

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍAS VIRTUALES**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**CLAUDIA GISSELA OÑA ARIAS**

**MAYO 2025**

**Datos Generales****Título el proyecto**

Evaluación de la Expresión Génica Relacionada con la Senescencia Floral en Dos Cultivares de Gypsophila L. mediante Secuenciación RNA-seq.

**Autor**

Claudia Gissela Oña Arias  
1726338740

**Director**

PhD. Francisco Flores

**Datos de la organización o institución**

Pontificia Universidad Católica Del Ecuador  
GENVIV breeding by ESMERALDA

## Índice general

Datos Generales .....	2
Título el proyecto .....	2
Autor .....	2
Director .....	2
Datos de la organización o institución .....	2
Declaración de Derechos de Autor .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Índice de Figuras .....	4
Índice de Tablas .....	4
Resumen .....	5
Abstract.....	5
Introducción .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Revisión de la literatura .....	6
Objetivos.....	7
Objetivo general .....	7
Objetivos específicos.....	7
Metodología .....	7
Resultados.....	9
Resultados de concentración y calidad de las muestras .....	9
Resultados del Secuenciamiento RNA-Seq .....	10
Estadísticas de Alineamiento con SAMTOOLS .....	11
PCA tomando en cuenta la matriz de FeatureCounts y agrupando por estado fenológico .....	12
PCA tomando en cuenta la matriz de FeatureCounts y agrupando por variedad .....	12
Genes diferencialmente expresados .....	13
Genes relacionados a la senescencia floral .....	14
Genes relacionados a la síntesis del etileno .....	14
Comparación Variedad A en botón vs flor .....	14
Comparación Variedad C en botón vs flor.....	15
Comparación Variedad A vs Variedad C en flor .....	15
Comparación Variedad A vs Variedad C en botón.....	16
Genes relacionados a la señal de transducción de etileno.....	17
Comparación Variedad A en botón vs flor .....	17
Comparación Variedad C en botón vs flor.....	18

Comparación Variedad A vs Variedad C en flor .....	19
Comparación Variedad A vs Variedad C en botón .....	20
Análisis de los resultados .....	23
Conclusiones y Recomendaciones .....	25
Bibliografía .....	25
ANEXO 1 .....	27

### Índice de Figuras

Figura 1: PCA agrupado por estado fenológico Botón (círculos azules) y Flor (triángulos rojos).....	12
Figura 2: PCA agrupado por variedad. A (círculos azules) C (triángulos rojos) .....	13
Figura 3: Genes diferencialmente expresados .....	13
Figura 4: Heatmap de los genes relacionados a la síntesis del etileno .....	17
Figura 5: Heatmap de los genes relacionados con la transducción de la señal del etileno.....	22

### Índice de Tablas

Tabla 1: Diseño experimental.....	7
Tabla 2: Resultados concentración y calidad de las muestras .....	10
Tabla 3: Reporte del secuenciamiento RNA-Seq.....	10
Tabla 4: Resumen SAMTOOLS lecturas.....	11
Tabla 5: Resumen SAMTOOLS bases.....	11
Tabla 6: Genes relacionados a la senescencia floral en Variedad A en botón vs Flor .....	14
Tabla 7: Genes relacionados a la senescencia floral en Variedad C en botón vs Flor.....	14
Tabla 8: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad A en botón vs flor .....	14
Tabla 9: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad C en botón vs flor .....	15
Tabla 10: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad A vs Variedad C en flor .....	15
Tabla 11: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad A vs Variedad C en botón.....	16
Tabla 12: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad A en botón vs flor .....	17
Tabla 13: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad C en botón vs flor .....	18
Tabla 14: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad A vs Variedad C en flor.....	19
Tabla 15: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad A vs Variedad C en botón.....	20

## Resumen

El estudio analizó los mecanismos moleculares de la senescencia floral en *Gypsophila* L. centrándose en la regulación por etileno mediante RNA-seq. Se compararon dos cultivares (A y C) en estados fenológicos de botón y flor abierta, identificando genes clave en la biosíntesis (ACS, ACO), percepción (ETR1/ERS) y señalización (EIL1/2, ERF) del etileno. La variedad A mostró mayor longevidad debido a la subexpresión de receptores (ERS) y reguladores (EIL1/2), junto a un balance entre activadores y represores de ERF. En contraste, la variedad C presentó sobreexpresión de genes relacionados a la senescencia (ACO, ERF), acelerando su deterioro. Los genes *Gpan04g00338* (represor de ACS) y *Gpan04g00666* (represor de EIL1/2) surgieron como posibles marcadores para breeding.

## Abstract

This study explored the molecular mechanisms of floral senescence in *Gypsophila* L, focusing on ethylene regulation via RNA-seq. Two cultivars (A and C) were compared at bud and open-flower stages, identifying key genes in ethylene biosynthesis (ACS, ACO), perception (ETR1/ERS), and signaling (EIL1/2, ERF). Cultivar A exhibited extended longevity due to downregulation of receptors (ERS) and regulators (EIL1/2), alongside a balanced ERF activator-repressor dynamic. In contrast, cultivar C showed overexpression of senescence-promoting genes (ACO, ERF), hastening senescence. Genes *Gpan04g00338* (ACS repressor) and *Gpan04g00666* (EIL1/2 repressor) may emerged as breeding markers.

## Introducción

La senescencia floral es un proceso biológico que afecta a las flores de manera significativa, reduciendo su calidad y longevidad, lo que impacta directamente la industria floral. En particular, especies como *Gypsophila* L., conocida por su uso ornamental, experimentan una rápida pérdida de calidad después de la cosecha, lo que limita su durabilidad en florero y su valor comercial. La mejora de la vida útil de las flores cortadas es un desafío importante para los productores, quienes buscan estrategias eficaces para mantener la frescura de las flores durante más tiempo (Shahri & Tahir, 2014). Un factor clave en la regulación de la senescencia floral es el etileno, una hormona que controla varios aspectos de la senescencia, incluyendo la caída de pétalos y la descomposición de las células vegetales. La comprensión de cómo el etileno regula estos procesos en especies como *Gypsophila* L. puede ofrecer soluciones para mejorar la longevidad de las flores.

La investigación sobre la senescencia floral y la influencia del etileno en este proceso se ha intensificado en los últimos años, con la intención de comprender a nivel molecular los mecanismos que determinan la duración de las flores en florero. En este contexto, el uso de tecnologías avanzadas como la secuenciación de ARN (RNA-seq) permite un análisis detallado de la expresión génica a lo largo de la senescencia. RNA-seq ofrece una resolución sin precedentes, ya que permite detectar y cuantificar los transcritos génicos de manera global, lo que facilita la identificación de genes relacionados con procesos complejos como la senescencia floral (Martin et al., 2013). Este enfoque, que ha sido ampliamente utilizado en diversas especies vegetales, permite identificar variaciones en la expresión de genes clave que podrían estar involucrados en la longevidad de las flores, lo que abre la posibilidad de intervenir en estos procesos a nivel genético.

En el caso de *Gypsophila* L., hay pocos estudios sobre la variabilidad genética precisa entre cultivares y cómo estos responden al proceso de senescencia. Esto dificulta la selección de variedades con mayor resistencia a la senescencia y una vida útil más prolongada. Para abordar esta problemática, el análisis detallado de la expresión génica en diferentes cultivares de *Gypsophila* L. mediante RNA-seq es importante. Este enfoque no solo contribuirá a la comprensión de los mecanismos moleculares detrás de la senescencia floral, sino que también proporcionará información valiosa para el mejoramiento genético de la especie, permitiendo la creación de cultivares con mayor durabilidad en florero (Hetzl et al., 2016).

## Revisión de la literatura

La senescencia floral es un proceso biológico complejo que involucra varios mecanismos moleculares y hormonales, siendo uno de los más relevantes la acción del etileno. Esta hormona regula diferentes etapas del envejecimiento floral, como la apertura de flores, la caída de pétalos y la descomposición de los tejidos vegetales (Martin et al., 2013). En el caso de *Gypsophila* L. conocida por su uso ornamental, la senescencia rápida post-cosecha limita su vida útil, lo que representa un desafío para la industria floral. Los mecanismos subyacentes de este proceso se exploran principalmente a través de la expresión génica durante el desarrollo floral y la senescencia (Shahri & Tahir, 2014).

Estudios recientes que utilizaron (RNA-seq) para investigar la senescencia floral en *Gypsophila* L. han revelado interesantes resultados. En un análisis realizado con diferentes

cultivares, incluidos tipos silvestres y variedades comerciales se identificaron 23,449 genes expresados. Entre estos, existen genes involucrados en el proceso de senescencia, lo que sugiere que pueden jugar un papel clave en la regulación de la duración de la flor en el florero (Fanourakis et al., 2013).

En particular, genes como Gpan01g00371 y Gpan01g01321 que están asociados con la senescencia, como el “senescence-related gene 1” (SRG1), muestran una mayor expresión en la etapa de flor completamente abierta en un cultivar comercial, lo que indica un proceso de senescencia acelerado en este cultivar comparado con el tipo silvestre. Estos genes son candidatos para la regulación de la senescencia floral y podrían ser objetivos para intervenciones genéticas para mejorar la vida útil de las flores.

Por otro lado, el análisis también identificó genes asociados con la señalización del etileno, como los “ethylene response sensor” (ERS), “ethylene insensitive 3-like” (EIL) y “ethylene-responsive transcription factors” (ERF). En los cultivares comerciales la expresión de estos genes fue significativamente más baja, sugiriendo que la insensibilidad al etileno podría ser un factor clave en el retraso de la senescencia floral (Shahri & Tahir, 2014).

