communications* (Vol. 5, Issue 6). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.100918>

Hetzl, J., Duttke, S. H., Benner, C., & Chory, J. (2016). Nascent RNA sequencing reveals distinct features in plant transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), 12316–12321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603217113>

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). <https://doi.org/10.3390/ncrna9050048>

Huang, J., Zhou, W., Zhang, X., & Li, Y. (2023). Roles of long non-coding RNAs in plant immunity. In *PLoS Pathogens* (Vol. 19, Issue 5). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011340>

Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C., & Bork, P. (2019). EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>

Ishaq, A. R., El-Nashar, H. A. S., Younis, T., Mangat, M. A., Shahzadi, M., Ul Haq, A. S., & El-Shazly, M. (2022). Genus *Lupinus* (Fabaceae): a review of ethnobotanical, phytochemical and biological studies. In *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 74, Issue 12, pp. 1700–1717). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac058>

Jha, U. C., Nayyar, H., Parida, S. K., Deshmukh, R., von Wettberg, E. J. B., & Siddique, K. H. M. (2022). Ensuring Global Food Security by Improving Protein Content in Major Grain Legumes Using Breeding and ‘Omics’ Tools. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23147710>

Jin, J., Lu, P., Xu, Y., Li, Z., Yu, S., Liu, J., Wang, H., Chua, N. H., & Cao, P. (2021). PLncDB V2.0: A comprehensive encyclopedia of plant long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1489–D1495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa910>

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N., & Clarence Ryan, by A. (2006). Sciences of the USA 11086-11091 PNAS (Vol. 103, Issue 29). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508882103

Kang, Y. J., Yang, D. C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: A fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W12–W16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx428>

- Kaur, S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Davidson, J., Mysore, K. S., & Pandey, A. K. (2023). Editorial: Disease and pest resistance in legume crops. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1166387>
- Kebede, E. (2021). Contribution, Utilization, and Improvement of Legumes-Driven Biological Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. In *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.767998>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Książkiewicz, M., Rychel-Bielska, S., Plewiński, P., Bielski, W., Nuc, M., Kozak, B., Krajewski, P., & Jędrzycka, M. (2022). A successful defense of the narrow-leafed lupin against anthracnose involves quick and orchestrated reprogramming of oxidation–reduction, photosynthesis and pathogenesis-related genes. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12257-7>
- Książkiewicz, M., Rychel-Bielska, S., Plewiński, P., Nuc, M., Irzykowski, W., Jędrzycka, M., & Krajewski, P. (2021). The resistance of narrow-leafed lupin to *diaporthe toxica* is based on the rapid activation of defense response genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms22020574>
- Kumar, N. (2023). *Molecular Marker Techniques: A Potential Approach of Crop Improvement*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-99-1612-2>
- Kung, J. T. Y., Colognori, D., & Lee, J. T. (2013). Long noncoding RNAs: Past, present, and future. In *Genetics* (Vol. 193, Issue 3, pp. 651–669). <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146704>
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- Li, C. W., Su, R. C., Cheng, C. P., Sanjaya, You, S. J., Hsieh, T. H., Chao, T. C., & Chan, M. T. (2011). Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway. *Plant Physiology*, 156(1), 213–227. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174268>
- Li, J., Ma, W., Zeng, P., Wang, J., Geng, B., Yang, J., & Cui, Q. (2014). LncTar: A tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Briefings in Bioinformatics*, 16(5), 806–812. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu048>
- Li, Z., Huang, Y., Shen, Z., Wu, M., Huang, M., Hong, S. B., Xu, L., & Zang, Y. (2024). Advances in functional studies of plant MYC transcription factors. In *Theoretical and Applied Genetics* (Vol. 137, Issue 8). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00122-024-04697-8>
- Liao, Q., Liu, C., Yuan, X., Kang, S., Miao, R., Xiao, H., Zhao, G., Luo, H., Bu, D., Zhao, H., Skogerbø, G., Wu, Z., & Zhao, Y. (2011). Large-scale prediction of long non-coding RNA

functions in a coding-non-coding gene co-expression network. *Nucleic Acids Research*, 39(9), 3864–3878. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1348>

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>

Lichtin, N., Salvo-Garrido, H., Till, B., Caligari, P. D. S., Rupayan, A., Westermeyer, F., & Olivos, M. (2020). Genetic and comparative mapping of *Lupinus luteus* L. highlight syntenic regions with major orthologous genes controlling anthracnose resistance and flowering time. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76197-w>

