



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**RESPUESTAS GENÉTICAS AL ESTRÉS DEBIDO A  
SEQUÍA EN LENTEJA (*LENS CULINARIS*  
MEDIKUS)**

**GENETIC RESPONSES TO DROUGHT STRESS IN  
LENTIL (*LENS CULINARIS* MEDIKUS)**

Autor: Álvaro Julián Balboa  
**GRADO EN BIOLOGÍA**

**Julio, 2020**



## Índice

- 1. Introducción.....	1
- 2. Material y Métodos.....	6
- 2.1. Material biológico.....	6
- 2.2. Prueba de germinación en presencia de polietilenglicol.....	6
- 2.3. Test de estrés en medio hidropónico.....	7
- 2.4. Extracción y purificación del RNA total.....	8
- 2.5. Síntesis del DNA complementario.....	8
- 2.6. Análisis del cambio de expresión génica por qPCR.....	8
- 3. Resultados.....	10
- 3.1. Prueba de germinación en presencia de polietilenglicol.....	10
- 3.2. Test de estrés medio en hidropónico.....	11
- 3.3. Resultados de la extracción de RNA total.....	12
- 3.4. Análisis del cambio de expresión génica por qPCR.....	14
- 4. Discusión.....	18
- 5. Conclusiones.....	23
- 6. Referencias.....	25

## Resumen

La sequía es uno de los principales estreses abióticos que afectan a los cultivos, y se prevé que en un futuro próximo la frecuencia e intensidad de estos sucesos aumenten debido al calentamiento global. La lenteja es una leguminosa tradicional del Mediterráneo, y aunque se la considera como moderadamente tolerante a la sequía, su producción se ve reducida drásticamente cuando este estrés se presenta en determinados momentos del desarrollo de la planta.

Este trabajo tiene dos objetivos principales. En primer lugar, el desarrollo de una técnica sencilla y rápida para determinar el nivel de tolerancia a la sequía de los diferentes genotipos, y para ello se han empleado dos métodos. Los resultados obtenidos muestran que la primera técnica empleada, enfocada al efecto sobre la germinación, es efectiva. El segundo método, enfocado al efecto sobre las plántulas, deberá ser probada en diferentes condiciones y genotipos para asegurar su efectividad. El segundo objetivo consistió en el análisis de cambios de expresión de 8 genes descritos como parcialmente responsables de la tolerancia para comprobar si podrían utilizarse como marcadores que permitan predecir el grado de resistencia a este estrés. Los datos obtenidos han mostrado diferencias con los esperados según los datos bibliográficos disponibles, lo cual podría deberse a la existencia de diferentes respuestas dependiendo de los genotipos analizados y a la plasticidad de los cambios en el transcriptoma en distintos tejidos ante el déficit hídrico.

**Palabras clave:** *Lens culinaris*, *Lens odemensis*, Medio hidropónico, PEG, qPCR, sequía

## Summary

Drought is one of the main abiotic stresses affecting crops, and the frequency and intensity of these events are expected to increase in the near future due to global warming. Lentil is a traditional Mediterranean legume, and although it is considered to be moderately drought tolerant, its production is drastically reduced when this stress occurs at certain times in the plant's development.

This work has two main objectives. Firstly, the development of a simple and fast technique to determine the level of drought tolerance of the different genotypes, and two methods have been used for this goal. The results obtained show that the first technique used, focused on the effect on germination, is effective. The second method, focused on the effect on seedlings, should be tested under different conditions and genotypes to ensure its effectiveness. The second objective consisted of the analysis of changes in the expression of 8 genes described as partially responsible for tolerance to see if they could be used as markers to predict the degree of resistance to this stress. The data obtained have shown differences with those expected according to the available bibliographic data, which could be due to the existence of different responses depending on the genotypes analyzed and the plasticity of the changes in the transcriptome in different tissues to cope with water deficit.

**Keywords:** Drought, Hydroponic medium, *Lens culinaris*, *Lens odemensis*, PEG, qPCR

## 1. Introducción

Las zonas áridas cubren un 41% de la superficie terrestre, y se estima que para 2100 lleguen a suponer más del 50 % (Yao *et al.*, 2020). Un ejemplo es el sur de Europa donde se ha observado un incremento de la temperatura generando una evapotranspiración mayor en esta zona, y la humedad generada se desplaza a zonas del norte de Europa, lo que causa un sur de Europa más árido y un norte más húmedo (Stagge *et al.*, 2017). La consecuencia de este proceso se puede ver claramente en la desertización de la Península Ibérica mostrada en la Figura 1. Aunque sucesos como este se han observado también en otras zonas como el sureste africano, causando un problema más serio porque se estima que para 2050 ciertas leguminosas ya no se puedan cultivar por la aridez generada, además que la sequía en estas zonas podría afectar a las propiedades nutritivas de los cultivos (Hummel *et al.*, 2018). Esto es un problema mayor porque se suma a que los países en desarrollo tienen más pérdidas en las cosechas al carecer de medios para proteger los cultivos (Daryanto *et al.*, 2015).



Figura 1.: Evolución de la desertización en la Península Ibérica durante la segunda mitad del siglo XX. Los círculos en rojo muestran las zonas que presentan desertización. Fuente: AEMET.

La falta de disponibilidad de agua es uno de los estreses abióticos que más pérdidas causan en la agricultura debido a que la planta muestra problemas en el crecimiento y desarrollo (Betti *et al.*, 2012; Mahmood *et al.*, 2020). Esto se debe a la inhibición de la fotosíntesis y a que el metabolismo general se ve comprometido ante condiciones de déficit hídrico. Por ello aparece una respuesta ante este estrés por parte de la planta, así a nivel celular se produce un ajuste de la membrana, y un conjunto de modificaciones del ciclo y de las divisiones celulares (Krasensky *et al.*, 2012). Estos cambios se ven acompañados por la producción de numerosos compuestos, como solutos osmocompatibles para un reajuste osmótico, y de macromoléculas, que permiten mantener la turgencia celular y protegen a la

célula del daño generado por las especies reactivas del oxígeno que se generan (Bartels *et al.*, 2005).

La adaptación a la sequía está regulada por una compleja interacción entre diversos genes asociados con la señalización celular, como factores de transcripción, proteínas quinasas y fosfatasas, que desencadenan cambios fisiológicos, morfológicos y metabólicos (Ullah *et al.*, 2017; Bashir *et al.*, 2019), siendo claves para el mantenimiento del balance hídrico a través del cierre de estomas, reducción de la transpiración, uso eficaz del agua, acumulación de solutos, un mejor desarrollo radicular, etc. (De Brito *et al.*, 2011). El correcto funcionamiento de la transducción de la señalización desencadena mecanismos de recuperación, permitiendo a las plantas tolerantes a la sequía crecer independientemente de esta condición (Mahmood *et al.*, 2020). Para ello cuando las membranas celulares perciben las señales generadas por el estrés, se activan de manera endógena o mediante fitohormonas diversos mecanismos de señalización (Ullah *et al.*, 2017). Además varios procesos fisiológicos están regulados por segundos mensajeros como el calcio intracelular cuya concentración varía según las condiciones de disponibilidad de agua y de algunas fitohormonas como el ácido abscísico, ácido jasmónico o el etileno (Li *et al.*, 2015). También se activan los mecanismos de defensa contra las especies reactivas del oxígeno, porque durante esta condición adversa aumenta la producción de estas moléculas (Fang *et al.*, 2015). Para la correcta transducción de las señales participan, entre otros, pequeños péptidos, fitohormonas y RNAs no codificantes o ncRNA (Bashir *et al.*, 2019), comenzando así a funcionar las diversas estrategias que las plantas han adquirido para enfrentarse a la sequía, pudiendo actuar más de una a la vez. Las cuatro clases de respuesta más importantes son: a) la evasión, que suele manifestarse como un elevado desarrollo radicular acompañado de una reducción de la transpiración (Fang *et al.*, 2015; Shavrukov *et al.*, 2017), b) la tolerancia, produciéndose un reajuste osmótico que permite soportar condiciones severas de deshidratación (Fang *et al.*, 2015); c) el escape, si la planta modifica su ciclo vital o desarrollo para evitar los periodos de sequía (Fang *et al.*, 2015; Shavrukov *et al.*, 2017), y d) la recuperación, siendo la capacidad de reducir su actividad y retomarla cuando las condiciones son favorables (Fang *et al.*, 2015).

Para lograr estas respuestas es necesario activar una serie de mecanismos, así para la evasión aparece 3 procesos principales:

a) Incremento del desarrollo radicular: a través de la raíz la planta obtiene tanto aporte de agua como de nutrientes, por ello algunas plantas han adquirido la capacidad de

modificar la arquitectura radicular (longitud, ramificación, etc.) para llegar a los horizontes más profundos con mayor humedad.

b) Cambios foliares: las hojas son los órganos por donde se produce la mayor pérdida de humedad. En condiciones con baja disponibilidad de agua puede llegar a suponer un problema, por ello la estrategia que han adquirido algunas plantas es modificar la orientación de las hojas logrando disminuir la radiación que reciben, o incluso enrollar las hojas. También aparecen cambios en los estomas (en el número de estomas, distribución de los estomas y la regulación de su cierre/apertura), incremento de las ceras en la cutícula y aumento de los tricomas en las hojas para reflejar más radiación y retener la humedad.

c) Modificaciones en la fotosíntesis, de la que depende el desarrollo normal de la planta, estando relacionada con la transpiración porque el intercambio gaseoso que se produce en los estomas es una fuente de pérdida de agua. Por ello las plantas han adquirido 3 rutas para la fotosíntesis, el metabolismo C<sub>3</sub>, estas plantas captan el CO<sub>2</sub> durante el día y lo fijan mediante el ciclo de Calvin, el metabolismo C<sub>4</sub>, donde el CO<sub>2</sub> es captado por las células del mesófilo y fijado por las células de la vaina y el metabolismo CAM, donde se capta el CO<sub>2</sub> por la noche, se almacena en vacuolas, y durante el día se fija (Fang *et al.*, 2015).

En la aparición de tolerancia también hay 3 mecanismos generales:

a) Reajuste osmótico: se produce una acumulación de compuestos orgánicos (prolina, glicina, trehalosa, inositol, etc.) e iones inorgánicos, y con ello se logra disminuir el potencial osmótico reteniendo el agua, permitiendo mantener la turgencia, y proteger las membranas y proteínas.

b) Activación del mecanismo de defensa ante oxidantes: el metabolismo aerobio conlleva a la producción de ROS (Especies Reactivas del Oxígeno). En condiciones de aporte suficiente de agua hay un equilibrio entre su producción y detoxificación, cuando aparece la sequía este equilibrio desaparece por lo que para proteger a la célula del daño y finalmente de la muerte celular, activa este mecanismo.

c) Producción de fitohormonas y cambios en la producción de clorofila. La producción de fitohormonas se genera ante diferentes condiciones adversas para coordinar las respuestas de los diferentes tejidos. La principal fitohormona ante la sequía es el ABA (ácido abscísico), entre otras funciones, genera el cierre de estomas y modifica el metabolismo celular. Los cambios en la producción de clorofila están relacionados con los daños generados en las membranas durante el déficit hídrico, durante este suceso la cadena

de transporte de electrones se ve afectada, y para reducir el daño que se puede generar la producción de clorofila disminuye para reducir la fotosíntesis (Fang *et al.*, 2015).