Este patrón de insensibilidad al etileno en *Gypsophila* L. podría explicar la retención de los pétalos durante la senescencia, prolongando su vida útil en el florero. Además, el análisis comparativo de las rutas de biosíntesis y transducción de señales de etileno entre *Gypsophila* L. y otras especies, como *Arabidopsis thaliana* y *Rosa chinensis*, ha mostrado una reducción significativa en el número de genes de la familia ERF en *Gypsophila* L., lo que refuerza la hipótesis de que la senescencia retardada en estos cultivares está relacionada con la disfunción de los receptores de etileno (Li & Gao, 2022). Estos hallazgos sugieren que el estudio de la señalización del etileno y la senescencia floral en *Gypsophila* L. ofrece un potencial significativo para mejorar la longevidad de las flores a través de la manipulación genética de la respuesta a etileno y otros mecanismos moleculares involucrados en la senescencia.

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la expresión genética en dos cultivares de *Gypsophila* L. para identificar genes asociados con el proceso de senescencia floral.

### Objetivos específicos

- Obtener secuencias del transcriptoma de cultivares de *Gypsophila* L. con diferentes fenotipos de senescencia floral mediante la extracción de ARN y secuenciación de alto rendimiento.
- Comparar el perfil de expresión génica de los dos cultivares de *Gypsophila* L. para identificar genes diferencialmente expresados.

### Metodología

Se recolectaron muestras de dos cultivares de *Gypsophila* L. en dos estados fenológicos, flor en botón y flor abierta, con tres réplicas por cada estado. Siguiendo el siguiente diseño experimental:

Tabla 1: Diseño experimental

Muestra	Variiedad	Estado fenológico	Réplica
AB.P	A	Botón	Primera
AB.S	A	Botón	Segunda
AB.T	A	Botón	Tercera
AF.P	A	Flor	Primera
AF.S	A	Flor	Segunda
AF.T	A	Flor	Tercera
CB.P	C	Botón	Primera
CB.S	C	Botón	Segunda
CB.T	C	Botón	Tercera
CF.P	C	Flor	Primera
CF.S	C	Flor	Segunda
CF.T	C	Flor	Tercera

Se seleccionaron 20 botones o 15 flores por muestra, que se colocaron en un mortero congelado y autoclavado. Tras añadir nitrógeno líquido y macerar cuidadosamente, se agregó 1000 µL de Trizol-Reagent para continuar la extracción de ARN. La muestra fue centrifugada, y el ARN obtenido se purificó mediante el uso de cloroformo y etanol al 70%, asegurando su integridad antes de resuspenderlo en agua libre de nucleasas. La calidad y concentración del ARN se evaluó utilizando Nanodrop y se midió con bioanalyzer de la empresa BMK.

La secuenciación de ARN lo llevó a cabo la empresa BMK en la plataforma Illumina NovaSeq, con 6 GB de datos generados por muestra. Durante la secuenciación, se emplearon métodos de análisis de fragmentos de 150 pb en pares (PE150). Las secuencias limpias obtenidas se alinearon con STAR, un alineador eficiente para datos de RNA-Seq, utilizando un genoma de referencia haploide (China National Genbank, 2022) optimizado para muestras tetraploides. Se emplearon parámetros clave como runThreadN 8 para aprovechar el procesamiento paralelo, genomeDir para especificar la ubicación del índice del genoma, y readFilesIn para definir los archivos FASTQ comprimidos de lecturas pareadas. Además, se utilizó readFilesCommand zcat para descomprimir los archivos y outFilePrefix para establecer el prefijo de los archivos de salida (Anexo 1).

El archivo BAM resultante se generó en formato ordenado por coordenadas (outSAMtype BAM SortedByCoordinate), lo que facilitó su posterior análisis. Parámetros como outFilterMultimapNmax 50 permitieron manejar regiones repetitivas, mientras que --outFilterScoreMinOverLread 0.5 y outFilterMatchNminOverLread 0.5 ajustaron los filtros de alineación para muestras complejas. Finalmente, alignIntronMax 50000 y alignMatesGapMax 50000 aseguraron la captura de grandes distancias entre pares de lecturas (Anexo 1).

Tras la alineación, se generó un archivo BAM ordenado por coordenadas, que se analizó con Samtools para obtener estadísticas detalladas de alineamiento. Estas métricas incluyeron el porcentaje de lecturas mapeadas, la cobertura y la distribución de las lecturas a lo largo del genoma. Además, se añadió información del grupo de lecturas (outSAMattrRGline) para identificar las muestras y condiciones experimentales, y se limitó el uso de RAM durante la ordenación del BAM (limitBAMsortRAM 2800000000) para evitar exceder los recursos del sistema (Anexo 1).

Después de corroborar la correcta alineación con STAR, se realizó la cuantificación de las lecturas utilizando FeatureCounts, una herramienta diseñada para contar las lecturas alineadas que se asignan a características genómicas específicas, como exones o genes. En el script utilizado, se especificaron parámetros clave como -a para definir el archivo de anotaciones en formato GFF (Gpan\_WG.gff), -o para especificar el archivo de salida (featurecounts\_matrix.txt), y -Q 1 para filtrar lecturas con calidad de mapeo (MQ) igual a 0, mejorando la precisión de los conteos. Además, se emplearon -T 8 para paralelizar el proceso con 8 hilos, -t exon para contar lecturas alineadas con exones, y -g gene\_id para agrupar los conteos por gen. Los parámetros -p, -B y -C aseguraron que solo se contaran lecturas emparejadas correctamente y se excluyeran aquellas con mapeo ambiguo o múltiple, lo que es crucial para la precisión en datos paired-end. Además, se excluyeron lecturas con MQ = 0 y se consideraron solo lecturas emparejadas y únicamente mapeadas a una ubicación (Anexo 1).

Posteriormente en R, se realizó un análisis de expresión génica a partir de la matriz de conteos generada por FeatureCounts. Primero, se creó un diseño experimental que organizó las muestras según la variedad (A o C), estado fenológico (B o F) y la réplica (P, S, T). Luego, se cargó la matriz de conteos y se creó un objeto DESeq2 que incluyó el diseño experimental y la matriz de conteos. Se filtraron los genes con conteos mayores a 1 y se normalizaron los datos para permitir comparaciones entre muestras. A continuación, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para visualizar la variabilidad entre muestras, considerando tanto el estado fenológico como la variedad. Esto permitió identificar patrones de agrupamiento y diferencias entre las condiciones experimentales (Anexo 1).

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de expresión diferencial utilizando DESeq2, comparando las variedades y estados fenológicos. Se generaron resultados para cuatro comparaciones clave:

- (1) variedad A en botón (B) vs variedad A en flor (F),
- (2) variedad C en botón (B) vs variedad C en flor (F),
- (3) variedad A vs variedad C en flor (F), y
- (4) variedad A vs variedad C en botón (B).

Los resultados se filtraron para identificar genes significativamente regulados (con un valor de  $p_{adj} < 0.05$  y un  $\log_2\text{FoldChange}$  absoluto mayor a 1), y se clasificaron como "sobreexpresado", "subexpresado", "no significativo" o "no alterado". Finalmente, se buscaron genes específicos relacionados con la síntesis y la señalización del etileno, identificados previamente en el genoma de referencia anotado China National GeneBank (2022) y según Li, F., & Gao (2022). Estos genes se filtraron en cada comparación para evaluar su expresión diferencial. Y se realizaron heatmaps para una mejor visualización (Anexo 1).

## **Resultados**

### **Resultados de concentración y calidad de las muestras**

La calidad del ARN se evaluó utilizando un Nanodrop garantizando que tuviera una concentración mayor a 200ng/μl y una calidad A260/A280 entre 1.8 y 2.0, y A260/230 de 2.0. Adicional, se midió con bioanalyzer de la empresa BMK, obteniendo un RIN mínimo de 3.3 en todas las muestras y concentraciones mayores a 200 ng/μl (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados concentración y calidad de las muestras

Muestra	Concentración de ARN (ng/μl)	Total(μg)	RIN
AF.P	1098.1	49.41	3.9
AF.S	608.1	27.36	3.3
AF.T	676.5	30.44	3.9
CB.P	1494.7	67.26	3.6
CB.S	1082.2	48.70	3.5
CB.T	1591.5	71.62	3.5
AB.P	1969.9	88.65	3.6
AB.S	1386.1	62.37	3.6
AB.T	1756.6	79.05	3.4
CF.P	621.5	27.97	3.9
CF.S	383.0	7.66	3.4
CF.T	234.8	4.70	3.9

### Resultados del Secuenciamiento RNA-Seq

El informe de secuenciación enviado por BMK presentó los resultados de calidad de las lecturas de ARN mensajero (mRNA) de las 12 muestras. Se obtuvieron un total de 272.08 millones de lecturas, equivalentes a 81.12 Gb de datos, con un promedio de 6.76 Gb por muestra, cumpliendo con los requisitos mínimos de cobertura. Para todas las muestras se obtuvo más del 94.82% de bases con calidad Q30 o superior, lo que indica una tasa de error muy baja. Las gráficas de calidad mostraron valores de calidad consistentemente altos, aunque con una leve disminución al final de las lecturas, algo común en secuenciación de alto rendimiento. El contenido de GC varió entre 45% y 51.76%, reflejando posibles diferencias biológicas entre las muestras. En general, los datos son de alta calidad, con cobertura adecuada y sin señales de contaminación (Tabla 3).

