

Genotyping, phenotyping and transcriptomic analysis of accessions of *Vicia faba*, *Pisum sativum* and *Vigna unguiculata*

Genotipado, fenotipado y análisis transcriptómico de accesiones de *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Vigna unguiculata*

M. Martos-Fuentes*^{1,2}, J.Weiss^{2,3}, C. Egea-Gilabert^{2,3}, M. Egea-Cortines^{2,3}, J.A. Fernández^{1,2}

¹ Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

² Instituto de Biotecnología Vegetal. Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n. Campus Muralla del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, España.

³ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

Abstract

Legumes are the second largest world crop production after cereals, demonstrating their importance for human and animal consumption. Faba bean (*Vicia faba*), pea (*Pisum sativum*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) are legume species with agricultural interest in the European Union. The selection of varieties of these species through genotyping, phenotyping and transcriptomics, allows identifying varieties with nutritional quality (high protein content) and good agronomic qualities (resistance to abiotic and biotic stress) optimal for a sustainable and competitive production of protein crops in Europe.

Keywords: Legumes; SNPs; morphology; genetic expression; protein content.

Resumen

Las leguminosas son el segundo cultivo con mayor producción mundial después de los cereales, por lo que su importancia para consumo animal y humano es crucial. El haba (*Vicia faba*), el guisante (*Pisum sativum*) y el caupí (*Vigna unguiculata*) son especies de leguminosas con interés agronómico en la Unión Europea. La selección de variedades de estas especies, mediante técnicas de genotipado, fenotipado y transcriptómica, permitirá la obtención de variedades con calidad nutricional (alto contenido en proteína) y buenas cualidades agronómicas (resistencia a estrés abiótico y biótico) óptimas para una producción sostenible y competitiva de proteínas en Europa.

Palabras clave: Leguminosas; SNPs; morfología; expresión genética; contenido proteico.

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas desempeñan un papel importante en la dieta humana y en la animal ya que un tercio de las proteínas consumidas en la dieta humana proceden de ellas [1]. Se sabe que las legumbres contienen un alto contenido en proteínas y una proporción adecuada de carbohidratos y grasas, entre otros compuestos, lo cual las hacen idóneas para una alimentación equilibrada. El valor nutricional de los alimentos depende del genotipo y de las condiciones de crecimiento, por

* E-mail: marina.fuentes@upct.es

lo que estudios enfocados al conocimiento de las interacciones entre estos dos factores son importantes [2].

La leguminosa con mayor producción y más extendida en el mundo es la soja (*Glycine max*). Con 308 Mt/año en 2014 es uno de los principales productos importados para consumo humano y animal en la Comunidad Europea [3], lo que supone una importante dependencia de esta especie vegetal. La sustitución de alimentos a base de soja por otros cultivados “localmente” con alto valor nutricional es un aspecto importante para la seguridad alimentaria en Europa.

Es sabido que las leguminosas son beneficiosas para el medio ambiente, principalmente por las ventajas derivadas de su simbiosis con los rizobios fijadores de nitrógeno ya que, entre otros factores, esto contribuye a la disminución de la contaminación por nitratos. El empleo de variedades adaptadas a los distintos climas, así como la rotación de cultivos y otras técnicas agronómicas, pueden proporcionar una fuente competitiva y sostenible de proteínas en Europa [4].

La clave para el éxito de cualquier programa de mejora es la disponibilidad de una amplia variabilidad genética de las características de interés. Por lo que la evaluación de la diversidad genética entre poblaciones distantes geográficamente, es un aspecto importante para el desarrollo de líneas de mejora eficientes [5]. Para un aprovechamiento óptimo de los recursos disponibles hoy en día y un mayor conocimiento de la respuesta de los organismos al ambiente es necesario el empleo conjunto de técnicas genómicas y transcriptómicas.

Actualmente, debido a los grandes avances en la metodología de secuenciación y anotación de genomas de leguminosas, junto a los avances técnicos y bioinformáticos, es posible la identificación de genes involucrados en aspectos importantes mediante la sintenia [6]. Hasta el momento los genomas de leguminosas secuenciados son los de soja (*Glycine max*), gandul (*Cajanus cajan*), garbanzo (*Cicer arietinum*), lotus (*Lotus japonicus*), lupino (*Lupinus angustifolius*), alfalfa (*Medicago truncatula*) y judía o fríjol (*Phaseolus vulgaris*) [7]. Por otro lado, está muy avanzada la secuenciación de guisante (*Pisum sativum*), caupí (*Vigna unguiculata*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*).