El mecanismo para la respuesta de escape se basa en acortar el periodo vegetativo y entrar en la fase reproductiva antes de que el estrés aparezca, para ello tiene un rápido crecimiento, a pesar de ello, si el estrés coincide en el tiempo con el ciclo vital de la planta esta puede desarrollar mecanismos de evasión hasta la finalización de su ciclo (Shavrukov *et al.*, 2017).

La respuesta de la recuperación no es única de las plantas, también se encuentran en otros organismos. En las plantas un claro ejemplo lo tenemos en *Selaginella lepidophylla*, esta planta puede llegar a perder hasta un 80 % del agua, y cuando se rehidrata continuar su ciclo vital. Para ello mantiene las estructuras celulares sin daños, lo que logra mediante la acumulación de compuestos orgánicos que sustituyen el agua, principalmente trehalosa, aunque también emplea el sorbitol y xilitol, entre otros polialcoholes (Pampurova y Van Dijck, 2014).

Un resumen de las respuestas se muestra en la Figura 2.

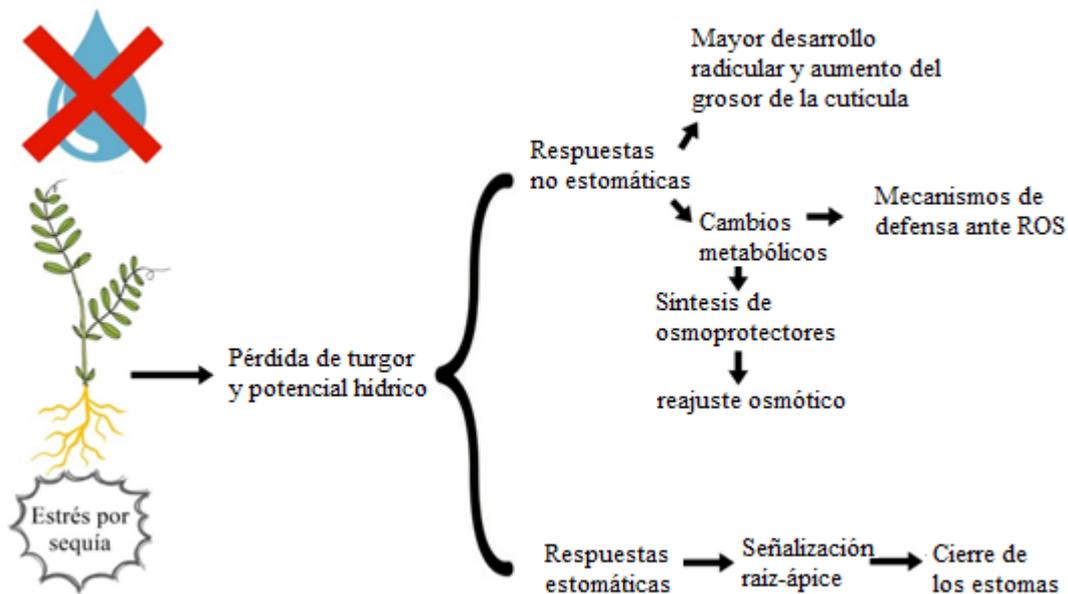


Figura 2.: Esquema general de las respuestas al estrés por sequía.

La lenteja es un cultivo originario del Oriente próximo que rápidamente se extendió por el Mediterráneo, convirtiéndose en un cultivo tradicional de leguminosa. Además sirve como alimento básico en países como la India por ser una fuente rica en proteína vegetal,

glúcidos, fibra, hierro, tiamina y vitamina B6 (Joshi *et al.*, 2017). En España la lenteja es la principal leguminosa importada, aunque la superficie dedicada a su cultivo ha ido aumentando en los últimos años, siendo en 2019 de 50.200 ha, lo que supone una producción en ese año de 35.500 toneladas (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España, 2019).

Aunque el cultivo de lenteja es moderadamente tolerante a la sequía, presenta unas pérdidas en torno al 21-22 %, aunque hay diferencias significativas entre los estadios de la vida de la planta, así en la fase vegetativa suponen en torno al 15 % y en la fase reproductiva entre el 37-43 %. Esta diferencia se debe a que en la fase vegetativa puede aclimatarse modificando su metabolismo y morfología mediante la alteración de la expresión génica, mientras que en la fase reproductiva no dispone de tiempo suficiente para aclimatarse y la formación de la semilla se ve comprometida (Daryanto *et al.*, 2015).

La lenteja ante el estrés hídrico ha adquirido estrategias de evasión, escape y tolerancia, y muestra importantes cambios morfológicos y fisiológicos, como el aumento de la pubescencia en las hojas, una regulación eficaz de la apertura y cierre de los estomas, reajustes osmóticos, un incremento de la respuesta a daño oxidativo, etc. Todo ello reduce la pérdida de agua y posibles daños en tejidos, también aumenta la toma de agua que esté disponible en el ambiente (Gupta *et al.*, 2019). Además la lenteja como leguminosa establece interacciones con bacterias fijadoras de nitrógeno en sus raíces y también forma micorrizas; se ha visto que estas interacciones ayudan a la planta en condiciones adversas al ayudar a la toma de agua y nutrientes, o a facilitar un desarrollo radicular rápido (Krasensky *et al.*, 2012; Daryanto *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2019).

Se ha observado que la tolerancia al estrés por sequía tiene un control poligénico y para comprender su funcionamiento se está analizando el transcriptoma, donde se ha encontrado una gran cantidad de genes involucrados como en el trabajo de Singh *et al.* (2017) cuyos resultados muestran más de 18.000 genes con cambios en expresión, o en el de Morgil *et al.* (2019), que mediante un análisis de RNA-seq observaron en fases iniciales del estrés casi 3.000 genes con cambios de expresión, que aumentaron hasta más de 18.000 cuando el estrés se prolonga en el tiempo. Por ello para poder desarrollar variedades tolerantes a la sequía se ha comenzado a mapear el genoma en busca de QTLs (Quantitative Trait Loci) (Idrissi *et al.*, 2015; Idrissi *et al.*, 2016) y se han empleado marcadores moleculares como Singh *et al.* (2016) que empleó 35 marcadores SSR para estudiar distintos genotipos de lenteja con diversas adaptaciones al déficit hídrico para caracterizar la

diversidad molecular. Además como las especies silvestres de lenteja se encuentran en zonas áridas con sequías frecuentes, son una importante fuente de genotipos para emplear en la mejora de este cultivo (Gorim *et al.*, 2017).

En relación a la respuesta al estrés causado por la sequía en lenteja, este trabajo tiene dos objetivos:

- a) El primero es desarrollar un test simple y rápido para determinar el nivel de tolerancia a la sequía en diferentes genotipos. Para ello se han probado dos métodos diferentes, uno enfocado a ver los efectos sobre la germinación y otro en los efectos sobre plántulas.
- b) El segundo objetivo es el análisis de cambios de expresión génica en ciertos genes descritos como parcialmente responsables de tolerancia a la sequía y su potencial utilización como indicadores de tolerancia a este estrés.

## 2. Materiales y métodos

### *2.1. Material biológico*

Se emplearon dos genotipos de lenteja como material biológico, *Lens culinaris* subsp. *culinaris* cv. *Alpo* Medikus (Alpo) y *Lens odemensis* Ladizinsky ILWL235 (Odemensis). Todas las semillas antes de ser empleadas se desinfectaron del siguiente modo:

1. Un lavado rápido con etanol 70 %.
2. Lavado con agua destilada.
3. Se dejan las semillas durante 3 minutos en hipoclorito sódico al 5 % (lejía comercial apta para la desinfección de agua bebida diluida 3:1, 150 mL de lejía para 50 mL de agua).
4. Lavados con agua destilada estéril hasta la total eliminación del hipoclorito sódico.

Además las semillas de *Lens odemensis* sufrieron un proceso de escarificación para facilitar su germinación.

### *2.2. Prueba de germinación en presencia de polietilenglicol*

Este test se realizó siguiendo las indicaciones de Morgil *et al.* (2019) para determinar el nivel de tolerancia causado por la sequía mediante su efecto sobre la germinación en los diferentes genotipos de lenteja.

Para ello se pusieron a germinar sobre papel de filtro humedecido 10 semillas desinfectadas por placa Petri. Las placas control se humedecieron con solución Hoagland y las placas de tratamiento contenían solución Hoagland y polietilenglicol (PEG MW 6000) al 10 % y 15 %. En todos los casos se realizó la prueba por triplicado.

La solución Hoagland se preparó utilizando sales de Hoagland Modified Basal Salt Mixture (Phytotechnologies laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante, consistentes en preparar una solución 10X (16,3 g Hoagland Modified Basal Salt Mixture en 1 L de agua destilada), posteriormente autoclavada. Para su uso se diluyó a una concentración 1X (100 mL de la solución Hoagland 10X en 900 mL de agua destilada estéril).

Las soluciones de tratamiento se realizaron añadiendo a la solución Hoagland 1X PEG 6000 en la cantidad adecuada (10 %: 10 g en 1 L; 15 %: 150 g en 1 L)

Los datos de germinación se tomaron después de 7 días en una cámara de cultivo con la temperatura controlada a  $25 \pm 1$  °C y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Una vez recogidos los datos se realizó un test de Fisher para comparar los porcentajes de semillas germinadas y no germinadas de las réplicas y los diferentes tratamientos.

### 2.3. Test de estrés en medio hidropónico

La finalidad de esta segunda prueba utilizando medio hidropónico fue evaluar el impacto de la sequía en las plántulas de los diferentes genotipos mediante el método descrito por Singh *et al.* (2013), especialmente para evaluar los cambios de expresión génica. La prueba se realizó por triplicado.

Para ello las semillas tras ser lavadas y desinfectadas se germinaron en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada durante 1 semana. Posteriormente las plántulas fueron trasladadas al medio hidropónico durante 1 semana, y una vez transcurrida comenzó el tratamiento de estrés durante 7 días. Este consistía en dejar fuera del medio hidropónico a las plántulas durante 6 h, exponiendo las raíces al aire, mientras que las plantas control permanecían en el medio hidropónico durante el proceso.

El medio hidropónico se realizó con solución Hoagland 1X, realizada del mismo modo que en el apartado 2.2., cubriendo las raíces de las plántulas y con aireación constante. Las condiciones eran de 25 °C ( $\pm 1$  °C) y con un fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad) y una humedad relativa del 50%.