Tabla 3: Reporte del secuenciamiento RNA-Seq

Muestra	Obtained Reads	Obtained Base (Gb)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
AF.P	21,784,476	6.47	98.34	95.44	46.52
AF.S	23,435,095	6.96	98.57	95.98	46.91
AF.T	23,864,152	7.12	98.51	95.90	46.41
CB.P	22,176,205	6.62	98.13	95.00	45.36
CB.S	22,982,371	6.86	98.11	94.93	45.75
CB.T	22,026,451	6.57	98.09	94.82	45.95
AB.P	21,669,008	6.47	98.22	95.14	45.93
AB.S	23,207,184	6.94	98.05	94.88	45.24
AB.T	22,909,714	6.84	98.11	94.95	45.15
CF.P	27,332,489	8.12	99.00	96.96	47.54
CF.S	18,039,890	5.38	98.63	96.17	51.76
CF.T	22,655,165	6.77	98.53	95.93	47.00

## Estadísticas de Alineamiento con SAMTOOLS

Tras la secuenciación, las lecturas se alinearon contra el genoma de referencia utilizando STAR, y se generaron estadísticas de alineamiento con SAMTOOLS. En todas las muestras, el porcentaje de lecturas mapeadas fue del 100%, lo que indica que todas las lecturas se alinearon correctamente con el genoma. Sin embargo, el porcentaje de lecturas con calidad de mapeo cero (ZER MQ) varió entre 0.4% y 7.8%, siendo más alto en las muestras CF.S (7.8%) y CF.P (6.5%). Estas lecturas con calidad de mapeo cero fueron excluidas en análisis posteriores para mejorar la precisión de los resultados. La longitud promedio de las lecturas fue de 149-150 pb, y el porcentaje de bases mapeadas osciló entre 80.3% y 90.8%, siendo más alto en las muestras CF.S (90.8%) y CF.P (86.3%).

Tabla 4: Resumen SAMTOOLS lecturas

Muestra	Lecturas				
	Total	No primaria	No primaria	Mapeadas	ZER MQ
AF.P	31,750,745	18,064,378	57%	100%	4.9%
AF.S	34,814,227	22,815,795	66%	100%	5.8%
AF.T	34,729,880	18,960,582	55%	100%	4.6%
AB.P	30,413,213	13,805,310	45%	100%	3.7%
AB.S	31,166,176	3,598,909	12%	100%	0.4%
AB.T	30,922,674	5,114,410	17%	100%	0.8%
CF.P	41,207,120	30,782,717	75%	100%	6.5%
CF.S	27,647,161	32,136,434	116%	100%	7.8%
CF.T	33,185,952	19,937,843	60%	100%	4.7%
CB.P	30,181,595	5,786,388	19%	100%	1.1%
CB.S	31,886,084	13,423,498	42%	100%	3.4%
CB.T	30,730,844	13,737,874	45%	100%	3.5%

En cuanto a las métricas específicas por muestra, se observó que las muestras AF.S y AF.T tuvieron un alto número de lecturas no primarias con 22,815,795 y 18,960,582 respectivamente, lo que podría indicar la presencia de regiones repetitivas o duplicadas en el genoma. Por otro lado, las muestras AB.S y AB.T mostraron los porcentajes más bajos de ZER MQ (0.4% y 0.8%, respectivamente), lo que sugiere una mayor confianza en la calidad de las alineaciones en estas muestras.

Tabla 5: Resumen SAMTOOLS bases

Muestra	Bases		
	Total	Mapeadas	Tasa de error
AF.P	4,718,113,739	84.3%	0.00%
AF.S	5,173,042,441	85.1%	0.00%
AF.T	5,179,849,323	84.1%	0.00%
AB.P	4,539,743,820	83.2%	0.00%
AB.S	4,661,343,196	80.3%	0.00%
AB.T	4,618,438,887	80.7%	0.00%

CF.P	6,121,348,171	86.3%	0.00%
CF.S	4,120,229,296	90.8%	0.00%
CF.T	4,956,094,379	84.8%	0.00%
CB.P	4,508,355,700	81.0%	0.00%
CB.S	4,763,329,521	82.7%	0.00%
CB.T	4,587,517,936	83.1%	0.00%

### PCA tomando en cuenta la matriz de FeatureCounts y agrupando por estado fenológico

La figura de PCA (Análisis de Componentes Principales) muestra la variabilidad entre las muestras secuenciadas, diferenciándolas según su estado fenológico (con círculos azules para botón y triángulos rojos para flor). El eje PC1 explica el 88% de la varianza, lo que indica que el estado fenológico es el principal factor que influye en la expresión génica. Esto sugiere que los genes que contribuyen a esta variación están relacionados con cambios biológicos asociados a los estados botón y flor. Por otro lado, el eje PC2 explica solo el 4% de la varianza, lo que implica que otros factores, como variaciones técnicas o efectos biológicos secundarios, tienen un impacto mucho menor en la expresión génica.

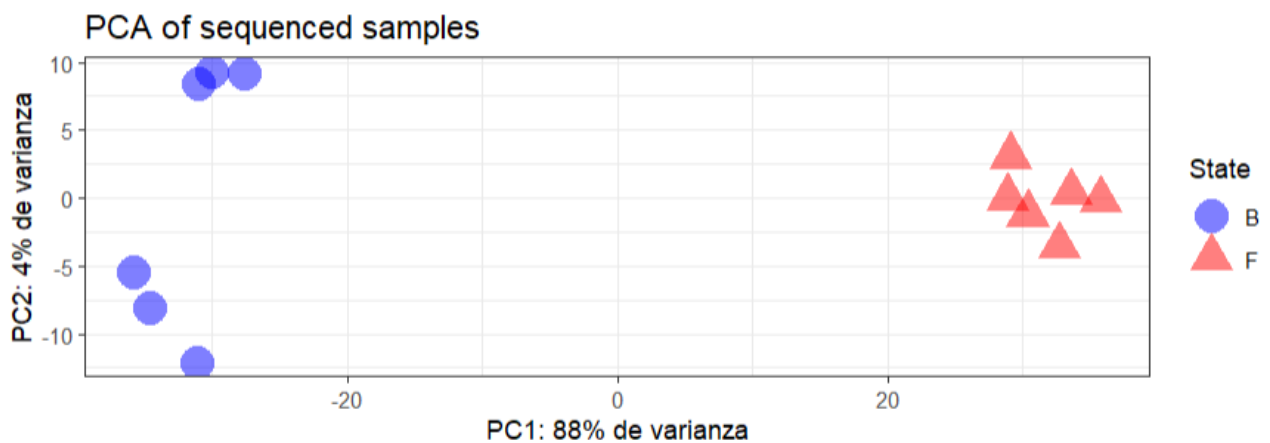


Figura 1: PCA agrupado por estado fenológico Botón (círculos azules) y Flor (triángulos rojos)

### PCA tomando en cuenta la matriz de FeatureCounts y agrupando por variedad

La figura del PCA muestra una clara separación entre las variedades A (círculos azules) y C (triángulos rojos) a lo largo de PC1 (88% de varianza), indicando diferencias genéticas significativas entre ellas. Sin embargo, la cercanía de algunos puntos sugiere un solapamiento parcial, posiblemente debido a flujo genético o alelos compartidos. En

conclusión, aunque ambas variedades son mayormente distintas, comparten ciertas similitudes genéticas en subpoblaciones específicas.

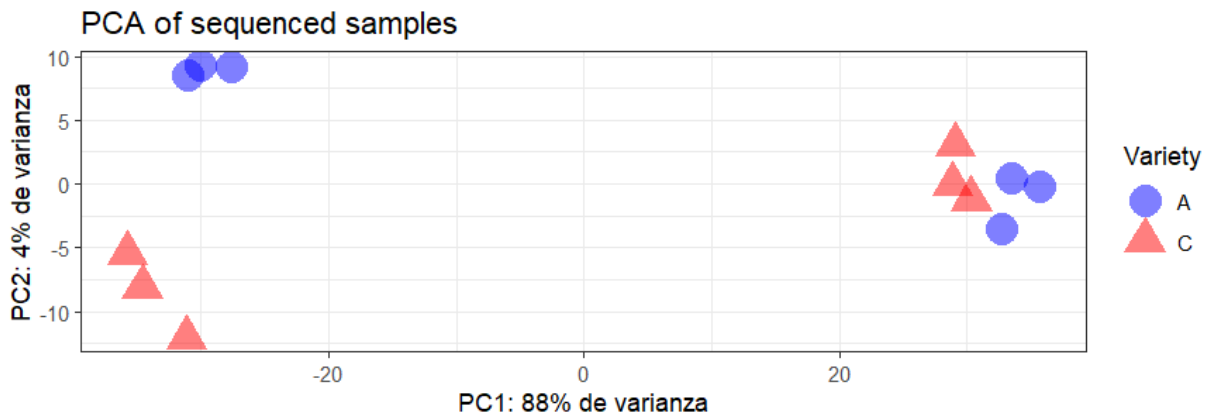


Figura 2: PCA agrupado por variedad. A (círculos azules) C (triángulos rojos)