Linquist, B., Van Groenigen, K. J., Adviento-Borbe, M. A., Pittelkow, C., & Van Kessel, C. (2012). An agronomic assessment of greenhouse gas emissions from major cereal crops. *Global Change Biology*, 18(1), 194–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02502.x>

Liu, C., Dong, X., Xu, Y., Dong, Q., Wang, Y., Gai, Y., & Ji, X. (2021). Transcriptome and DNA Methylome Reveal Insights Into Phytoplasma Infection Responses in Mulberry (*Morus multicaulis* Perr.). *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.697702>

Liu, X., Hao, L., Li, D., Zhu, L., & Hu, S. (2015). Long Non-coding RNAs and Their Biological Roles in Plants. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* (Vol. 13, Issue 3, pp. 137–147). Beijing Genomics Institute. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.003>

López-Urrutia, E., Bustamante Montes, L. P., Ladrón de Guevara Cervantes, D., Pérez-Plasencia, C., & Campos-Parra, A. D. (2019). Crosstalk Between Long Non-coding RNAs, Micro-RNAs and mRNAs: Deciphering Molecular Mechanisms of Master Regulators in Cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00669>

Lovelace, A. H., Dorhmi, S., Hulin, M. T., Li, Y., Mansfield, J. W., & Ma, W. (2023). Effector Identification in Plant Pathogens. In *Phytopathology* (Vol. 113, Issue 4, pp. 637–650). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-22-0337-KD>

Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. In *RNA Biology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 924–933). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>

Ma, N., Sun, P., Li, Z. Y., Zhang, F. J., Wang, X. F., You, C. X., Zhang, C. L., & Zhang, Z. (2024). Plant disease resistance outputs regulated by AP2/ERF transcription factor family. In *Stress Biology* (Vol. 4, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00140-y>

Ma, X., Zhao, F., & Zhou, B. (2022). The Characters of Non-Coding RNAs and Their Biological Roles in Plant Development and Abiotic Stress Response. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23084124>

Macioszek, V. K., Jęcz, T., Ciereszko, I., & Kononowicz, A. K. (2023). Jasmonic Acid as a Mediator in Plant Response to Necrotrophic Fungi. In *Cells* (Vol. 12, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12071027>

- Maere, S., Heymans, K., & Kuiper, M. (2005). BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*, 21(16), 3448–3449. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti551>
- Malik, N. A. A., Kumar, I. S., & Nadarajah, K. (2020). Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>
- Marcec, M. J., Gilroy, S., Poovaiah, B. W., & Tanaka, K. (2019). Mutual interplay of Ca²⁺ and ROS signaling in plant immune response. <https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>
- Mareri, L., Parrotta, L., & Cai, G. (2022). Environmental Stress and Plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23105416>
- Martinez-Hernandez, J. E., Hammoud, Z., de Sousa, A. M., Kramer, F., Monte-Neto, R. L. do, Maracaja-Coutinho, V., & Martin, A. J. M. (2021). Network-Based Approaches Reveal Potential Therapeutic Targets for Host-Directed Antileishmanial Therapy Driving Drug Repurposing. *Microbiology Spectrum*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01018-21>
- Martinez-Hernandez, J. E., Salvo-Garrido, H., Levicoy, D., Caligari, P. D. S., Rupayán, A., Moyano, T., Carrasco, M., Hernandez, S., Armijo-Godoy, G., Westermeyer, F., & Larama, G. (2024). Chromosome-level genome assembly of yellow lupin (*Lupinus luteus*) provides novel insights into genome evolution, crop adaptation and seed protein in the three most cultivated lupins. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4171664/v1>
- Matsumoto, A., & Nakayama, K. I. (2018). Hidden Peptides Encoded by Putative Noncoding RNAs. In *CELL STRUCTURE AND FUNCTION*, 43(1):75-83. doi: 10.1247/csf.18005
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(6), 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Mera M., Espinoza N., Galdames R., Aguilera A., García J. C., Montenegro A. & Alcalde J. M. (2016). Lupino dulce y amargo producción en Chile [en línea]. Temuco, Chile: Boletín INIA. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 326. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6507>
- Mera, M., & Galdames, R. (2007). BOROIA-INIA, PRIMERA VARIEDAD DE LUPINO (*Lupinus albus*) AMARGO EXPORTABLE OBTENIDA EN CHILE Boroia-INIA. *AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE)* 67(3):320-324. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072007000300011>
- Monteiro, A., Santos, S., & Gonçalves, P. (2021). Precision agriculture for crop and livestock farming—Brief review. In *Animals* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11082345>