Una vez finalizado el tratamiento se cuantificó su impacto a nivel visual, evaluando el aspecto foliar y recuperación de la rigidez del tallo tras el tratamiento, también se comprobó si se producían diferencias en el desarrollo entre el control y el tratamiento. Una vez finalizado el tratamiento se procedió la extracción del RNA total.

#### 2.4. Extracción y purificación del RNA total

Las hojas y raíces de todas las plántulas fueron cosechadas y congeladas con nitrógeno líquido para su pulverización y extracción del RNA total.

La extracción del RNA total se realizó con el kit PureLink RNA minikit de la compañía NZY Technologies siguiendo las indicaciones proporcionadas por la empresa. Posteriormente se evaluó su calidad y cantidad con el espectrofotómetro NanoDrop™ 100. El RNA extraído de *L. odemensis* presentó indicios de contaminaciones por lo que fue limpiado para mejorar su calidad. Para ello se precipitaron 100 µL de la solución de RNA empleando 10 µL de acetato sódico 3 M (pH 5.0) y 110 µL de isopropanol incubando durante 12 h a -20 °C. Finalizada la precipitación se procedió a la digestión con RQ 1 DNAsa a 37 °C durante 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se paró la reacción con STOP RQ 1 DNAsa e incubando a 65 °C durante 10 minutos. Se volvió a evaluar la calidad y cantidad con el espectrofotómetro Nanodrop™ 100. Todas las muestras fueron conservadas a -80 °C.

#### 2.5. Síntesis del DNA complementario (cDNA)

Con el RNA total extraído y preparado se procedió a elaborar el cDNA. Para ello se empleó el kit High-Capacity RNA-to-cDNA de la empresa Applied Biosystems siguiendo las instrucciones del fabricante. En el proceso se empleó un termociclador y la incubación se realizó en 3 pasos, el primero consistió en una incubación a 37 °C durante 60 min, el segundo fue un incremento de temperatura a 95 °C durante 5 min y el último mantener la muestra a 4 °C hasta su almacenamiento a -20 °C. Con el cDNA obtenido se realizó una dilución 1:10 para su uso en las qPCR.

#### 2.6. Análisis del cambio de expresión génica por qPCR

Se empleó la  $\beta$ -tubulina (Singh *et al.*, 2017) y RPL2 (Proteína Ribosomal L2) (Sinha *et al.*, 2019) como genes de referencia por su expresión constitutiva. Para los 8 genes estudiados se emplearon los *primers* de la tabla 1, que fueron diseñados empleando

Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). Los genes seleccionados han sido descritos por Singh *et al.* (2017) y Takahashi *et al.* (2018) como parcialmente responsables de la tolerancia a la sequía en diferentes genotipos de lenteja.

Se prepararon 3 réplicas técnicas por muestra, cada una contenía 7,5  $\mu$ L de Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 2  $\mu$ L de cDNA y 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, añadiendo agua milli-Q hasta un volumen final de 15  $\mu$ L. La RT-qPCR fue realizada en el instrumento StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems™), mediante el siguiente programa: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min, y una fase final de desnaturalización de 60 °C hasta 95 °C con incrementos de 0,3 °C. La eficiencia de la amplificación para cada pareja de *primers* fue estimada mediante el software LingRegPCR v2017.1 (Ruijter *et al.*, 2009). El análisis del cambio de expresión génica fue realizado con el método de comparación  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ), implementado en el software StepOne™ v 2.3 (Life Technologies).

Tabla 1.: *Primers* usados en el análisis del cambio de expresión génica por qPCR

<i>Primer</i>	Secuencia	Gen
$\beta$ -tubulina	5' -GGATTTGCTCCTTTGACCTC-3' 3' -CTTGGCATCCCACATTTGTT-5'	$\beta$ -tubulina
RPL2	5' -ATTGAGCTGAACCCAGGACAA-3' 3' -GACGTGGGCTCCTATCAGATC-5'	RPL2
Lc15367	5' -TGTGGTTGTGGAAGCAGTTG-3' 3' -GGTTTCCATTTCCGAGTAGC-5'	MT2A
Lc10328	5' -AACCCCTTGCC TAATGCCTTC-3' 3' -TTGCAGAGTATCCAGTTGCTC-5'	SRG1
Lc18699	5' -CAAGAACGACGAATGGCATC-3' 3' -TTTGG AACGGT GACTGTGAG-5'	HSP70
Lc15650	5' -GAGCAAACATCGAAACAAG-3' 3' -TTGAACCACA ACTCTAGCTTCC-5'	WRKY33
Lc21899	5' -GCATGATGTTGAGGAGTTTGC-3' 3' -CACTTTGAAGTGCTTGACCATC-5'	STM
Lc20116	5' -CGATGAGAAGTGGATGAAACAC-3' 3' -ACGAGCTTTAGGAGGGAATG-5'	SDH-1
Lc28037	5' -AAGCCGGAGAGACGATTAAG-3' 3' -GTTGCTGCCTCTTTTTGCAC-5'	LEA4-5
Lc07617	5' -GAGAAGAGTACCAAATGGACCTG-3' 3' -CATGCTTGATTAGGTGGTTGTC-5'	CLE25

### 3. Resultados

#### 3.1. Prueba de germinación con PEG 6000

Los resultados visuales de la prueba de germinación con PEG 6000 se muestran en la Figura 3, donde se observa un mayor desarrollo radicular en Alpo. Los datos obtenidos se sometieron al test de Fisher para detectar las posibles diferencias estadísticamente significativas entre semillas germinadas y no germinadas; entre las tres réplicas de los diferentes tratamientos no se encontraron diferencias significativas. Posteriormente se procedió a comparar los genotipos en los diferentes tratamientos, observándose diferencias significativas en la concentración de 15 % de PEG al obtener un valor inferior de  $p < 0,05$ , determinando que el genotipo Alpo era más tolerante que el genotipo Odemensis a la sequía. Los datos recogidos se muestran en la tabla 2 con los que se elaboró la Figura 4.

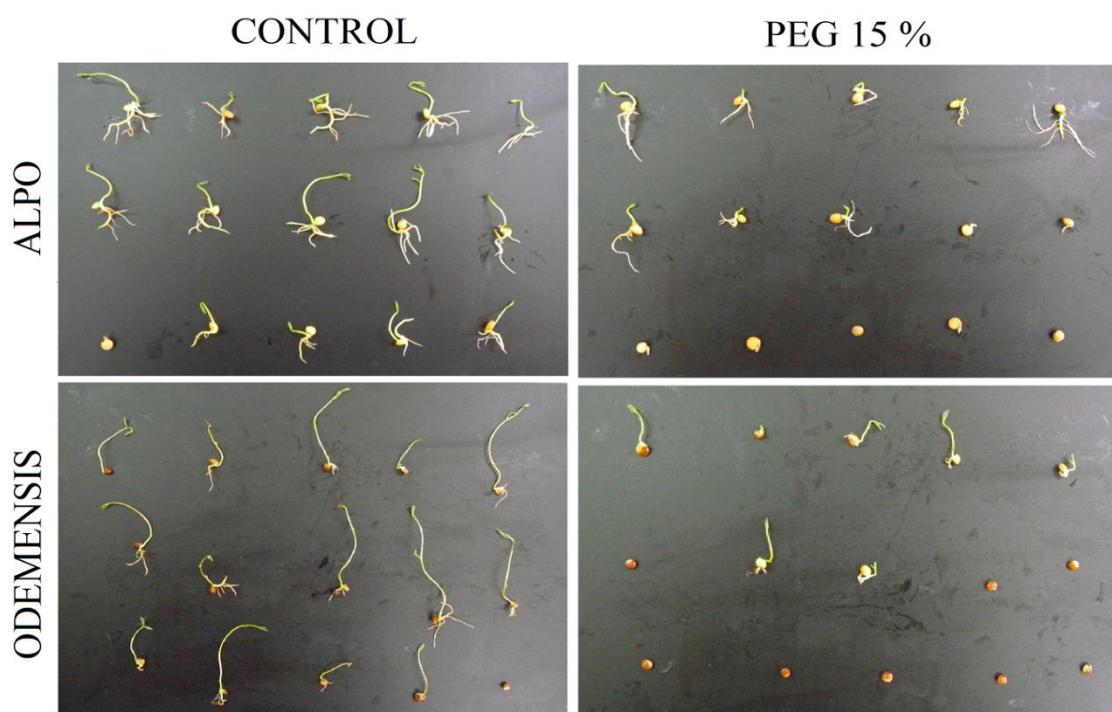


Figura 3.: Efecto sobre la germinación por el tratamiento con PEG

Tabla 2.: Tasa media de germinación  $\pm$  desviación estándar, en porcentaje, de los diferentes tratamientos.

	Control	PEG 10 %	PEG 15 %
Alpo	96,6 $\pm$ 8,1	93,3 $\pm$ 6,1	43,3 $\pm$ 2,2
Odemensis	90,0 $\pm$ 7,2	83,3 $\pm$ 5,3	13,3 $\pm$ 1,1
Test de Fisher	$p = 0,61$	$p = 0,42$	$p = 0,03$

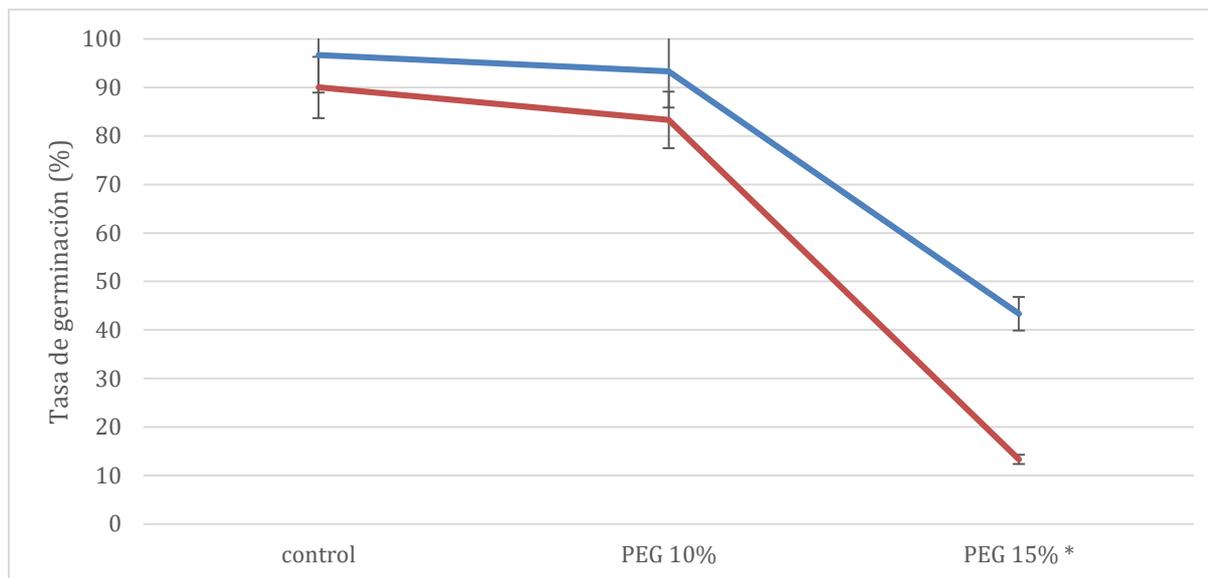


Figura 4.: Gráfica del efecto sobre la germinación por el tratamiento con PEG, en azul Alpo y en rojo *L. odemensis*. Las barras de error muestran el error estándar. (\*) Diferencias significativas entre los genotipos.