### Genes diferencialmente expresados

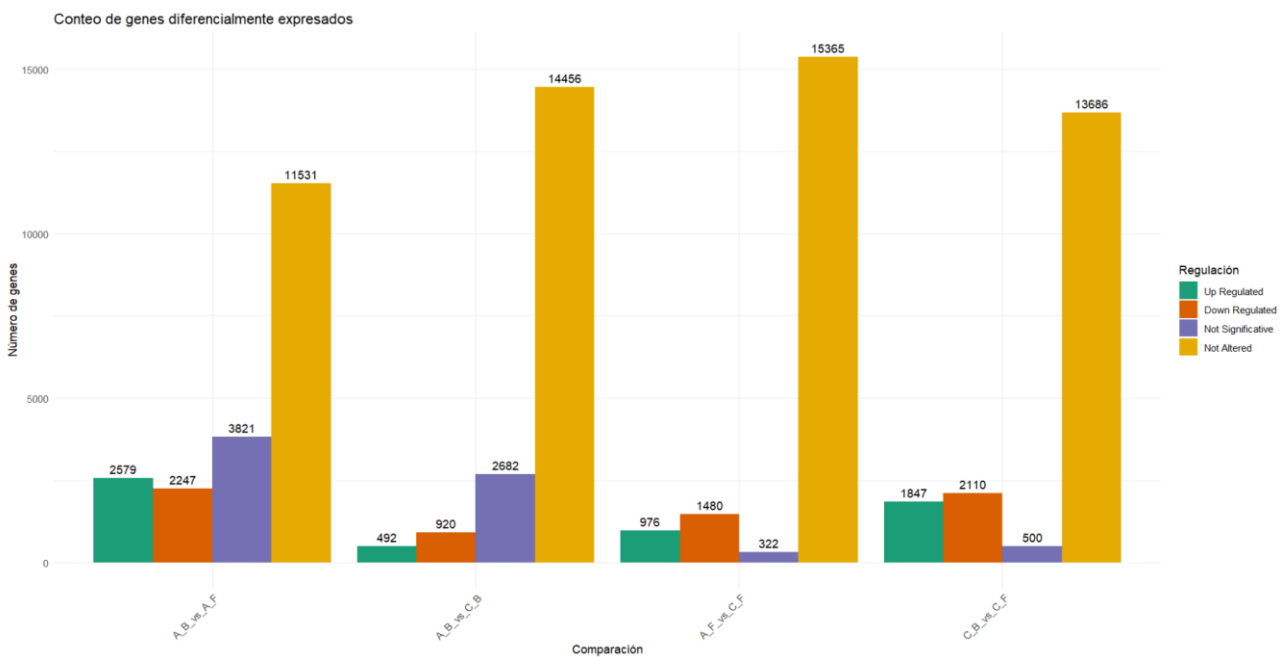


Figura 3: Genes diferencialmente expresados

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2 FC| > 1$ , se obtuvo. 1) Variedad A en botón vs Variedad A en flor muestra 2579 genes sobreexpresados y 2247 genes subexpresados, evidenciando fuertes diferencias constitutivas entre estados fenológicos. 2) Variedad A en botón vs Variedad C en botón destaca con 492 genes sobreexpresados y 920 genes subexpresados, reflejando algunas diferencias entre variedades. 3) Variedad A en flor vs Variedad C en flor presenta 976 genes sobreexpresados y 1480 genes subexpresados, sugiriendo diferencias varietales específicas en ese estado. 4) Variedad C en botón vs Variedad C en flor exhibe 1,847 genes sobreexpresados y 2,110 genes subexpresados, indicando una respuesta fenológica más marcada que en la variedad A. Los altos números de genes regulados (especialmente en cambios fenológicos) revelan redes regulatorias complejas activadas bajo estas condiciones. Los 11,531-15,365

genes no alterados mantienen una base transcripcional estable.

### Genes relacionados a la senescencia floral

Tabla 6: Genes relacionados a la senescencia floral en Variedad A en botón vs Flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan05g00038	ACS	-2.809775	3.632438e-28	subexpresado
Gpan07g00598	ACO	-2.302668	1.059604e-30	subexpresado

Tabla 7: Genes relacionados a la senescencia floral en Variedad C en botón vs Flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan05g00038	ACS	-2.270743	4.696227e-04	subexpresado
Gpan07g00598	ACS	-2.397025	7.455478e-07	subexpresado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , se obtuvo que los genes Gpan05g00038 y Gpan07g00598 están subexpresados en ambas variedades durante la transición de botón a flor abierta, con valores de  $\log_2FC$  comparables (entre -2.27 y -2.81). Aunque la magnitud del cambio es similar, la variedad A (Gpan05g00038:  $\log_2FC = -2.81$ ,  $p_{adj} = 3.63e-28$ ) presenta una significancia estadística más fuerte que la variedad C (Gpan05g00038:  $p_{adj} = 4.69e-04$ ), lo que sugiere una consistencia biológica más robusta en A. Ambos genes están claramente implicados en la senescencia, pero las diferencias entre variedades son sutiles y podrían depender de otros factores regulatorios.

### Genes relacionados a la síntesis del etileno

#### Comparación Variedad A en botón vs flor

Tabla 8: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad A en botón vs flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan01g00730	ACS	-1.8540113	1.324572e-15	subexpresado
Gpan01g00737	ACO	0.1105488	6.847424e-01	no alterado
Gpan04g00338	ACS	-4.5671745	4.532847e-03	subexpresado
Gpan05g01479	ACS	1.2410612	5.693991e-03	sobreexpresado
Gpan06g00916	ACO	2.3110020	3.796491e-01	no alterado
Gpan07g00441	SAM	-3.3197964	5.010258e-01	no alterado
Gpan07g00991	SAM	-0.5665547	2.492853e-01	no alterado
Gpan09g00521	SAM	-0.6375775	4.668590e-09	no significativo
Gpan13g00261	ACS	-0.6609218	3.609831e-03	no significativo
Gpan14g00933	ACS	-1.4054964	3.485526e-11	subexpresado
Gpan14g00992	ACS	0.8312623	4.053103e-04	no significativo
Gpan16g00140	ACS	0.3838646	7.297475e-01	no alterado
Gpan17g01249	ACO	-0.2738800	6.642179e-01	no alterado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, se observa que varios genes relacionados con la síntesis de etileno muestran cambios significativos en su expresión. Los genes Gpan01g00730, Gpan04g00338 y Gpan14g00933 están subexpresados, lo que indica una disminución en su expresión al

comparar botón con flor. Esto sugiere que estos genes podrían estar menos activos en botón. Por otro lado, el gen Gpan05g01479 está sobreexpresado, mostrando un aumento en su expresión en flor. Los demás genes no presentan cambios significativos o no están alterados, lo que indica que su expresión no varía considerablemente entre estos estados fenológicos.

### Comparación Variedad C en botón vs flor

Tabla 9: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad C en botón vs flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan01g00730	ACS	-2.2060792	0.0001145268	subexpresado
Gpan01g00737	ACO	0.1309540	0.8691324836	no alterado
Gpan04g00338	ACS	-6.4720517	0.1306802544	no alterado
Gpan05g01479	ACS	-0.4121805	0.8091479702	no alterado
Gpan06g00916	ACO	5.9061813	0.3349980519	no alterado
Gpan07g00991	SAM	-0.9089805	0.5034665599	no alterado
Gpan09g00521	SAM	-0.5196908	0.0840715475	no alterado
Gpan13g00261	ACS	-1.1280733	0.0523837501	no alterado
Gpan14g00933	ACS	-1.2880253	0.0215352058	subexpresado
Gpan14g00992	ACS	1.1061937	0.0768782463	no alterado
Gpan16g00140	ACS	-0.6038315	0.8477590217	no alterado
Gpan17g01249	ACO	-1.1390470	0.4307764196	no alterado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, solo el gen Gpan01g00730 y Gpan14g00933 están subexpresados, lo que sugiere una disminución en su expresión en botón en comparación con flor. El resto de los genes no muestran cambios significativos, lo que indica que, en la variedad C, la mayoría de los genes relacionados con la síntesis de etileno no varían su expresión entre los estados fenológicos. Esto podría indicar que la variedad C tiene una respuesta más estable en la expresión de estos genes frente a los cambios fenológicos.

### Comparación Variedad A vs Variedad C en flor

Tabla 10: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad A vs Variedad C en flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan01g00730	ACS	0.32670808	0.308282411	no alterado
Gpan01g00737	ACO	0.16660459	0.561544076	no alterado
Gpan04g00338	ACS	0.13537508	0.960968320	no alterado
Gpan05g01479	ACS	-0.79382766	0.198184277	no alterado
Gpan06g00916	ACO	6.44286.065	0.004188347	sobreexpresado
Gpan07g00991	SAM	-0.27191168	0.677528361	no alterado
Gpan09g00521	SAM	0.10860842	0.494241706	no alterado
Gpan13g00261	ACS	-0.05280502	0.895199025	no alterado
Gpan14g00933	ACS	0.19612890	0.535577839	no alterado
Gpan14g00992	ACS	-0.12739361	0.737787721	no alterado
Gpan16g00140	ACS	-0.87880970	0.436917831	no alterado
Gpan17g01249	ACO	-1.09649370	0.057100451	no alterado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, el gen Gpan06g00916 está sobreexpresado, mostrando un aumento

significativo en su expresión en la variedad A en comparación con la variedad C en flor. Esto sugiere que este gen podría estar más activo en la variedad A en este estado fenológico. El resto de los genes no presentan cambios significativos, lo que indica que, en flor, la expresión de la mayoría de los genes relacionados con la síntesis de etileno es similar entre ambas variedades.