- Montenegro, J. D. (2022). Gene Co-expression Network Analysis. In D. Edwards (Ed.), *Plant Bioinformatics: Methods and Protocols* (pp. 387–404). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2067-0_19
- Muhammad, T., Zhang, F., Zhang, Y., & Liang, Y. (2019). RNA interference: A natural immune system of plants to counteract biotic stressors. In *Cells* (Vol. 8, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8010038>
- Musco, N., Cutrignelli, M. I., Calabrò, S., Tudisco, R., Infascelli, F., Grazioli, R., Lo Presti, V., Gresta, F., & Chiofalo, B. (2017). Comparison of nutritional and antinutritional traits among different species (*Lupinus albus L.*, *Lupinus luteus L.*, *Lupinus angustifolius L.*) and varieties of lupin seeds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(6), 1227–1241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpn.12643>
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. In *Journal of Biosciences* (Vol. 38, Issue 2, pp. 433–449). <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9302-2>
- Nakayama, T., Shinohara, H., Tanaka, M., Baba, K., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2017). A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in *Arabidopsis* roots. *Science*, 355(6322), 284–286. <https://doi.org/10.1126/science.aai9057>
- Naseer, Q. A., Malik, A., Zhang, F., & Chen, S. (2024). Exploring the enigma: history, present, and future of long non-coding RNAs in cancer. In *Discover Oncology* (Vol. 15, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s12672-024-01077-y>
- Nelson, B. R., Makarewich, C. A., Anderson, D. M., Winders, B. R., Troupes, C. D., Wu, F., Reese, A. L., McAnally, J. R., Chen, X., Kavalali, E. T., Cannon, S. C., Houser, S. R., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2016). Muscle physiology: A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science*, 351(6270), 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.aad4076>
- Nesher, I., Barhoom, S., & Sharon, A. (2008). Cell cycle and cell death are not necessary for appressorium formation and plant infection in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *BMC Biology*, 6, 9. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-9>
- Niu, L., & Wang, W. (2018). Defensive forwards: stress-responsive proteins in cell walls of crop plants. In *Bioinformatics* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1101/2020.02.15.950535>
- Noack, F., Engist, D., Gantois, J., Gaur, V., Hyjazie, B. F., Larsen, A., M’Gonigle, L. K., Missirian, A., Qaim, M., Sargent, R. D., Souza-Rodrigues, E., & Kremen, C. (2024). Environmental impacts of genetically modified crops. *Science*, 385(6712), eado9340. <https://doi.org/10.1126/science.ado9340>
- Nomura, H., Komori, T., Kobori, M., Nakahira, Y., & Shiina, T. (2008). Evidence for chloroplast control of external Ca²⁺-induced cytosolic Ca²⁺ transients and stomatal closure. *Plant Journal*, 53(6), 988–998. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03390.x>

- Ogura, T., Ogihara, J., Sunairi, M., Takeishi, H., Aizawa, T., Olivos-Trujillo, M. R., Maureira-Butler, I. J., & Salvo-Garrido, H. E. (2014). Proteomic characterization of seeds from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Proteomics*, 14(12), 1543–1546. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300511>
- Olivares, J., Bedmar, E. J., & Sanjuán, J. (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. In *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 26, Issue 5, pp. 486–494). <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0293-CR>
- Osorio, C. E., Amiard, V. S. E., Aravena-Calvo, J., Udall, J. A., Doyle, J. J., & Maureira-Butler, I. J. (2018). Chromatographic fingerprinting of *Lupinus luteus* L. (Leguminosae) main secondary metabolites: a case of domestication affecting crop variability. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(4), 1281–1291. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0613-x>
- Osorio, C. E., Del Canto, G., Rupayán, A., Lichtin, N., & Maureira-Butler, I. J. (2019). Root variability among yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) accessions grown at low temperatures in an undisturbed substrate. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 46(3), 302–309. <https://doi.org/10.7764/rcia.v46i3.1942>
- Osorio, C. E., Udall, J. A., Salvo-Garrido, H., & Maureira-Butler, I. J. (2018). Development and characterization of InDel markers for *Lupinus luteus* L. (Fabaceae) and cross-species amplification in other Lupin species. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 44–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.002>
- Ozata, D. M., Gainetdinov, I., Zoch, A., O’Carroll, D., & Zamore, P. D. (2019). PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nature Reviews Genetics*, 20(2), 89–108. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>
- Pandey, A. K., Kumar, A., Mbeyagala, E. K., Barbetti, M. J., Basandrai, A., Basandrai, D., Nair, R. M., & Lamichhane, J. R. (2023). Anthracnose Resistance in Legumes for Cropping System Diversification. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 42(4), 177–216. <https://doi.org/10.1080/07352689.2023.2228122>
- Pandey, S. P., & Somssich, I. E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*, 150(4), 1648–1655. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138990>
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science*, 318(5847):113-6. doi: 10.1126/science.1147113
- Parra-González, L. B., Aravena-Abarzúa, G. A., Navarro-Navarro, C. S., Udall, J., Maughan, J., Peterson, L. M., Salvo-Garrido, H. E., & Maureira-Butler, I. J. (2012). Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-425>
- Pearce, G., Yamaguchi, Y., Barona, G., & Ryan, C. A. (2010). A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(33), 14921–14925. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007568107>