### 3.1. Test de estrés en medio hidropónico

Ambos genotipos germinaron tras una semana en un porcentaje mayor del 90 %, y se trasladaron al medio hidropónico (Figura 5); tras una semana en dicho medio empezó el tratamiento. Se analizaron visualmente, siguiendo la escala de Singh *et al.* (2013) para clasificar la tolerancia a la sequía, siendo: 0 para plantas sanas sin síntomas, 1 para plantas verdes con ligero marchitamiento, 2 para plantas con hojas verdes y partes ligeramente amarillas, además con un marchitamiento moderado, 3 para plantas con hojas amarillas-pardas con un marchitamiento severo, y 4 para plantas con hojas secas y muertas. Una vez finalizada la exposición diaria de las raíces al aire, se observaron los efectos que mostraban las plántulas, presentando una ligera epinastía y falta de rigidez de los tallos. En ambos genotipos hubo una recuperación al regresar al medio hidropónico. A largo plazo no se apreciaron diferencias notables en el desarrollo de la plántula entre el control y el tratamiento, o entre los genotipos. Las plántulas solo mostraron ligeros signos de estrés, en los ápices de los folíolos aparecieron indicios de clorosis en ambos genotipos, mostrándose la diferencia entre el primer día antes del tratamiento y el último día en la Figura 6, donde se expone el genotipo Alpo como ejemplo. Basándose en los resultados obtenidos por Singh *et al.* (2013), donde observaban que los genotipos tolerantes se recuperaban al regresar al medio hidropónico, se determinó que tanto los genotipos Alpo como Odemensis eran

tolerantes a la sequía, y clasificando a ambos genotipos según la escala empleada en un valor de 1.

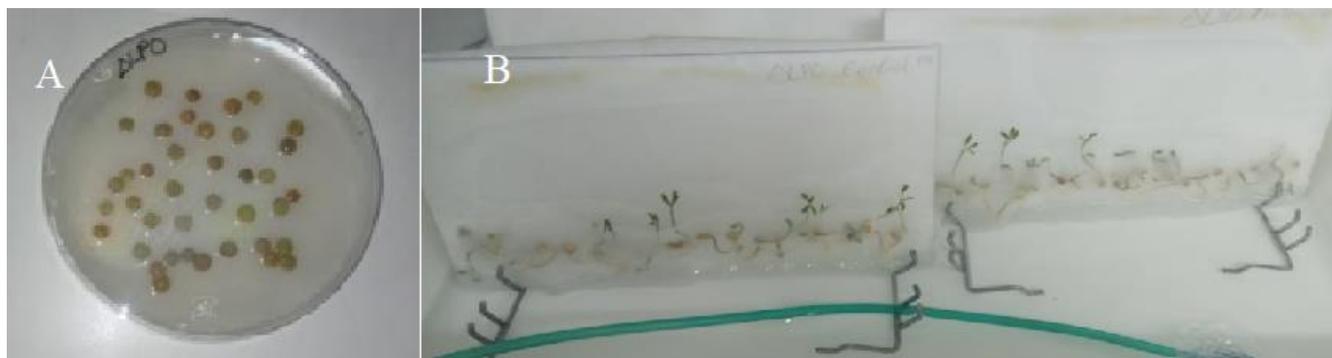


Figura 5.: Efecto de la simulación de sequía sobre plántulas. A muestran las semillas empleadas para la germinación del genotipo Alpo, y B muestra las plántulas en el medio hidropónico del genotipo Alpo.

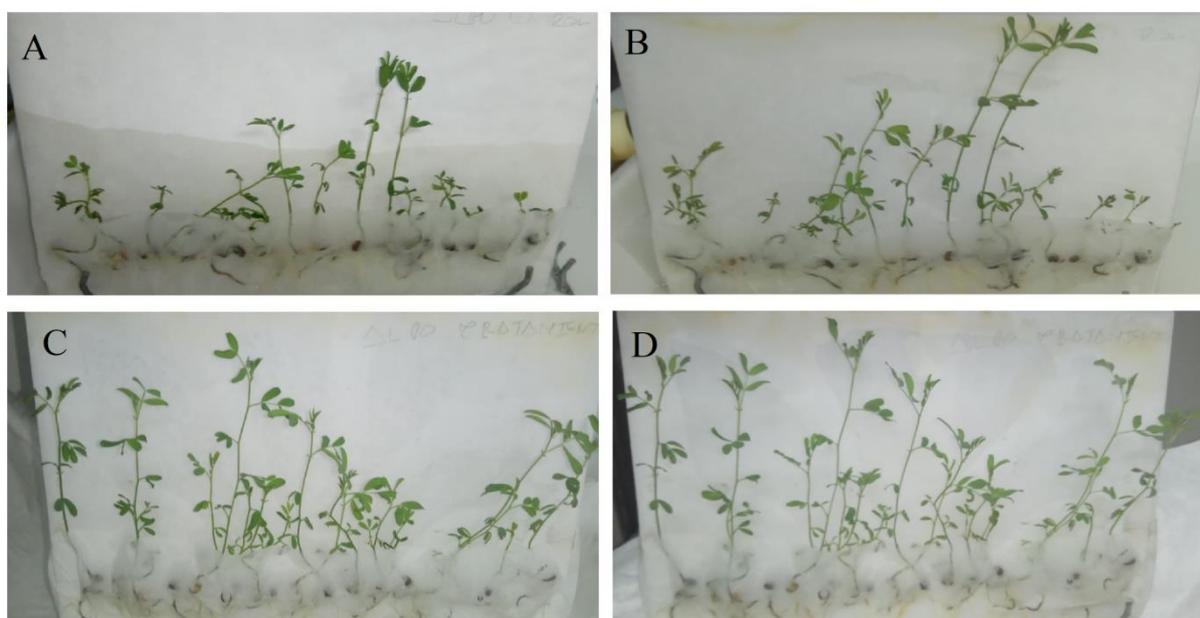


Figura 6.: Efecto de la simulación de sequía sobre plántulas de Alpo. A y B son el control, A es a tiempo 0 y B tras una semana. C y D son el tratamiento, C es a tiempo 0 y D tras una semana.

### 3.3. Resultados de la extracción de RNA total

Se midió la cantidad de RNA total extraído mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 100, los resultados se muestran en la tabla 3, y Figuras 7 y 8.

Para estimar la calidad del RNA obtenido se emplea la relación de absorbancia 260/280 que nos indica contaminación por proteínas, debido a que las proteínas presentan la absorbancia máxima a una longitud de onda de 280 nm, los valores entre 1,8-2 son muestras de RNA puras. También se empleó para la calidad la relación de absorbancia 260/230 donde valores entre 1,5-2,2 indican extracciones óptimas, y si son inferiores presencia de contaminantes (sales, glúcidos y fenoles) (Subhra y Chakraborty, 2009).

Tabla 3.: Resumen de la cantidad y calidad del RNA total extraído, medido con el espectrofotómetro NanoDrop™ 100, empleando agua milli-Q como blanco. (\*) Resultados de las muestras tras la limpieza.

Muestra	Abs. 260 nm	relación 260/280	relación 260/230	Concentración (ng/μL)
Alpo Hoja Control	21,95	2,12	2,23	878,2
Alpo Raíz Control	7,86	2,09	2,23	314,6
Alpo Hoja Tratamiento	13,24	2,13	2,30	529,7
Alpo Raíz Tratamiento	5,67	2,09	1,85	226,9
Odemensis Hoja Control	25,75	2,13	2,2	1030,3
Odemensis Raíz Control*	5,82	1,96	2,07	233,1
Odemensis Hoja Tratamiento*	10,40	1,94	2,19	416,1
Odemensis Raíz Tratamiento*	1,87	1,80	1,63	74,9

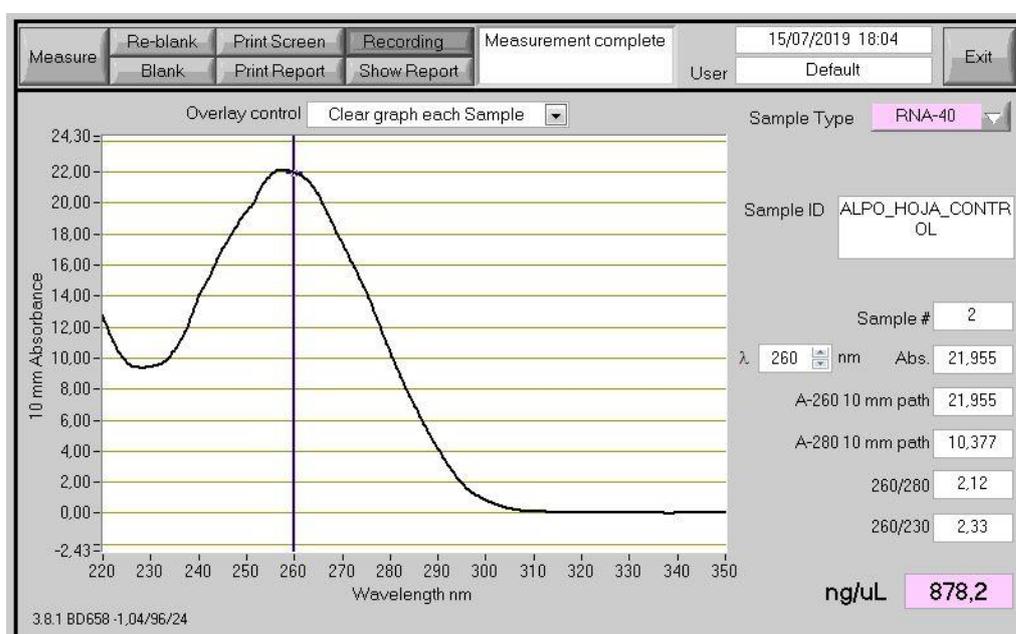
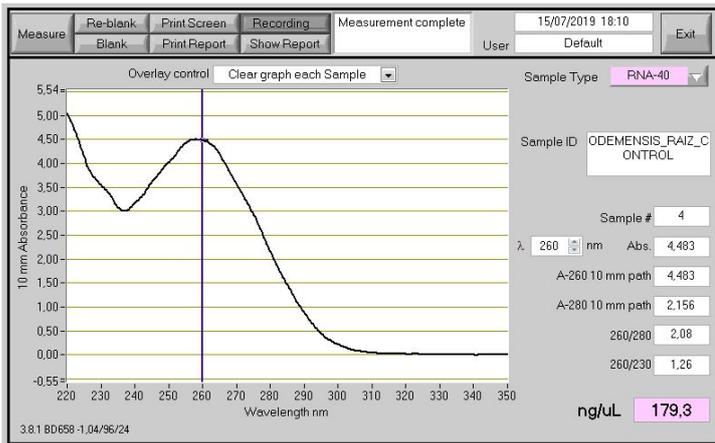


Figura 7.: Medición del RNA total extraído del control de hoja de Alpo.