### Comparación Variedad A vs Variedad C en botón

Tabla 11: Genes relacionados a la síntesis del etileno en Variedad A vs Variedad C en botón

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan01g00730	ACS	-0.02535979	0.98340145	no alterado
Gpan01g00737	ACO	0.18700983	0.81947827	no alterado
Gpan04g00338	ACS	-1.76950208	0.77146511	no alterado
Gpan05g01479	ACS	-2.44706934	0.06628639	no alterado
Gpan06g00916	ACO	1.03803988	0.06941082	no alterado
Gpan07g00991	SAM	-0.61433747	0.70785728	no alterado
Gpan09g00521	SAM	0.22649509	0.56895442	no alterado
Gpan13g00261	ACS	-0.51995650	0.49267454	no alterado
Gpan14g00933	ACS	0.31360001	0.70971309	no alterado
Gpan14g00992	ACS	0.14753774	0.88901823	no alterado
Gpan16g00140	ACS	-1.86650586	0.49818508	no alterado
Gpan17g01249	ACO	-1.96166070	0.16930779	no alterado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, ninguno de los genes relacionados con la síntesis de etileno muestra cambios significativos en su expresión entre las variedades A y C en botón. Esto sugiere que, en este estado fenológico, ambas variedades tienen una expresión similar de estos genes. La falta de diferencias significativas indica que, en botón, las variedades A y C no difieren en la regulación de los genes asociados a la síntesis de etileno, lo que podría reflejar una respuesta biológica similar en este estado.

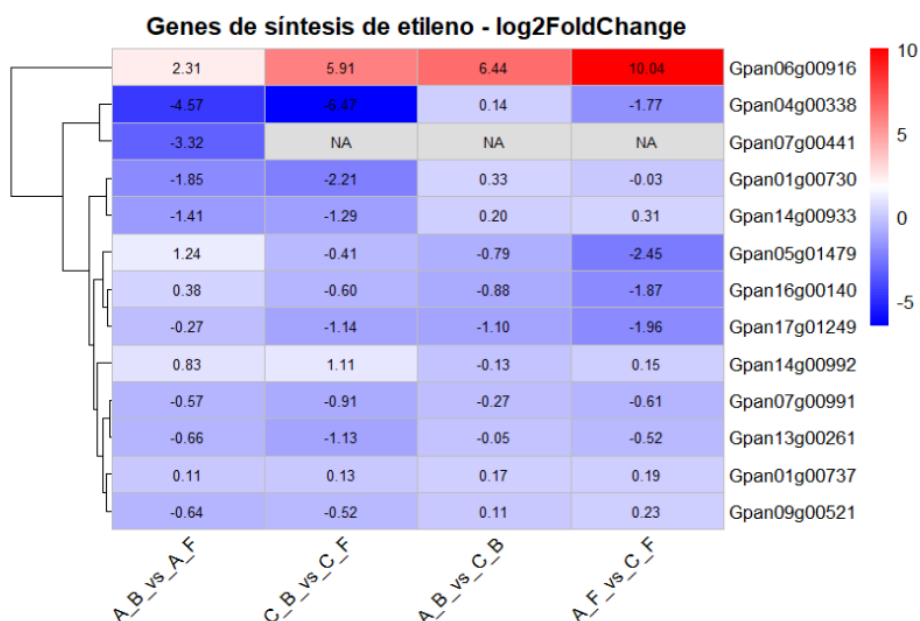


Figura 4: Heatmap de los genes relacionados a la síntesis del etileno

El análisis del heatmap revela los patrones de expresión génica asociados a la síntesis de etileno en dos variedades (A y C) durante diferentes estados fenológicos (B: botón, F: flor). En la comparación intra-varietal (A\_B\_vs\_A\_F y C\_B\_vs\_C\_F), se observa que genes como Gpan06g00916 muestran mayor expresión en botón floral (+2.31 en A, +5.91 en C), sugiriendo una activación temprana en el desarrollo floral. Las comparaciones inter-varietales (A\_B\_vs\_C\_B y A\_F\_vs\_C\_F) revelan diferencias genéticas clave: la variedad C presenta mayor expresión de genes como Gpan06g00916 (+6.44 en botón, +10.04 en flor) respecto a la variedad A, indicando un potencial rol varietal en la regulación del etileno. Algunos genes muestran comportamientos opuestos entre estados (ej. Gpan05g01479), mientras que los valores NA en Gpan07g00441 sugieren silenciamiento específico. Estos resultados destacan cómo la producción de etileno está modulada tanto por el genotipo (variedades A/C) como por el estado de desarrollo (botón/flor), identificando reguladores clave para futuros estudios en el desarrollo floral.

### Genes relacionados a la señal de transducción de etileno

#### Comparación Variedad A en botón vs flor

Tabla 12: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad A en botón vs flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan02g00900	ERF	0.008998061	9.917267e-01	no alterado
Gpan03g00180	ERF	0.759943422	4.220699e-04	no significativo
Gpan03g00854	ERF	0.794592584	4.704568e-01	no alterado
Gpan03g00873	ERF	0.155899730	9.370862e-01	no alterado
Gpan04g00592	EIL1/2	-0.571025951	4.087070e-03	no significativo
Gpan04g00597	EIL1/2	0.382784283	1.261402e-02	no significativo
Gpan04g00666	EIL1/2	-16.193510382	7.434927e-04	subexpresado
Gpan04g01184	ERF	-0.888019567	6.713154e-01	no alterado
Gpan05g00114	ERF	1.382022468	1.866701e-04	sobreexpresado
Gpan05g01604	ERF	0.456460788	1.551212e-02	no significativo
Gpan06g00755	ERF	1.512777118	7.810809e-01	no alterado

Gpan07g00572	EIL1/2	-0.488414402	3.744128e-01	no alterado
Gpan07g00588	ERF	0.863139450	1.284756e-02	no significativo
Gpan08g00166	ERF	-0.645537018	9.324897e-01	no alterado
Gpan08g00796	EBF1/2	-6.862044723	1.601726e-05	subexpresado
Gpan08g01336	ERS	-0.481491524	2.146196e-01	no alterado
Gpan09g01519	ERF	3.717166314	3.663707e-01	no alterado
Gpan10g00425	RTE1	-0.641370531	8.796282e-01	no alterado
Gpan10g00460	ERF	-4.730009181	5.775984e-91	subexpresado
Gpan10g00832	ERS	-1.521047098	8.298168e-01	no alterado
Gpan10g00915	EIL1/2	-2.245472619	7.293261e-01	no alterado
Gpan10g01008	ERS	1.893426972	9.984161e-37	sobreexpresado
Gpan11g00119	ERF	0.473302681	3.529504e-03	no significativo
Gpan11g00448	EIN2	-0.766559956	2.312414e-06	no significativo
Gpan11g00477	ERF	-0.480783482	6.399463e-02	no alterado
Gpan11g00866	ERF	1.147276287	3.348868e-03	sobreexpresado
Gpan12g00793	ERF	0.458427356	4.184109e-04	no significativo
Gpan14g00583	ERF	0.356407469	2.746067e-01	no alterado
Gpan14g00589	ERF	3.912461757	4.653007e-02	sobreexpresado
Gpan14g00950	ERF	0.927802349	2.701231e-02	no significativo
Gpan15g00017	ERF	0.220544962	2.977259e-01	no alterado
Gpan15g00066	ERF	0.300873391	4.465949e-02	no significativo
Gpan15g00980	EBF1/2	0.899855946	2.514092e-05	no significativo
Gpan15g01039	ERF	0.895435840	9.008507e-03	no significativo
Gpan16g00118	ERF	0.873967962	7.666648e-03	no significativo
Gpan16g00202	ERF	-0.603499532	3.205107e-04	no significativo
Gpan16g00847	ERF	-0.312756554	2.675165e-02	no significativo
Gpan16g00856	RTE1	-2.090540912	2.688846e-05	subexpresado
Gpan17g00803	ERS	-0.207586539	2.596705e-01	no alterado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $padj < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, varios genes relacionados con la señal de transducción de etileno muestran cambios significativos. Los genes Gpan04g00666, Gpan08g00796, Gpan10g00460 y Gpan16g00856 están subexpresados, lo que indica una disminución en su expresión en botón en comparación con flor. Por otro lado, los genes Gpan05g00114, Gpan10g01008, Gpan11g00866 y Gpan14g00589 están sobreexpresados, mostrando un aumento en su expresión en flor. Esto sugiere que estos genes podrían estar más activos en flor, mientras que otros están menos activos en botón. El resto de los genes no presentan cambios significativos, lo que indica que su expresión no varía considerablemente entre estos estados fenológicos.