Pertea, M., & Pertea, G. (2020). GFF Utilities: GffRead and GffCompare. *F1000Research*, 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.23297.1>

Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>

Piro, R. M., & Marsico, A. (2019). Network-Based Methods and Other Approaches for Predicting lncRNA Functions and Disease Associations. In X. Lai, S. K. Gupta, & J. Vera (Eds.), *Computational Biology of Non-Coding RNA: Methods and Protocols* (pp. 301–321). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8982-9_12

Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gki442>

Raza, A., Zahra, N., Hafeez, M. B., Ahmad, M., Iqbal, S., Shaukat, K., & Ahmad, G. (2020). Nitrogen Fixation of Legumes: Biology and Physiology. In M. Hasanuzzaman, S. Araújo, & S. S. Gill (Eds.), *The Plant Family Fabaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses* (pp. 43–74). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_3

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. <http://genomebiology.com/2010/11/3/R25>

RStudio, T. (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL. <http://www.rstudio.com/>

Samad, S., Gentzbittel, L., Bondarenko, E., Rickauer, M., Volkova, P., & Ben, C. (2023). Insights into the Pathogenic Mechanisms and the Control Strategies of Anthracnose in Lupins – A Comprehensive Review. <https://doi.org/10.20944/preprints202312.2132.v1>

Samarfard, S., Ghorbani, A., Karbanowicz, T. P., Lim, Z. X., Saedi, M., Fariborzi, N., McTaggart, A. R., & Izadpanah, K. (2022). Regulatory non-coding RNA: The core defense mechanism against plant pathogens. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 359, pp. 82–94). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.09.014>

Seo, J.S., Sun, H.X., Park, B.S., Huang, C.H., Yeh, S.D., Jung, C., & Chua N.H. (2017). ELF18-INDUCED LONG-NONCODING RNA Associates with Mediator to Enhance Expression of Innate Immune Response Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 29(5):1024-1038. doi: 10.1105/tpc.16.00886.

- Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., & Smith, D. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 667546. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>
- Shakoor, A., Shakoor, S., Rehman, A., Ashraf, F., Abdullah, M., Shahzad, S. M., Farooq, T. H., Ashraf, M., Manzoor, M. A., Altaf, M. M., & Altaf, M. A. (2021). Effect of animal manure, crop type, climate zone, and soil attributes on greenhouse gas emissions from agricultural soils—A global meta-analysis. *Journal of Cleaner Production*, 278, 124019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124019>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Siddiqui, Y & Ali, A. (2014). Chapter 11: *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In *Post harvest Decay: Control Strategies* Ed. Silvia Bautista Baños. Academic press (pp. 337–364). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00011-9>
- Singh, A., Vivek, A. T., & Kumar, S. (2021). AlnC: An extensive database of long noncoding RNAs in angiosperms. *PLoS ONE*, 16 (4 April). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247215>
- Singh, S., & Mehrotra, R. (2024). *Plant Elicitor Peptides*. Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-97-6374-0>
- Stam, M., Belele, C., Ramakrishna, W., Dorweiler, J. E., Bennetzen, J. L., & Chandler, V. L. (2002). The Regulatory Regions Required for B Paramutation and Expression Are Located Far Upstream of the Maize b1 Transcribed Sequences. *Genetics*, 162(2):917-30. doi: 10.1093/genetics/162.2.917
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 96–118). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D., & Kim, S. K. (2003). A Gene-Coexpression Network for Global Discovery of Conserved Genetic Modules. *Science*, 302(5643):249-55. doi: 10.1126/science.1087447
- Suarez, A., & Gwozdz, W. (2023). On the relation between monocultures and ecosystem services in the Global South: A review. *Biological Conservation*, 278, 109870. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2022.109870>
- Swinnen, G., De Meyer, M., Pollier, J., Molina-Hidalgo, F. J., Ceulemans, E., Venegas-Molina, J., De Milde, L., Fernández-Calvo, P., Ron, M., Pauwels, L., & Goossens, A. (2022). The basic helix–loop–helix transcription factors MYC1 and MYC2 have a dual role in the regulation of