A



B

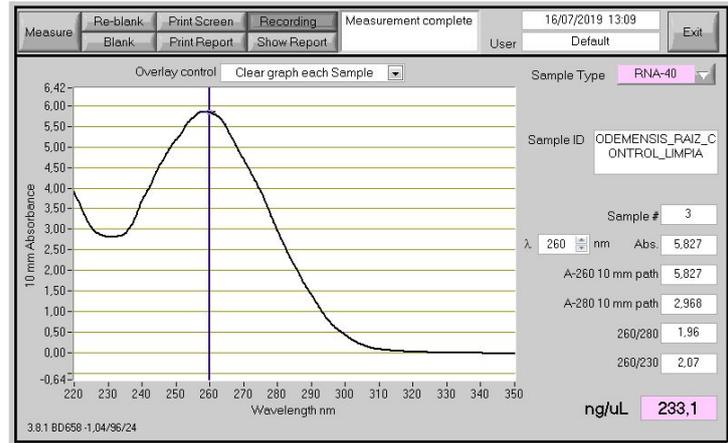


Figura 8.: Medición del RNA total extraído antes (A) y después (B) de la limpieza del control de raíz de Odemensis.

### 3.4. Análisis del cambio de expresión génica por qPCR

Los niveles de cambio de expresión de los genes seleccionados se muestran en las figuras 9, 10, 11 y 12. Los resultados fueron transformados a  $\log_2$  para una comparación más sencilla, debido a que permite distinguir de forma rápida el nivel de incremento o descenso de expresión de un gen. Los datos fueron analizados con LingRegPCR v2017.1 (Ruijter *et al.*, 2009) para determinar la eficacia de la amplificación y los posibles errores (Tabla 4). Todos los *primers* empleados mostraron una eficiencia en la amplificación superior a 1,9.

En el genotipo Alpo hay un cambio en la expresión significativo de todos los genes analizados de la hoja, aunque destaca *LEA4-5* con un incremento de 3,3, y *SRG1* disminuyendo 3,5 veces; mientras que en la raíz los genes *CLE25* y *WRKY33* no presentan diferencias significativas respecto el control, pero al igual que en hoja los genes *LEA4-5* y *SRG1* son los que más destacan, *LEA4-5* con un incremento de 30,9 y *SRG1* reduciéndose su expresión 125 veces. Los resultados en Odemensis muestran que en el gen *STM* no ha habido cambios significativos de su expresión en toda la planta, además los genes *HSP70* y *SDH-1* en la hoja, y los genes *MT2A*, *SRG1* y *WRKY33* en la raíz, tampoco difieren respecto al control. Aunque encontramos que *LEA4-5* en la hoja de Odemensis es el que muestra mayor cambio de expresión con un incremento de 200,3, mientras que en la raíz el de mayor cambio es *HSP70* que disminuyó 4,3 veces. Por tanto los genes que más cambian en condiciones de sequía en el genotipo “tolerante” (Alpo), aunque con un cambio más severo

en raíz, son *LEA4-5* y *SRG1*, curiosamente en la raíz del genotipo “susceptible” (Odemensis) el gen *SRG1* no presenta cambios significativos en su expresión.

Tabla 4.: Media con la desviación estándar de la eficacia de la aplicación por primer

<i>Primer</i>	Gen	Eficacia amplificación
$\beta$ -tubulina	<i><math>\beta</math>-tubulina</i>	1,931 $\pm$ 0,036
RPL2	<i>RPL2</i>	1,954 $\pm$ 0,079
Lc15367	<i>MT2A</i>	1,968 $\pm$ 0,077
Lc10328	<i>SRG1</i>	1,902 $\pm$ 0,056
Lc18699	<i>HSP70</i>	1,907 $\pm$ 0,094
Lc15650	<i>WRKY33</i>	1,908 $\pm$ 0,070
Lc21899	<i>STM</i>	1,933 $\pm$ 0,017
Lc20116	<i>SDH-1</i>	1,917 $\pm$ 0,059
Lc28037	<i>LEA4-5</i>	1,939 $\pm$ 0,028
Lc07617	<i>CLE25</i>	1,940 $\pm$ 0,028

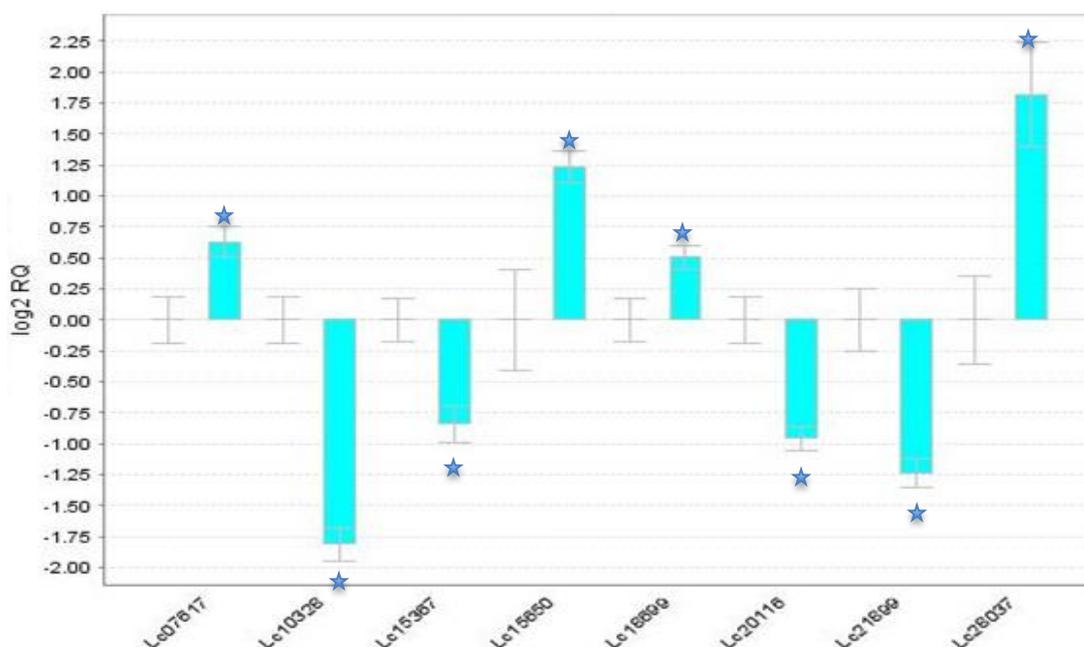


Figura 9.: Perfil de expresión relativa de los genes de la hoja de Alpo, obtenido por qPCR mediante el método de comparación  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ), empleando como controles internos la  $\beta$ -tubulina y RPL2. Las barras de error muestran el límite de confianza al 95 %. La correspondencia de los nombres de los *primers* con los genes es: CLE25, SRG1, MT2A, WRKY33, HSP70, SDH-1, STM y LEA4-5. (\*) Diferencias estadísticamente significativas.

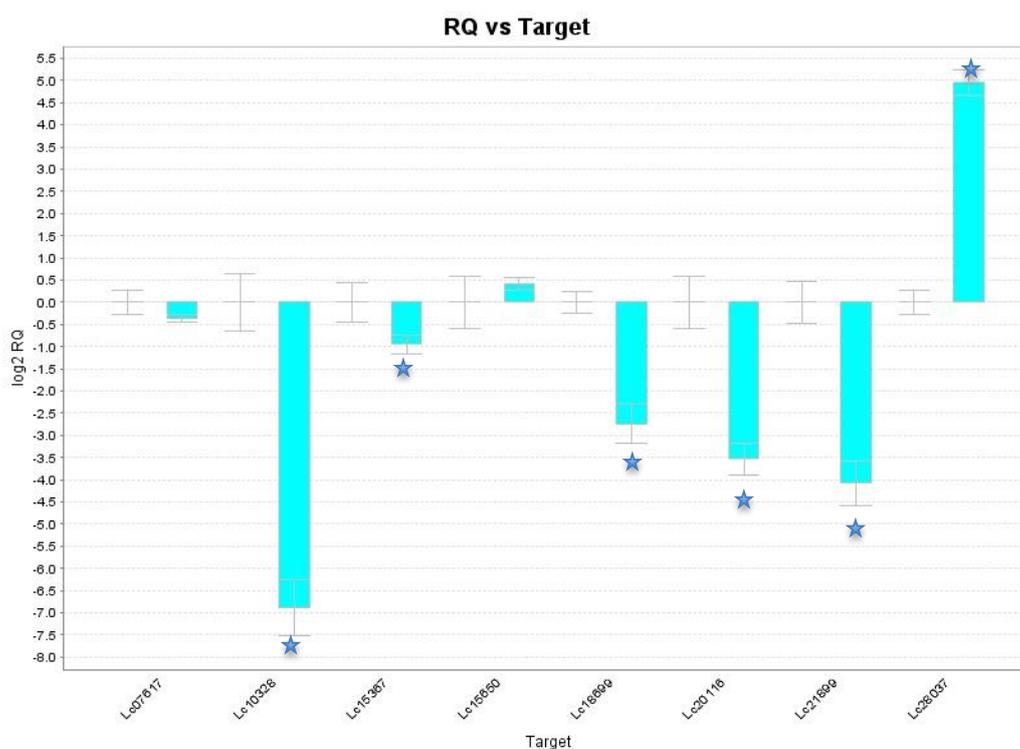


Figura 10.: Perfil de expresión relativa de los genes de la raíz de Alpo, obtenido por qPCR mediante el método de comparación  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ), empleando como controles internos la  $\beta$ -tubulina y RPL2. Las barras de error muestran el límite de confianza al 95 %. La correspondencia de los nombres de los *primers* con los genes es: CLE25, SRG1, MT2A, WRKY33, HSP70, SDH-1, STM y LEA4-5. (\*) Diferencias estadísticamente significativas.