### Comparación Variedad C en botón vs flor

Tabla 13: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad C en botón vs flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan02g00900	ERF	0.61266289	7.786804e-01	no alterado
Gpan03g00180	ERF	0.51058565	4.460175e-01	no alterado
Gpan03g00854	ERF	0.35986756	9.258735e-01	no alterado
Gpan03g00873	ERF	0.44698889	9.302314e-01	no alterado

Gpan04g00592	EIL1/2	-0.73332665	1.776300e-01	no alterado
Gpan04g00597	EIL1/2	0.89339195	1.634936e-02	no significativo
Gpan04g01184	ERF	-2.01114413	7.133492e-01	no alterado
Gpan05g00114	ERF	2.95897156	8.422628e-04	sobreexpresado
Gpan05g01604	ERF	0.78383159	1.102286e-01	no alterado
Gpan07g00572	EIL1/2	0.40490399	8.174473e-01	no alterado
Gpan07g00588	ERF	1.63604698	6.299554e-02	no alterado
Gpan08g00796	EBF1/2	-1.026871352	5.792471e-03	subexpresado
Gpan08g01336	ERS	-1.60883071	7.188213e-02	no alterado
Gpan10g00460	ERF	-5.88996237	1.029306e-27	subexpresado
Gpan10g01008	ERS	2.23175912	3.179654e-10	sobreexpresado
Gpan11g00119	ERF	0.44858623	3.443048e-01	no alterado
Gpan11g00448	EIN2	-1.05137755	1.095002e-02	subexpresado
Gpan11g00477	ERF	-0.68801257	3.369394e-01	no alterado
Gpan11g00866	ERF	0.41723075	7.706083e-01	no alterado
Gpan12g00793	ERF	0.10460756	8.376908e-01	no alterado
Gpan14g00583	ERF	-1.36337695	6.391128e-02	no alterado
Gpan14g00589	ERF	4.25783079	4.438438e-01	no alterado
Gpan14g00950	ERF	0.08287690	9.651898e-01	no alterado
Gpan15g00017	ERF	0.05463341	9.455566e-01	no alterado
Gpan15g00066	ERF	-0.43076735	2.999754e-01	no alterado
Gpan15g00980	EBF1/2	0.59956105	3.596228e-01	no alterado
Gpan15g01039	ERF	0.53712109	6.355254e-01	no alterado
Gpan16g00118	ERF	0.59759901	5.683267e-01	no alterado
Gpan16g00202	ERF	-0.95435533	2.594619e-02	no significativo
Gpan16g00847	ERF	-0.49749681	1.845064e-01	no alterado
Gpan16g00856	RTE1	-0.29863605	8.848949e-01	no alterado
Gpan17g00803	ERS	-1.15475463	2.741674e-03	subexpresado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $padj < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, los genes Gpan08g00796, Gpan10g00460, Gpan11g00448 y Gpan17g00803 están subexpresados en botón en comparación con flor. Por otro lado, los genes Gpan05g00114 y Gpan10g01008 están sobreexpresados, mostrando un aumento en su expresión en flor. Esto indica que, en la variedad C, algunos genes relacionados con la señal de transducción de etileno tienen una expresión diferencial entre los estados fenológicos, aunque la mayoría de los genes no muestran cambios significativos. Esto podría reflejar una respuesta más específica o limitada en la variedad C frente a los cambios fenológicos.

### Comparación Variedad A vs Variedad C en flor

Tabla 14: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad A vs Variedad C en flor

geneID	Gen	log2FoldChange	padj	Result
Gpan02g00900	ERF	0.452361384	6.027895e-01	no alterado
Gpan03g00180	ERF	-0.038258484	9.233520e-01	no alterado
Gpan03g00854	ERF	-1.936785713	1.049796e-01	no alterado
Gpan03g00873	ERF	0.345529922	8.689871e-01	no alterado

Gpan04g00592	EIL1/2	0.039512877	9.113196e-01	no alterado
Gpan04g00597	EIL1/2	0.524198050	1.553765e-03	no significativo
Gpan04g01184	ERF	0.009096601	9.974389e-01	no alterado
Gpan05g00114	ERF	0.975046408	2.669107e-02	no significativo
Gpan05g01604	ERF	0.294490988	2.138974e-01	no alterado
Gpan07g00572	EIL1/2	0.956187786	7.700044e-02	no alterado
Gpan07g00588	ERF	0.515428521	2.426624e-01	no alterado
Gpan08g00796	EBF1/2	2.067608168	7.680140e-02	no alterado
Gpan08g01336	ERS	0.398494372	3.841683e-01	no alterado
Gpan10g00425	RTE1	3.197557714	3.557199e-01	no alterado
Gpan10g00460	ERF	-0.984260231	2.212270e-04	no significativo
Gpan10g01008	ERS	0.167844026	4.587841e-01	no alterado
Gpan11g00119	ERF	0.146149782	5.224129e-01	no alterado
Gpan11g00448	EIN2	-0.228080941	2.928358e-01	no alterado
Gpan11g00477	ERF	-0.180754995	6.127972e-01	no alterado
Gpan11g00866	ERF	-0.276600388	6.437018e-01	no alterado
Gpan12g00793	ERF	-0.073692055	7.158344e-01	no alterado
Gpan14g00583	ERF	-0.589507044	8.110383e-02	no alterado
Gpan14g00589	ERF	1.974822057	4.860757e-01	no alterado
Gpan14g00950	ERF	-1.215420094	1.671195e-02	subexpresado
Gpan15g00017	ERF	-0.064393291	8.368963e-01	no alterado
Gpan15g00066	ERF	-0.929410955	6.206729e-10	no significativo
Gpan15g00980	EBF1/2	-0.614389529	2.048747e-02	no significativo
Gpan15g01039	ERF	-0.199823634	7.023378e-01	no alterado
Gpan16g00118	ERF	-0.118509397	8.267444e-01	no alterado
Gpan16g00202	ERF	-0.326187599	1.170509e-01	no alterado
Gpan16g00847	ERF	-0.095480063	6.347333e-01	no alterado
Gpan16g00856	RTE1	2.390165755	1.739751e-06	sobreexpresado
Gpan17g00803	ERS	-0.694456348	4.460136e-05	no significativo

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, el gen Gpan16g00856 está sobreexpresado, mostrando un aumento significativo en su expresión en la variedad A en comparación con la variedad C en flor. Esto sugiere que este gen podría estar más activo en la variedad A en este estado fenológico. Por otro lado, el gen Gpan14g00950 está subexpresado, indicando una disminución en su expresión en la variedad A. El resto de los genes no presentan cambios significativos, lo que indica que, en flor, la expresión de la mayoría de los genes relacionados con la señal de transducción de etileno es similar entre ambas variedades.

### Comparación Variedad A vs Variedad C en botón

Tabla 15: Genes relacionados a la transducción del etileno en Variedad A vs Variedad C en botón

genelD	Gen	log2FoldChange	p <sub>adj</sub>	Result
Gpan02g00900	ERF	1.0560262	6.185997e-01	no alterado
Gpan03g00180	ERF	-0.2876163	7.341844e-01	no alterado

Gpan03g00854	ERF	-2.3715107	4.608619e-01	no alterado
Gpan03g00873	ERF	0.6366191	9.038464e-01	no alterado
Gpan04g00592	EIL1/2	-0.1227878	8.861530e-01	no alterado
Gpan04g00597	EIL1/2	1.0348057	8.029138e-03	sobreexpresado
Gpan04g01184	ERF	-1.1140280	8.653544e-01	no alterado
Gpan05g00114	ERF	2.5519955	9.662992e-03	sobreexpresado
Gpan05g01604	ERF	0.6218618	2.782454e-01	no alterado
Gpan07g00572	EIL1/2	1.8495062	1.662233e-01	no alterado
Gpan07g00588	ERF	1.2883360	2.087421e-01	no alterado
Gpan08g00796	EBF1/2	-1.3390606	7.661123e-01	no alterado
Gpan08g01336	ERS	-0.7288448	5.303344e-01	no alterado
Gpan10g00460	ERF	-2.1442134	5.481777e-04	subexpresado
Gpan10g01008	ERS	0.5061762	3.224732e-01	no alterado
Gpan11g00119	ERF	0.1214333	8.595663e-01	no alterado
Gpan11g00448	EIN2	-0.5128985	3.288539e-01	no alterado
Gpan11g00477	ERF	-0.3879841	6.653958e-01	no alterado
Gpan11g00866	ERF	-1.0066459	4.425548e-01	no alterado
Gpan12g00793	ERF	-0.4275119	2.934775e-01	no alterado
Gpan14g00583	ERF	-2.3092915	1.048151e-03	subexpresado
Gpan14g00589	ERF	2.3201911	7.561053e-01	no alterado
Gpan14g00950	ERF	-2.0603455	9.579598e-02	no alterado
Gpan15g00017	ERF	-0.2303048	7.488312e-01	no alterado
Gpan15g00066	ERF	-1.6610517	1.724857e-06	subexpresado
Gpan15g00980	EBF1/2	-0.9146844	1.744646e-01	no alterado
Gpan15g01039	ERF	-0.5581384	6.531648e-01	no alterado
Gpan16g00118	ERF	-0.3948784	7.546849e-01	no alterado
Gpan16g00202	ERF	-0.6770434	1.812256e-01	no alterado
Gpan16g00847	ERF	-0.2802203	5.496827e-01	no alterado
Gpan16g00856	RTE1	4.1820706	5.501307e-04	sobreexpresado
Gpan17g00803	ERS	-1.6416244	1.838723e-05	subexpresado

Usando los siguientes parámetros estadísticos  $p_{adj} < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ , en esta comparación, los genes Gpan04g00597, Gpan05g00114 y Gpan16g00856 están sobreexpresados, mostrando un aumento en su expresión en la variedad A en comparación con la variedad C en botón. Por otro lado, los genes Gpan10g00460, Gpan14g00583, Gpan15g00066 y Gpan17g00803 están subexpresados, indicando una disminución en su expresión en la variedad A. Esto sugiere que, en botón, hay diferencias en la expresión de algunos genes relacionados con la señal de transducción de etileno entre las variedades A y C. Sin embargo, la mayoría de los genes no muestran cambios significativos, lo que indica que, en este estado fenológico, las variedades tienen una expresión similar en la mayoría de los genes analizados.