constitutive and stress-inducible specialized metabolism in tomato. *New Phytologist*, 236(3), 911–928. <https://doi.org/10.1111/nph.18379>

Szcześniak, M. W., Bryzghalov, O., Ciomborowska-Basheer, J., & Makałowska, I. (2019). CANTATAdb 2.0: Expanding the Collection of Plant Long Noncoding RNAs. In J. A. Chekanova & H.-L. V Wang (Eds.), *Plant Long Non-Coding RNAs: Methods and Protocols* (pp. 415–429). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9045-0_26

Tena, G., Boudsocq, M., & Sheen, J. (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), 519–529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.006>

Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>

Tian, L., Hossbach, B. M., & Feussner, I. (2024). Small size, big impact: Small molecules in plant systemic immune signaling. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 81). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102618>

Tibebu, B., & Nuh, B. (2019). Biotechnological tools for detection, identification and management of plant diseases. *African Journal of Biotechnology*, 18(29), 797–807. <https://doi.org/10.5897/ajb2018.16591>

Tomita, T., Kato, M., Mishima, T., Matsunaga, Y., Sanjo, H., Ito, K. ichi, Minagawa, K., Matsui, T., Oikawa, H., Takahashi, S., Takao, T., Iwai, N., Mino, T., Takeuchi, O., Maru, Y., & Hiratsuka, S. (2021). Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23969-1>

Tsuwamoto, R., Fukuoka, H., & Takahata, Y. (2008). GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *Plant Journal*, 54(1), 30–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03395.x>

van de Noort, M. (2024). Lupin: An Important Protein and Nutrient Source. *Sustainable Protein Sources*, 219–239. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91652-3.00028-9>

van Dijk, M., Morley, T., Rau, M. L., & Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food*, 2(7), 494–501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>

Wang, K., Guo, Q., Froehlich, J. E., Hersh, H. L., Zienkiewicz, A., Howe, G. A., & Benning, C. (2018). Two abscisic acid-responsive plastid lipase genes involved in jasmonic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 30(5), 1006–1022. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00250>

Wang, X., Fan, H., Wang, B., & Yuan, F. (2023). Research progress on the roles of lncRNAs in plant development and stress responses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1138901>

Wang, Z., Xing, S., Li, M., Zhang, Q., Yang, Q., Xu, P., Song, B., Shang, P., Yang, M., Du, C., Chen, J., Liu, S., & Zhang, S. (2023). Soybean WRINKLED1 protein GmWRI1a promotes flowering under long-day conditions via regulating expressions of flowering-related genes. *Plant Science*, 337, 111865. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2023.111865>

Wekesa, J. S., Meng, J., & Luan, Y. (2020). A deep learning model for plant lncRNA-protein interaction prediction with graph attention. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(5), 1091–1102. <https://doi.org/10.1007/s00438-020-01682-w>

Weller, S., Kraus, D., Ayag, K. R. P., Wassmann, R., Alberto, M. C. R., Butterbach-Bahl, K., & Kiese, R. (2015). Methane and nitrous oxide emissions from rice and maize production in diversified rice cropping systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 101(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/s10705-014-9658-1>

Wucher, V., Legeai, F., Hédan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., Jagannathan, V., Cadieu, E., David, A., Lohi, H., Cirera, S., Fredholm, M., Botherel, N., Leegwater, P. A. J., Le Béguet, C., Fieten, H., Johnson, J., Alföldi, J., André, C., ... Derrien, T. (2017). FEELnc: A tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 45(8). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1306>