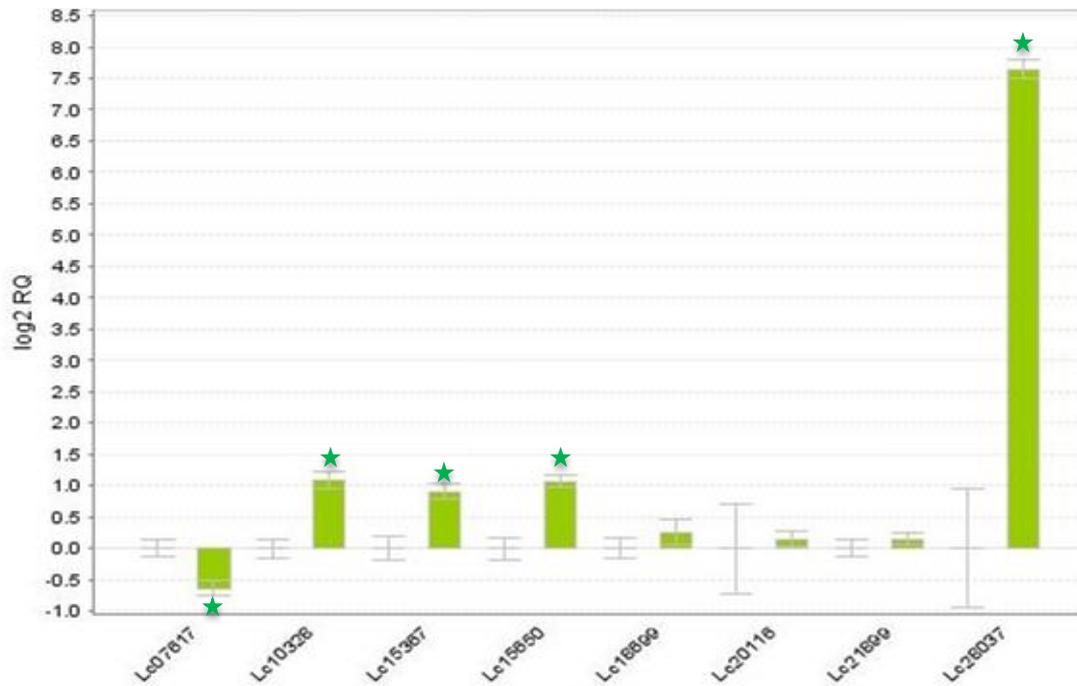


Figura 11.: Perfil de expresión relativa de los genes de la hoja de Odemensis, obtenido por qPCR mediante el método de comparación  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ), empleando como controles internos la  $\beta$ -tubulina y  $RPL2$ . Las barras de error muestran el límite de confianza al 95 %. La correspondencia de los nombres de los *primers* con los genes es: *CLE25*, *SRG1*, *MT2A*, *WRKY33*, *HSP70*, *SDH-1*, *STM* y *LEA4-5*. (\*) Diferencias estadísticamente significativas.

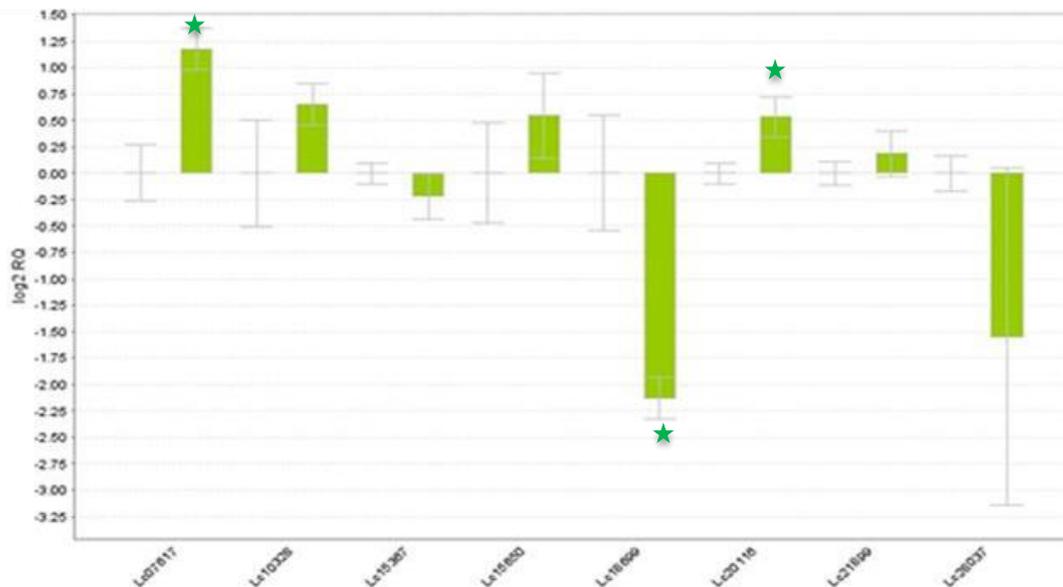


Figura 12.: Perfil de expresión relativa de los genes de la raíz de Odemensis, obtenido por qPCR mediante el método de comparación  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ), empleando como controles internos la  $\beta$ -tubulina y  $RPL2$ . Las barras de error muestran el límite de confianza al 95 %. La correspondencia de los nombres de los *primers* con los genes es: *CLE25*, *SRG1*, *MT2A*, *WRKY33*, *HSP70*, *SDH-1*, *STM* y *LEA4-5*. (\*) Diferencias estadísticamente significativas.

#### 4. Discusión

La lenteja es un cultivo moderadamente tolerante a la sequía respecto otras leguminosas, a pesar de ello la producción puede verse afectada en mayor o menor medida dependiendo de la fase vital en la que aparezca esta situación, y la intensidad y duración del déficit hídrico (Muscolo *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2019). Debido al calentamiento global y a que se cultiva en zonas áridas o semiáridas es necesario el desarrollo de variedades más tolerantes a la sequía para mantener la producción a pesar de las condiciones adversas (Foti *et al.*, 2018). Para ello se requiere el desarrollo de métodos sencillos, rápidos y económicos que permitan estudiar una alta cantidad de genotipos en un espacio reducido. En este trabajo se han comprobado dos métodos, uno basado en la tasa de germinación en condiciones de estrés, empleándose PEG para inducirlo, y otro enfocado a observar los efectos sobre plántulas, mediante un cultivo hidropónico en el que se genera el estrés al exponer las raíces al aire. Se han elegido estos dos métodos porque actúan sobre momentos críticos para el desarrollo de la planta, además ya se han empleado ambos métodos en varios estudios con lenteja y muchas otras especies.

El empleo de PEG es efectivo para inducir un estrés por sequía, siendo muy útil para generar esta condición durante la germinación, lo que permite seleccionar genotipos; además se trata de una técnica muy sencilla al permitir un fácil control de la intensidad del estrés, y requiere poco espacio (Muscolo *et al.*, 2014; Foti *et al.*, 2018). Por otro lado, aunque este método debe ser optimizado para conseguir la discriminación fenotípica en cada especie, el tiempo requerido en ello es muy corto. Un ejemplo reciente aparece en Hellal *et al.* (2018) donde se determinó que la concentración óptima en cebada es del 10 %. La utilidad práctica de la utilización de PEG nos la proporciona el trabajo de Roy *et al.* (2019), los cuales han empleado este compuesto en lenteja para la selección de diferentes genotipos y han conseguido obtener una nueva variedad tolerante.

El método del medio hidropónico fue empleado por Singh *et al.* (2013) para determinar la tolerancia de 80 genotipos, y más recientemente (Singh *et al.*, 2016) lo empleó sobre 278 genotipos para caracterizar mediante marcadores SSR la diversidad molecular que existe frente a la sequía. De sus resultados dedujeron por los genotipos obtenidos que la tolerancia a la sequía se basaba muchas veces en genes diferentes en las especies silvestres, las cuales representaban una importante reserva de genes únicos con

potencial utilización en los programas de mejora. Comparando el método del cultivo hidropónico con los métodos de campo o en macetas, Singh *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares. Las ventajas principales de esta técnica son que es más práctica al ser muy sencilla la manipulación y control, y el poco espacio requerido, además al ser una técnica no destructiva permite trasladar las plantas al campo para estudios posteriores, y estudiar los mecanismos moleculares. Como inconveniente Singh *et al.* (2013) señalaron que para los genotipos muy susceptibles la exposición puede ser demasiado intensa, lo que conlleva a la muerte de la planta, aunque con una monitorización adecuada se puede obviar este problema.

Por tanto, en este trabajo se ha empleado el PEG y el medio hidropónico para determinar el nivel de tolerancia a la sequía de los genotipos estudiados, aunque solo el medio hidropónico para estudiar los cambios de expresión génica.

Los resultados obtenidos con la prueba con PEG han demostrado la efectividad para discriminar los diferentes genotipos de lenteja utilizando una concentración del 15 %, aunque en este trabajo los datos fueron recogidos tras una semana, en otros estudios se ha observado disminuida la tasa de germinación en las primeras horas, pero luego se va recuperando. En el trabajo de Foti *et al.* (2018) se observa una drástica disminución de la germinación en una concentración de PEG al 20 % en el primer día, y a partir del segundo día empieza a ser cercana al 100 %; mientras que Muscolo *et al.* (2014) con una concentración del PEG al 15 %, al igual que este trabajo, obtiene en el primer día tasas de germinación entre el 15-47 %, que tras 3 días se alcanza entre el 61-93 %. En este trabajo además de la tasa de germinación se observaron diferencias morfológicas entre los genotipos testados, presentando Alpo un mayor desarrollo radicular que Odemensis. Esto es una característica observada por Muscolo *et al.* (2014) en los genotipos tolerantes. Por tanto, esta característica morfológica y la tasa de germinación de Alpo de aproximadamente del 43 % permite concluir que es un genotipo con tolerancia a la sequía.

En los resultados obtenidos en el medio hidropónico no se han detectado diferencias notables en los genotipos empleados. Esto es debido a que la intensidad del estrés fue menos severa que en el test PEG, porque estaba enfocado a estudiar las respuestas génicas tanto en hoja como en raíz, y en condiciones severas de déficit hídrico el desarrollo de estas se ve comprometido. Además la exposición de las raíces al aire puede causar un daño irreversible o temporal, dependiendo de la humedad relativa del aire, y de la tolerancia del genotipos (Singh *et al.*, 2013; Osmolovskaya *et al.*, 2018). A pesar de ello, acorde con los

resultados obtenidos por Singh *et al.* (2013) y la escala empleada para determinar el efecto sobre la planta de la exposición, ambos genotipos presentan un valor de 1, es decir, plantas verdes con ligeros síntomas de estrés y marchitamiento. Considerando que no se encontró mortalidad durante el tratamiento ni se vio afectado el crecimiento, se consideran ambos genotipos tolerantes. De todos modos podemos señalar que este método debería ser probado con más genotipos y diferentes condiciones para determinar el tratamiento óptimo para la discriminación de genotipos.