## Genes de señal de transducción etileno - log2FoldChange

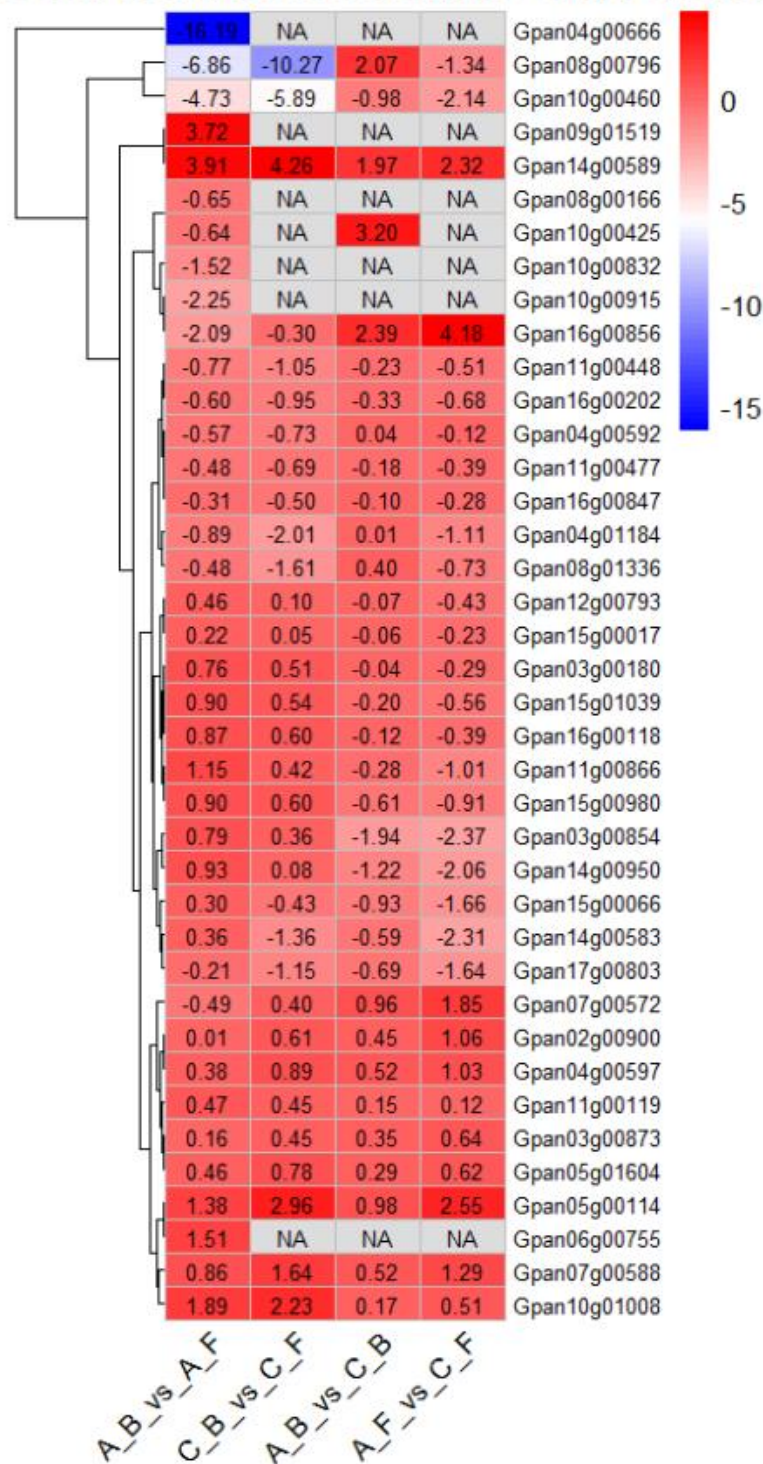


Figura 5: Heatmap de los genes relacionados con la transducción de la señal del etileno. El heatmap revela los patrones de expresión génica asociados a la transducción de etileno en dos variedades (A y C) durante el desarrollo floral (B: botón, F: flor). En las comparaciones intra-varietales (A\_B\_vs\_A\_F y C\_B\_vs\_C\_F), los valores rojos indican mayor expresión en botón floral (ej. Gpan05g00114: +1.51 en A), mientras los azules muestran mayor actividad en flor (ej. Gpan04g00666: -16.19 en A). Las comparaciones inter-varietales (A\_B\_vs\_C\_B y A\_F\_vs\_C\_F) destacan diferencias genéticas:

Gpan05g01604 (+2.96 en C\_B\_vs\_C\_F y +2.55 en A\_F\_vs\_C\_F) sugiere que la variedad C produce más etileno, especialmente en botón. Genes como Gpan17g00803 (+1.85 en A\_F\_vs\_C\_F) revelan respuestas opuestas entre variedades, mientras los NA (ej. Gpan09g01519) indican silenciamiento específico. Estos resultados demuestran que la señalización por etileno está modulada por la interacción entre el genotipo (A/C) y el estadio floral (botón/flor).

### **Análisis de los resultados**

En *Gypsophila* L, la biosíntesis del etileno comienza cuando la enzima ACS (ACC sintasa) convierte el precursor SAM en ACC, el cual es luego transformado en etileno gaseoso por la enzima ACO (ACC oxidasa). En la percepción de la señal, los receptores ETR1/ERS (que requieren la enzima transportadora de cobre RAN1 para su funcionamiento) detectan el etileno. La quinasa CTR1, que normalmente inhibe la vía, se inactiva tras la unión del etileno, permitiendo que la proteína EIN2 active los factores de transcripción EIL1/2 al inhibir su degradación mediada por los complejos EBF1/2. Finalmente, EIL1/2 estimulan la expresión de los factores de transcripción ERF que activan genes pro-senescencia (Binder, 2020).

Los resultados del RNA-Seq revelan patrones complejos en la regulación de genes asociados a la síntesis y transducción de etileno, con implicaciones clave para el desarrollo de variedades con mayor vida en florero. La alta calidad de los datos (94.82% Q30, 100% de alineamiento) valida la confiabilidad de los hallazgos. La figura de PCA (Análisis de Componentes Principales) mostró que el estado fenológico es el principal factor que influye en la expresión génica. Aunque ambas variedades son mayormente distintas, comparten ciertas similitudes genéticas en subpoblaciones específicas

El análisis transcripcional reveló un patrón coordinado en la regulación de genes asociados a la ACC sintasa (ACS) durante el desarrollo floral de la variedad A. Los genes Gpan01g00730 (log<sub>2</sub>FC: -1.85), Gpan04g00338 (log<sub>2</sub>FC: -4.57) y Gpan14g00933 (log<sub>2</sub>FC: -1.41) muestran una marcada subexpresión en flor respecto al botón, sugiriendo su papel como potenciales represores de la biosíntesis de etileno durante la etapa inicial del desarrollo. Particularmente, Gpan04g00338, con su drástica disminución en flor (23 veces menos expresado), parece actuar como un regulador clave que mantiene bajos los niveles de etileno en botón, retrasando así el inicio de la senescencia. En contraste, Gpan05g01479, muestra el patrón opuesto con sobreexpresión en flor (log<sub>2</sub>FC: +1.24), lo que coincide con el incremento esperado en la producción de etileno durante la apertura floral. Esta regulación diferencial sugiere un mecanismo de control en dos fases: (1) represión activa de la vía del etileno en botón mediante genes supresores, y (2) desrepresión coordinada con activación de ACS en flor, lo que permite una transición controlada hacia la senescencia (Fernandez & Stepanova, 2020).

Los genes ERF muestran patrones de expresión diferenciales que explican la longevidad floral característica de la variedad A. Gpan05g00114 (log<sub>2</sub>FC: +1.38) y Gpan11g00866 (log<sub>2</sub>FC: +1.14) presentan una moderada sobreexpresión en flor, sugiriendo su participación en la activación de genes de senescencia. Particularmente destacable es Gpan14g00589 (log<sub>2</sub>FC: +3.91), que muestra una fuerte inducción en flor, indicando su papel crucial como activador maestro de la senescencia. En contraste, Gpan10g00460 (log<sub>2</sub>FC: -4.73) exhibe una marcada subexpresión en flor, lo que sugiere su función como represor de la senescencia durante la etapa de botón; su silenciamiento en flor posiblemente permite la activación de procesos de envejecimiento. Esta regulación coordinada de los ERF con activadores moderados y represores potentes crea un balance

que retarda la senescencia en la variedad A, donde los efectos de los ERF activadores parecen estar atenuados, permitiendo una mayor vida útil de las flores (Shida et al., 2021).

El gen *Gpan04g00666* está extremadamente subexpresado en flor ( $\log_2FC$ : -16.19). Este está asociado a *EIL1/2*, que son activadores de la respuesta al etileno (activan los ERF), su silenciamiento en flor podría indicar un mecanismo de retroalimentación negativa para atenuar la senescencia en la variedad A (Li & Gao, 2022).

Los genes ERS muestran patrones de expresión diferenciales clave para entender la baja sensibilidad al etileno de la variedad A. *Gpan10g01008* ( $\log_2FC$ : +1.89 en botón vs flor) presenta una moderada sobreexpresión en flor, lo que normalmente aumentaría la percepción del etileno, pero su expresión basal en la variedad A es significativamente menor que en la variedad C, limitando así su impacto. Complementariamente, *Gpan17g00803* ( $\log_2FC$ : -1.64 en A vs C en botón) muestra una clara subexpresión en la variedad A desde la etapa de botón, estableciendo desde fases tempranas un fenotipo de baja sensibilidad hormonal. Esta regulación coordinada de los receptores ERS -con niveles reducidos tanto en botón como en flor- crea un sistema de percepción atenuado del etileno que explica en parte la notable longevidad postcosecha de esta variedad. La expresión diferencial de estos receptores, particularmente cuando se compara con la variedad C, sugiere un mecanismo genético adaptativo que reduce la capacidad de respuesta a las señales de senescencia mediadas por etileno (Pabón & Molano, 2023).