Xia, Y., Ma, Z., Qiu, M., Guo, B., Zhang, Q., Jiang, H., Zhang, B., Lin, Y., Xuan, M., Sun, L., Shu, H., Xiao, J., Ye, W., Wang, Y., Wang, Y., Dong, S., Tyler, B. M., & Wang, Y. (2020). N-glycosylation shields *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a specific host aspartic protease. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012149117/-DCSupplemental>

Yang, M., Zhou, C., Yang, H., Kuang, R., Liu, K., Huang, B., & Wei, Y. (2022). Comparative transcriptomics and genomic analyses reveal differential gene expression related to *Colletotrichum brevisporum* resistance in papaya (*Carica papaya* L.). *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1038598>

Yazdinejad, A., Zolfaghari, B., Azmoodeh, A., Dehghantanha, A., Karimipour, H., Fraser, E., Green, A. G., Russell, C., & Duncan, E. (2021). A review on security of smart farming and precision agriculture: Security aspects, attacks, threats and countermeasures. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(16). <https://doi.org/10.3390/app11167518>

Yin, H., Zhang, X., Zhang, B., Luo, H., & He, C. (2019). Revealing the dominant long noncoding RNAs responding to the infection with *Colletotrichum gloeosporioides* in *Hevea brasiliensis*. *Biology Direct*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13062-019-0235-z>

Zamora-Ballesteros, C., Martín-García, J., Suárez-Vega, A., & Diez, J. J. (2022). Genome-wide identification and characterization of *Fusarium circinatum*-responsive lncRNAs in *Pinus radiata*. *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08408-9>

Zhang, J., Li, J., Saeed, S., Batchelor, W. D., Alariqi, M., Meng, Q., Zhu, F., Zou, J., Xu, Z., Si, H., Wang, Q., Zhang, X., Zhu, H., Jin, S., & Yuan, D. (2022a). Identification and Functional Analysis of lncRNA by CRISPR/Cas9 During the Cotton Response to Sap-Sucking Insect Infestation. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.784511>

- Zhang, L., Liu, J., Cheng, J., Sun, Q., Zhang, Y., Liu, J., Li, H., Zhang, Z., Wang, P., Cai, C., Chu, Z., Zhang, X., Yuan, Y., Shi, Y., & Cai, Y. (2022b). lncRNA7 and lncRNA2 modulate cell wall defense genes to regulate cotton resistance to *Verticillium wilt*. *Plant Physiology*, 189(1), 264–284. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac041>
- Zhang, X., Wang, W., Zhu, W., Dong, J., Cheng, Y., Yin, Z., & Shen, F. (2019). Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>
- Zhao, L., Wang, J., Li, Y., Song, T., Wu, Y., Fang, S., Bu, D., Li, H., Sun, L., Pei, D., Zheng, Y., Huang, J., Xu, M., Chen, R., Zhao, Y., & He, S. (2021). NONCODEV6: An updated database dedicated to long non-coding RNA annotation in both animals and plants. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D165–D171. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1046>
- Zhao, X., Gan, L., Yan, C., Li, C., Sun, Q., Wang, J., Yuan, C., Zhang, H., Shan, S., & Liu, J. N. (2019). Genome-wide identification and characterization of long non-coding RNAs in peanut. *Genes*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/genes10070536>
- Zhao, X., Li, F., Ali, M., Li, X., Fu, X., & Zhang, X. (2024). Emerging roles and mechanisms of lncRNAs in fruit and vegetables. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae046/7613407>
- Zhou, B., Ji, B., Liu, K., Hu, G., Wang, F., Chen, Q., Yu, R., Huang, P., Ren, J., Guo, C., Zhao, H., Zhang, H., Zhao, D., Li, Z., Zeng, Q., Yu, J., Bian, Y., Cao, Z., Xu, S., ... Wang, J. (2021). EVLncRNAs 2.0: An updated database of manually curated functional long non-coding RNAs validated by low-throughput experiments. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D86–D91. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1076>
- Zhou, R., Dong, Y., Wang, C., Liu, J., Liang, Q., Meng, X., Lang, X., Xu, S., Liu, W., Zhang, S., Wang, N., Yang, K. Q., & Fang, H. (2023). lncRNA109897-JrCCR4-JrTLP1b forms a positive feedback loop to regulate walnut resistance against anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Horticulture Research*, 10(6). <https://doi.org/10.1093/hr/uhad086>
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2007.11.003>