La sequía causa alteraciones en la expresión de genes involucrados con la percepción del estrés, la transducción de señales, la maquinaria de protección celular y las rutas metabólicas (Sinha *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2020), sufriendo la planta por tanto una reprogramación del transcriptoma (Betti *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017; Morgil *et al.*, 2019). En lenteja ante el déficit hídrico en toda la planta se produce principalmente un incremento en la expresión de los genes encargados de los procesos de óxido-reducción, el correcto plegamiento de proteínas, ciclo de los ATC (ciclo de los ácidos tricarboxílicos), la cadena de transporte de electrones, senescencia y de la conductancia de los estomas; mientras que los genes encargados con la síntesis de GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) y síntesis de proteínas de la pared celular muestran una menor expresión (Singh *et al.*, 2017; Sinha *et al.*, 2018). Aunque la respuesta de los tejidos difiere según el tiempo, observándose primero una respuesta en la raíz, donde cambia la expresión de genes relacionados por la señalización por ABA para provocar el cierre de los estomas y reducir la transpiración, pero cuando el estrés se prolonga en el tiempo la regulación de la transcripción es más importante en hoja (Morgil *et al.*, 2019).

Los perfiles de expresión génica en los genotipos (Alpo y Odemensis) difieren. La diferencia entre los genotipos de la expresión de algunos genes podría servir para explicar las diferencias observadas en el test con PEG, y ayudar a entender la importancia de cada gen en el mecanismo de respuesta de la planta ante el estrés hídrico, pudiendo emplear ese gen como indicador de la tolerancia a la sequía de los genotipos.

El gen *CLE25* (*CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION RELATED 25*) codifica para un péptido que señala la deficiencia de agua desde la raíz a la hoja, debido a que al asociarse con los receptores BAM (*BARELY ANY MERISTEM*) regula el control estomático y promueve la expresión del gen *NCED3*, que codifica para una enzima clave de la biosíntesis de ABA; por lo que su expresión aumenta en la raíz en condiciones de sequía (Takahashi *et al.*, 2018). En este trabajo el comportamiento es diferente entre los genotipos,

mientras que en Alpo encontramos que en la raíz que se ha reducido un cuarto en su expresión, aunque de manera no significativa, y un incremento de expresión significativo en hoja con un valor de 1,5; en Odemensis se produce un cambio de expresión significativo en toda la planta, en la raíz se produce un incremento con un valor de 2,2, y en la hoja se reduce a la mitad su expresión.

El gen *SRG1* está relacionado con la senescencia foliar, proceso en el que se empiezan a degradar los componentes celulares, a perder la actividad fotosintética y un declive general del metabolismo, y con los procesos de óxido-reducción al codificar para un miembro de la familia Fe(II)/ascorbato oxidasa, proteína que también tiene funciones de dioxigenasa y en la unión a iones metálicos (Ascensio-Ibanez *et al.*, 2008; Khrisnaswamy *et al.*, 2008). En el trabajo de Singh *et al.* (2017) este gen mostró un incremento en la hoja de tanto el genotipo tolerante como susceptible, aunque ligeramente mayor en el tolerante. En este trabajo se ha observado un comportamiento diferente en este gen. En Alpo se reduce la expresión de este gen en toda la planta, aunque el cambio está más acentuado en raíz, presentando una reducción en hoja de 3,5 veces y en raíz de 125 veces. Mientras en Odemensis sí se presenta un incremento de su expresión en toda la planta, siendo mayor en la hoja, con valores en hoja de 2,1 y en raíz de 1,5, aunque en este último caso no alcanza la significación estadística.

El gen *MT2A* codifica para proteína similar a metalotioneína siendo una molécula de bajo peso molecular rica en cisteína y que se une a metales. Tiene un papel clave en la homeostasis del Cu durante la senescencia foliar y la movilización del Cu durante el correcto desarrollo de la semilla. En condiciones de déficit de agua se induce un aumento de su expresión, que entre otras funciones, ayuda con la detoxificación de los metales (Benatti *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017). En el trabajo de Singh *et al.* (2017) se reportó que solo cambiaba su expresión en la hoja del genotipo tolerante, observándose una menor expresión. En este trabajo se observó en Alpo se reducía su expresión a la mitad tanto en hoja y raíz; en Odemensis la raíz mostraba un comportamiento similar a Alpo, pero de manera no significativa, aunque la hoja si presentaba un incremento significativo de su expresión con un valor de 1,8.

El gen *WRKY33* pertenece a la familia génica *WRKY* que codifica factores de transcripción exclusivos de las plantas, y están caracterizados por tener una secuencia *WRKY* altamente conservada. Se han asociado con importantes procesos fisiológicos en plantas, como el crecimiento y metabolismo, y respuesta a estreses abióticos y bióticos

(Gong *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Liao *et al.* 2016; Fei *et al.*, 2019). La expresión de estos genes es clave en estadios iniciales del estrés por sequía, esto es debido a que permite una mayor sensibilidad a ABA, además de estar relacionado con las rutas de señalización JA (ácido jasmónico) y MAPK (Zhou *et al.*, 2015; Fei *et al.*, 2019). Singh *et al.* (2017) han descrito que el incremento de expresión de este factor transcripcional es clave en la tolerancia a sequía debido a que reprime la expresión de un gen, *Ces8A*, que promueve la sensibilidad a este tipo de estrés. En sus resultados observaron un incremento de su expresión en la hoja tanto en el genotipo tolerante como susceptible, aunque en el genotipo tolerante el aumento de expresión es dos veces mayor que en el susceptible. En este trabajo también se produjo un incremento de expresión en las hojas de ambos genotipos, pero con valores similares, siendo en Alpo un incremento de 2,3 y de 2,1 en Odemensis.

El gen *HSP70* codifica para una chaperona que aparece en el retículo endoplasmático, en condiciones de estrés hídrico aumenta la cantidad de proteínas con errores en el plegamiento, por lo que los genes de las chaperonas suelen incrementar su expresión para compensar este problema (Singh *et al.*, 2017; Priya *et al.*, 2019). En el trabajo de Singh *et al.* (2017) en la hoja de ambos genotipos (tolerante y susceptible) presentaron un importante incremento de expresión de este gen. En este trabajo Alpo y Odemensis presentan un comportamiento similar, mostrando un incremento de expresión en hoja, con un valor de 1,4 y de 1,1, respectivamente, aunque en este último caso no alcanzó la significación estadística; mientras que en la raíz se reduce su expresión en Alpo 6 veces y en Odemensis 4,3 veces.

El gen *SDHI*, es la subunidad de flavoproteína de la succinato:ubiquinona oxidoreductasa, tiene un papel clave el transporte de electrones y en ATC, al formar parte complejo II de la cadena de transporte de electrones aunque se ha visto que su expresión aumenta en condiciones de sequía en las plantas tolerantes (Acevedo *et al.*, 2013). En el trabajo de Singh *et al.* (2017) se produjo un comportamiento similar en las hojas del genotipo tolerante y susceptible, donde se incrementó la expresión de este gen, aunque de ligeramente mayor en el genotipo susceptible. En este trabajo hay diferencias entre los genotipos. En Alpo encontramos que su expresión es menor, de manera más acentuada en la raíz, al reducirse a la mitad en la hoja y disminuir 11 veces en raíz. En Odemensis parece existir un ligero incremento en toda la planta, aunque sin alcanzar la significación estadística en hoja.

El gen *STM* participa en la fotorrespiración al catalizar la interconversión de serina y glicina, este paso se encuentra en la ruta de interconversión del tetrahidrofolato. También participa en el control del daño celular ante factores abióticos al presentar una actividad protectora frente a ROS (Moreno *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2012). Singh *et al.* (2017) reportaron un comportamiento similar entre las hojas del genotipo tolerante y susceptible, existiendo un incremento de este gen. En este trabajo el comportamiento difiere entre los genotipos. En Alpo se produce un descenso de su expresión, a la mitad en hoja y 16 veces en raíz, por lo que es más acentuado este cambio en raíz. Mientras que en Odemensis los cambios no fueron significativos en ningún caso.

La familia LEA (Late Embryogenesis Abundant) se identificó primeramente en semillas, pero se han descritos en otro tejidos y organismos como bacterias, levaduras y algunos invertebrados (Dalal *et al.*, 2009). El gen *LEA4-5* se ha relacionado con varias respuestas a estrés, al estar involucrado en la protección de las estructuras citosólicas, y también de protección de la célula al incrementar la estabilidad de la membrana (Saha *et al.*, 2016). Esto es debido a que posee una región C-terminal con acciones antioxidativas y el secuestro de iones metálicos, y la región N-terminal actúa como chaperona (Seok *et al.*, 2020). Se ha descrito una expresión alta de este gen en los meristemas, y se ha relacionado con la protección de las células del meristemo de daños generados por condiciones adversas (Battaglia y Covarrubias, 2013). En el trabajo de Singh *et al.* (2017) se observó que en el genotipo susceptible se producía en la hoja un incremento de la expresión de este gen, mientras que en el genotipo tolerante este incremento no se produjo. En este trabajo los resultados muestran que se produce un incremento de expresión en ambos genotipos, en el genotipo Alpo se produce el incremento en toda la planta, aunque en la raíz es 10 veces mayor, siendo en hoja un incremento de 3,3 y en raíz de 30,9; mientras que en Odemensis se produce solo se produce un incremento en hoja, aunque más drástico que en Alpo, siendo de 200,3. Sorprendentemente en la raíz de Odemensis se aprecia una menor expresión, no significativa desde el punto de vista estadístico, si bien convendría repetir el análisis debido a la dispersión de los datos obtenidos.

## 6. Conclusión

La sequía es un problema cada vez mayor, por ello, este trabajo tenía como finalidad comprobar la eficacia dos métodos rápidos y sencillos para estudiar la respuesta de

diferentes genotipos a este estrés. Los resultados obtenidos nos muestran que el primer procedimiento, el test con PEG al 15%, es un buen método de realizar cribados entre diferentes genotipos de lenteja para determinar la capacidad de germinación en condiciones de estrés hídrico. El segundo método, el medio hidropónico, es un método sencillo para someter a plántulas durante una fase temprana de su desarrollo al estrés, además al ser un método no destructivo por lo que se podría trasladar las plántulas posteriormente a campo para estudiar los efectos a largo plazo, pero en nuestro estudio, los resultados no indicaron diferencias de tolerancia entre estos genotipos, por lo que se debería mejorar la metodología, utilizando diferentes genotipos y diferentes tiempos de exposición al estrés.

Los resultados de la qPCR han mostrado cambios de expresión diferentes en algunos genes a los esperados basándose en la bibliografía, lo cual podría indicar una plasticidad del transcriptoma entre diferentes genotipos y tejidos, mostrando la gran complejidad de la respuesta ante este proceso. Y aunque la relación entre los resultados en el test con PEG y la expresión génica es compleja, como aproximación general se puede señalar que el genotipo “tolerante” Alpo presenta respuestas similares en hoja y raíz, mientras que el genotipo “sensible” Odemensis muestra respuestas diferentes en muchos casos entre hoja y raíz, además de ser menos intensas que en Alpo. Por lo que habría que estudiar el comportamiento de estos genes en más genotipos que estén bien caracterizados por su respuesta al estrés por sequía para entender la importancia de estos cambios. De los 8 genes analizados, y con los datos preliminares de los que disponemos, se proponen como candidatos de indicadores de tolerancia a la sequía los genes *CLE25*, *SRG1*, *STM* y *SDH-1* al mostrar diferencias en su expresión entre el genotipo “tolerante”, Alpo, y el “susceptible”, Odemensis.