En contraste, en la variedad C los genes asociados a la ACC sintasa (ACS) *Gpan01g00730* y *Gpan14g00933* muestran subexpresión en flor ( $\log_2FC$ : -2.21 y -1.29, respectivamente), sugiriendo una disminución en la capacidad de síntesis de ACC (precursor de etileno) durante la transición botón-flor. Esta regulación negativa contrasta con la variedad A, donde *Gpan05g01479* (ACS) se sobreexpresa en flor (+1.24), indicando que la variedad C podría compensar su menor producción basal de etileno mediante otros mecanismos reguladores. La subexpresión de estos genes en flor podría reflejar un intento fallido de atenuar la senescencia, ya que la variedad C presenta una vida postcosecha más corta (Gamalero, et al 2023).

En cuanto a los genes ERF, *Gpan05g00114* muestra marcada sobreexpresión en flor ( $\log_2FC$ : +2.95), actuando como activador de genes de senescencia, mientras que *Gpan10g00460* está fuertemente subexpresado ( $\log_2FC$ : -5.88), perdiendo su posible función represora. Esta combinación (activación de ERF pro-senescencia + silenciamiento de ERF represores) explica en parte la rápida senescencia de la variedad C. Comparado con la variedad A, donde estos genes tienen cambios menos drásticos, se evidencia un desbalance en la red de regulación del etileno (Shoji & Yuan, 2021).

Con respecto a los genes ERS, *Gpan10g01008* está sobreexpresado en flor ( $\log_2FC$ : +2.23), aumentando la sensibilidad al etileno, mientras que *Gpan17g00803* muestra subexpresión ( $\log_2FC$ : -1.15), reduciendo la diversidad de receptores disponibles. Esta configuración genera un sistema de percepción hiper-sensible pero poco diverso, que responde exageradamente a señales de senescencia. En comparación con la variedad A, donde ambos receptores están menos expresados, se explica la mayor sensibilidad al etileno de la variedad C (Ma & Dong, 2021).

Adicionalmente, la senescencia floral en *Gypsophila* L. muestra un mecanismo independiente del etileno, donde los genes *Gpan05g00038* (peroxidasa antioxidante) y *Gpan07g00598* (receptor de giberelinas) presentan una represión consistente ( $\log_2FC$  ~ -2.3 a -2.8) en ambas variedades durante la transición botón-flor. Aunque las diferencias

entre variedades son mínimas ( $\sim 0.5$  unidades de  $\log_2FC$ ), la mayor significancia estadística en la variedad A ( $p_{adj} = 3.63e-28$  vs  $4.69e-04$  en C para *Gpan05g00038*) indica una regulación más estricta de estos mecanismos. Esta subexpresión sugiere una pérdida coordinada de protección antioxidante y señales anti-senescencia, contribuyendo al envejecimiento floral (Li & Gao, 2022).

El estudio reveló genes clave para desarrollar variedades con mayor vida en florero. Los genes *Gpan06g00916* (ACO) ( $\log_2FC$ : +6.44 en flor, variedad C vs A) y *Gpan04g00666* (EIL1/2) ( $\log_2FC$ : -16.19 en flor, variedad A) emergen como posibles marcadores ideales para selección asistida, dado su fuerte asociación con la longevidad floral. Con qPCR se deberían validar los resultados, permitiendo cuantificar sus niveles de expresión como predictor de vida postcosecha. Para *Gpan05g00114* (ERF) ( $\log_2FC$ : +2.95 en flor, variedad C), cuya sobreexpresión acelera la senescencia, la técnica CRISPR-Cas9 podría ser desarrollada para generar alelos knockout en variedades sensibles (Xu et al., 2021).

### Conclusiones y Recomendaciones

El estudio revela que la longevidad floral *Gypsophila* L. está determinada por una fina regulación de la biosíntesis, percepción y señalización del etileno. En la variedad A, la baja expresión de receptores ERS (como *Gpan17g00803*), la drástica subexpresión de reguladores EIL1/2 (*Gpan04g00666*:  $\log_2FC$  -16.19) y el balance entre sobreexpresión (*Gpan14g00589*) y subexpresión (*Gpan10g00460*) de ERF generan un fenotipo más insensible al etileno. En contraste, la variedad C presenta desregulación en la cascada, con sobreexpresión de ACO (*Gpan06g00916*: +6.44) y ERF (*Gpan05g00114*: +2.95), lo que acelera su senescencia. Los genes *Gpan04g00338* (represor de ACS) y *Gpan04g00666* (represor de EIL1/2) emergen como posibles marcadores moleculares prioritarios para breeding. Se deberían hacer validaciones para comprobar que sean medibles mediante qPCR, mientras que el desarrollo de la técnica de edición con CRISPR-Cas9 de *Gpan06g00916* (ACO) podría extender la vida floral en variedades sensibles. Estos hallazgos proporcionan herramientas concretas para el desarrollo de variedades comerciales con mayor vida postcosecha mediante selección genómica asistida.

### Bibliografía

- Abdul Azeez, A. P., Sane, D., Bhatnagar, P., & Nath, P. (2007). Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*, *68*(10), 1352–1357. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.027>
- Ball. (2024). *Gypsophilia*. Retrieved from <https://ballsb.com/en/varieties/cuttings-en/gypsophilia>
- Binder, B. Ethylene signaling in plants, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 295, Issue 22, 2020, Pages 7710-7725, ISSN 0021-9258, <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010854>.
- China National GeneBank (2022). *Gpan\_WG* Source: CNGB Assembly ( ID CNA0050895 ). Retrive from <https://db.cngb.org/search/assembly/CNA0050895/>
- Corchete, L. A., Rojas, E. A., Alonso-López, D., et al. (2020). Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis. *Scientific Reports*, *10*, 19737. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76881-x>

- Fanourakis, D., Pieruschka, P., Savvides, A., Macnish, A., Sarlikioti, V., Woltering, E. (2013). Sources of vase life variation in cut roses: A review, *Postharvest Biology and Technology*, Volume 78, 2013, Pages 1-15, ISSN 0925-5214, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.12.001>.
- Fernandez-Moreno, J. P., & Stepanova, A. N. (2020). Monitoring ethylene in plants: genetically encoded reporters and biosensors. *Small Methods*, 4(8), 1900260.
- Gamalero, E., Lingua, G., & Glick, B. R. (2023). Ethylene, ACC, and the plant growth-promoting enzyme ACC deaminase. *Biology*, 12(8), 1043.
- Hetzl, J., Duttke, S. H., Benner, C., & Chory, J. (2016). Nascent RNA sequencing reveals distinct features in plant transcription. *Biological Sciences*, 113(43), 12316-12321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603217113>
- Li, F., & Gao, Y. (2022). The chromosome-level genome of *Gypsophila paniculata* reveals the molecular mechanism of floral development and ethylene insensitivity. *Horticulture Research*, 9(176). <https://doi.org/10.1093/hr/uhac17>
- Liu, S., Wang, Z., Zhu, R., Wang, F., Cheng, Y., & Liu, Y. (2018). Three differential expression analysis methods for RNA sequencing: limma, EdgeR, DESeq2. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.3791/62528>
- Ma, Q., & Dong, C. H. (2021). Regulatory functions and molecular mechanisms of ethylene receptors and receptor-associated proteins in higher plants. *Plant Growth Regulation*, 93(1), 39-52.
- Marguerat, S., & Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 569–579. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>
- Martin, L. B. B., Fei, Z., Giovannoni, J. J., & Rose, J. K. C. (2013). Catalyzing plant science research with RNA-seq. *Frontiers in Plant Science*, 4, Article 66. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00066>
- Pabón, J. G. & Molano, Y. S. (2023). Análisis y evaluación de la expresión del gen ERS (receptor homólogo del etileno) y su relación con los genes EIN2 y ACO en papa criolla (*Solanum Tuberosum* Grupo Phureja). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11349/37557>
- Quiroz, D., Lensink, M., Kliebenstein, D. J., & Monroe, J. G. (2023). *Causes of mutation rate variability in plant genomes. Annual Review of Plant Biology*, 74, 751-775. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070522-054109>
- Rogers, H. J. (2013). From models to ornamentals: how is flower senescence regulated? *Plant Molecular Biology*, 82, 563–574. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9968-0>
- Schliesky, S., Gowik, U., Weber, A. P. M., & Bräutigam, A. (2012). *RNA-seq assembly – are we there yet? Frontiers in Plant Science*, 3, Article 220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00220>
- Shahri, W., Tahir, I. (2014). Flower senescence: some molecular aspects. *Planta* **239**, 277–297. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1984-z>

- Shida, X. U., Xingmin, G. E. N. G., & Lulu, W. A. N. G. (2021). A review of the structure, function and expression regulation of ethylene response factors (ERF) in plant. *浙江农林大学学报*, 38(3), 624-633.
- Shoji, T., & Yuan, L. (2021). ERF gene clusters: working together to regulate metabolism. *Trends in plant science*, 26(1), 23-32.
- Tripathi, S. K., & Tuteja, N. (2007). Integrated signaling in flower senescence: An overview. *Plant Signaling & Behavior*, 2(6), 437–445. <https://doi.org/10.4161/psb.2.6.4991>
- Xu, J., Naing, A. H., Bunch, H., Jeong, J., Kim, H., & Kim, C. K. (2021). Enhancement of the flower longevity of petunia by CRISPR/Cas9-mediated targeted editing of ethylene biosynthesis genes. *Postharvest Biology and Technology*, 174, 111460.
- Zhang, W., Hu, Y., Liu, J., Wang, H., Wei, J., Sun, P., ... & Zheng, H. (2020). Progress of ethylene action mechanism and its application on plant type formation in crops. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1667-1673.

## ANEXO 1

Códigos utilizados en la tesis  
<https://github.com/CLAUDIAGONA/TESISCO.git>