Debido a la mencionada dependencia de la soja por parte de la Unión Europea y dentro del 7º programa marco, se ha aprobado un proyecto llamado “Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed” (EUROLEGUME). El objetivo último de este proyecto europeo es un uso sostenible de las leguminosas y el suelo, para asegurar fuentes de proteínas de alta calidad en la dieta de los ciudadanos europeos, aumentando la competitividad del cultivo de las legumbres para alimentación humana y animal. El presente proyecto de tesis está enmarcado dentro de este proyecto europeo y tiene como objetivos seleccionar y fenotipar accesiones de haba (*Vicia faba*), guisante (*Pisum sativum*) y caupí (*Vigna unguiculata*) adaptadas al clima mediterráneo, genotipar las accesiones mediterráneas en comparación con accesiones adaptadas a zonas frías e identificar la expresión de genes relacionados con el estrés abiótico y la calidad y cantidad proteica. Además, a través del análisis transcriptómico, obtener un conocimiento profundo sobre la expresión y regulación génica de características como adaptación a estrés abiótico y desarrollo y composición de semillas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo a desarrollar estará compuesto de una serie de trabajos en campo seguidos por trabajos en el laboratorio (Fig. 1).

2.1 Selección de accesiones adaptadas al clima mediterráneo

Mediante el uso de descriptores del “International Board for Plant Genetic Resources” (IBPGR) [8], se caracterizará morfológicamente y se evaluará en campo el comportamiento de

accesiones locales de caupí (Tabla 1), haba y guisante. Los descriptores a tener en cuenta serán el tiempo desde la siembra hasta la floración y la maduración de vainas, la duración de la floración, el tipo de crecimiento (trepador, rastrero, etc.) el peso de las semillas, la incidencia de enfermedades y plagas, la altura de las plantas, la altura hasta la primera vaina, el color de la flor y el número de vainas y semillas por planta.

2.2 Genotipado de diferentes accesiones europeas

Se realizará el genotipado de las distintas especies mediante marcadores moleculares (SNPs). La determinación de las secuencias de los SNPs de caupí se llevará a cabo en EEUU y la del guisante y el haba se hará mediante Next Generation Sequencing (IonTorrent™) en el laboratorio de la Unidad de Genética Molecular del Instituto de Biología Vegetal de la UPCT.

2.2 Análisis bioquímico y de desarrollo de semillas

Se medirá el contenido proteico y el desarrollo de las semillas (flores y vainas) de las accesiones seleccionadas por su comportamiento macroscópico, así como en el genotipado.

2.2 Identificación de genes relacionados con el estrés abiótico y la calidad y contenido proteico

Se realizarán una serie de ensayos en campo con las accesiones seleccionadas con alto contenido proteico. Para ello, se someterá a las plantas a estrés hídrico y se hará un análisis transcriptómico de distintos tejidos (vainas, semillas y hojas).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados esperados de este proyecto de tesis incluyen la identificación de genotipos de caupí, haba y guisante con alto contenido en proteína, buena adaptación agronómica y altas producciones. Este conocimiento facilitará el desarrollo de líneas mejoradas (a partir de las accesiones locales, adaptadas al clima mediterráneo), con buenas aptitudes en campo que sean una fuente sostenible y competitiva de proteína para consumo humano y animal. El genotipado mediante el análisis de SNPs permitirá identificar las relaciones entre las accesiones al nivel genético. El análisis transcriptómico contribuirá a la selección de líneas mejoradas para el estrés abiótico.

4. AGRADECIMIENTOS

Al proyecto EUROLEGUME (EU FP7 Research Project No. 613781) por financiar este proyecto de tesis doctoral.

5. REFERENCIAS

- [1] Graham, P.H. and Vance, C. P. (2003). "Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use," vol. 131, no. March, pp. 872-877.
- [2] Levy, D. (1986). Genotypic variation in the response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to high ambient temperatures and water deficit. F. Crop. Res. 15(1), 85-96.
- [3] FAOSTAT [Online]. Available: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> [Accessed: 8-Apr-2016].
- [4] Nemecek, T., von Richthofen, J. S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R., and Pahl. H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. Eur. J. Agron. 28(3), 380-393.
- [5] Eathington, S. R., Crosbie, T. M., Edwards, M. D., Reiter, R. S., and Bull. J. K. (2007). Molecular Markers in a Commercial Breeding Program. Crop Sci. 47(Supplement_3), S-154.

[6] Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., and Young, N. D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 137), 1228–1235.

[7] Legume Information System. [Online]. Available: <http://legumeinfo.org/home> [Accessed: 8-Apr-2016].

[8] IBPGR (1982). Descriptors for cowpea. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.



Figura 1. A: Detalle de una vaina de caupí. B: Cultivo de caupí al aire libre. C: Secuenciador.

Tabla 1. Acciones de caupí para su caracterización. CRF-INIA: Centro de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. RMS: Red Murciana de Semillas.

Nombre	Institución de origen
BGE022146	CRF-INIA
BGE038474	CRF-INIA
BGE038477	CRF-INIA
BGE038478	CRF-INIA
BGE038479	CRF-INIA
BGE039238	CRF-INIA
BGE040000	CRF-INIA
BGE040818	CRF-INIA
BGE040819	CRF-INIA
BGE044375	CRF-INIA
Vi2	RMS
Vi 3	RMS
Vi4	RMS
Vi 10	RMS
Vi12	RMS
Vi13	RMS