## 7. Referencias

- Acevedo, R. M., Maiale, S. J., Pessino, S. C., Bottini, R., Ruiz, O. A., Sansberro, P. A. (2013) “A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraguariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 65, pp 48-54.
- Ascencio-Ibañez, J. T., Sozzani, R., Lee, T., Chu, T., Wolfinger, R. D., Cella, R., Hanley-Bowdoin, L. (2008) “Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during Geminivirus infection”, *Plant Physiology*, 148(1), pp 436-454.
- Bartels, D., Sunkar, R. (2005) “Drought and salt tolerance in plants”, *Critical Reviews in Plant Science*, 24(1), pp 23-58.
- Bashir, K., Matsui, A., Rasheed, S., Seki, M. (2019) “Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought salinity, heat, and cold stress”, *F1000Research*, 8(658).
- Battaglia, M., Covarrubias, A. (2013) “Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes”, *Frontiers Plant Science*, 4, pp 190.
- Benatti M.R., Yookongkaew N., Meetam M., Guo W.J., Punyasuk N., Abuqamar S., Goldsbrough P. (2014) "Metallothionein deficiency impacts copper accumulation and redistribution in leaves and seeds of Arabidopsis." *The New Phytologist*. 202(3), pp 940-951.
- Betti, M., Pérez-Delgado, C., García-Calderón, M., Díaz, P., Monza, J., Márquez, A. J. (2012) “Cellular stress following water deprivation in the model legume *Lotus japonicus*”, *Cells*, 1(4), pp 1089-1106.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., Balsal, K. C. (2009) “Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance”, *Journal of Biotechnology*, 139(2), pp 137-145.
- Daryanto, S. Wang, L., Jacinthe, P. A. (2015) “Global synthesis of drought effects on food legume production” *Plos One* 10(6): e0127401.
- De Brito, G. G., Sofiatti, V., de Andrade Lima, M. M., de Carvalho, L. P., da Silva Filho, J. L. (2011) “Physiological traits for drought phenotyping in cotton Giovanni”, *Acta Scientiarum Agronomy*, 33(1), pp 117-225.
- Fang, Y., Xiong, L. (2015) “General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants”, *Cellular and Molecular Life Science*, 72(4), pp 673-689.
- Fei, X., Hou, L., Shi, J., Yang, T., Liu, Y., Wei, A. (2019) “Patterns of drought response of 38 WRKY transcription factors of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), pp 68.
- Gong, X., Zhang, J., Hu, J., Wang, W., Wu, H., Zhang, Q., Liu, J. (2015) “FcWRKY70, a WRKY protein of *Fotrunella crassifolia*, functions in drought tolerance and modulates putrescine synthesis by regulating arginine decarboxylase gene”, *Plant, Cell and Environment*, 38(11), pp 2248-2262.
- Gorim, L. Y., Vandenberg, A. (2017) “Evaluation of wild lentil species as genetic resources to improve drought tolerance in cultivated lentil” *Frontiers Plant Science*, 8, pp 1129.
- Gupta, D., Harinath, R., Dadu, R., Sambasivam, P., Bar, I, Sigh, M., Beera, N., Biju, S. (2019) “Toward climate-resilient lentils: challenge and opportunities” *Kole, C. (ed). Genomic Designing of Climate-Smart Pulse Crops. Switzerland, Sprienger Nature*, pp 165-234.
- Hellal, F. A., El-Shabrawi, H. M., Abd El-Hady, M., Khatib, I. A., El-Sayed, S., & Abdelly, C. (2018) “Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars”, *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 16(1), pp 203–212.
- Huang, L., Zhang, F., Wang, W., Zhou, Y., Fu, B., Li, Z. (2014) “Comparative transcriptome sequencing of tolerant rice introgression line and its parents in response to drought stress”, *BMC Genomics*, 15, pp 1026.
- Hummel, M., Hallahan, B. F., Brychkova, G., Ramirez-Villegas, J., Guwela, V., Chataika, B., McKeown, P. C., Morrison, L., Talsma, E. F., Beebe, S., Jarvis, A., Chirwa, R., Spillane, C. (2018) “Reduction in nutritional quality and growing area suitability of common bean under climate change induced drought stress in Africa”, *Scientific Reports*, 8(1).
- Idrissi, O., Houasli, C., Udupa, S. M., De Keyser, E., Van Damme, P., De Riek, J. (2015) “Genetic variability for root and shoot traits in a lentil (*Lens culinaris* Medik.) recombinant inbred line population and their association with drought tolerance”, *Euphytica*, 204(3), pp 693-709.
- Idrissi, O., Udupa, S. M., De Keyser, E., McGee, R. J., Coyne, C. J., Saha, G. C., Muehlbauer, F. J., Van Damme, P., De Riek, J. (2016) “Identification of Quantitative Trait Loci controlling root and shoot traits associated with drought tolerance in a lentil (*Lens culinaris* Medik.) recombinant inbred line population”, *Frontiers Plant Science* 7, pp 1174.
- Joshi, M., Timilsena, Y., Adhikari, B. (2017) “Global production, processing and utilization of lentil: a review”, *Journal of Integrative Agriculture*, 16 (12), pp 2898-2913.

- Krasensky, J., Jonak, C. (2012) "Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and metabolic networks", *Journal of Experimental Botany*, 63(4), pp 1593-1608.
- Krishnaswamy, S.S., Srivastava, S., Mohammadi, M., Rahman, M. H., Deyholos, M. K., Kav, N. N. V. (2008) "Transcriptional profiling of pea ABR17 mediated changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*", *BMC Plant Biology* 8, pp 91.
- Li, L., Yu, D., Zhao, F., Pang, C., Song, M., Wei, H., Fan, S. (2015) "Genome-wide analysis of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Gossypium raimondii*", *Journal Integrative Agriculture*, 14(1), pp 29-41.
- Liao, C., Lai, Z., Lee, S., Yun, D., Mengiste, T. (2016) "Arabidopsis HOOKLESS1 regulates responses to pathogens and Abscisic Acid through interaction with MED18 and acetylation of WRKY33 and ABI5 chromatin", *The Plant Cell*, 28(7), pp 1662-1681.
- Mahmood, T., Khalid, S., Abdullah, M., Ahmed, Z., Shah, M. K. N., Ghafoor, A. Du, X. (2020) "Insights into drought stress signaling in plants and the molecular genetic basis of cotton drought tolerance", *Cells*, 9 (105).
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España (2019) Dirección general de producciones y mercados agrarios - Subdirección General de Cultivos Herbáceos e industriales y Aceite de Oliva. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/1906sectorialcopljunio2019\\_tcm30-514447.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/1906sectorialcopljunio2019_tcm30-514447.pdf)
- Mishra, B. K., Srivastava, J. P., Lal, J. P., Sheshshayee, M. S. (2016) "Physiological and biochemical adaptations in lentil genotypes under drought stress", *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(5), pp 695-708.
- Moreno J.I., Martin R., Castresana C. (2005) "Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress.", *The Plant Journal*, 41, pp 451-463.
- Morgil, H., Tardu, M., Cevahir, G., Kavakli, I. H. (2019) "Comparative RNA-seq analysis of the drought-sensitive lentil (*Lens culinaris*) root and leaf under short- and long-term water deficits", *Functional & Integrative Genomics*, 19(5), pp 715-727.
- Muscolo, A., Sidari, M., Anastasi, U. Santonoceto C., Maggio, A. (2014) "Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes", *Journal of Plant Interactions*, 9(1), pp 354-363.
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., Keltsieva, O. A., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Tarakhovskaya, E., Frolov, A., & Wessjohann, L. A. (2018) "Methodology of drought stress research: experimental setup and physiological characterization" *International journal of molecular sciences*, 19(12), pp 4089.
- Pampurova, S., Van Dijck, P. (2014) "The desiccation tolerant secrets of *Selaginella lepidophylla*: What we have learned so far?" *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, pp 285-290.
- Roy, S., Roy, D. C., Noor, M. M. A., Ghosh S. R. , Ahmed, F. Sushmoy, D. R. (2019) "Binamasur-10, the first drought tolerant lentil variety registered in Bangladesh", *Research Agriculture, Livestock and Fish.*, 6(2), pp 253-262.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M. (2009) "Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data", *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45.
- Saha, B., Mishra, S., Awasthi, J. P., Sahoo, L., Panda, S. K. (2016) "Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss.] overexpressing Arabidopsis group 4 late embryogenesis abundant gene (AtLEA4-1)" *Environmental and Experimental Botany*, 128, pp 99-111.
- Seok, H., Niguyen, L. V., Niguyen, D. V., Lee, S., Moon, Y. (2020) "Investigation of a novel salt stress-responsive pathway mediated by Arabidopsis DEAD-Box RNA Helicase gene AtRH17 using RNA-seq analysis", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), pp 1595.
- Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotoca, L., Koekemoer, F., de Groot, S., Soole, K., Langridge, P. (2017) "Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production?" *Frontiers in Plant Science.*, 8, pp 1950.
- Singh, D., Dikshit, H. K., Singh, R. (2013) "A new phenotyping technique for screening for drought tolerance in lentil (*Lens culinaris* Medik.)", *Plant Breeding*, 132(2), pp 185-190.
- Singh, D., Singh, K. C., Singh Tomar, R. S., Taunk, J., Singh, R., Maurya, S., Chaturvedi, A. K., Pal, M., Singh, R., Dubey, S. K. (2016) "Molecular assortment of *Lens* species with different adaptations to drought conditions using SSR markers", *Plos One*, 11(1), e0147213.
- Singh, D., Singh, C. K., Taunk, J., Singh Tomar, R. S., Chaturvedi, A. K., Gaikwad, K., Pal, M. (2017) "Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress", *BMC Genomics*, 18(1), pp 206.

- Sinha, R., Pal, A. K., Singh, A. K. (2018) "Physiological, biochemical and molecular responses of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under drought stress", *Indian Journal of Plant Physiology.*, 23, 772-784.
- Stagge, J. H., Kingston, D. G., Tallaksen, L. M., Hannah, D. M. (2017) "Observed drought indices show increasing divergence across Europe", *Scientific Reports*, 7.
- Subhra Chatterjee, S., Chakraborty, T. (2009) "Isolation of bacterial RNA from cultures", Liu, D. (ed.) *Handbook of nucleic acid purification*. 1. Lugar: Taylor & Francis CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 107-127.
- Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Fukuda, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2018) "A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling", *Nature*, 556(7700), pp 235-255.
- Ullah, A., Sun, H., Yang, X., Zhang, X. (2017) "Drought coping strategies in cotton: Increased crop per drop", *Plant Biotechnology Journal*, 15(3), pp 271-284.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. A. M. (2007) "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3", *Nucleic Acids Research*, 35, pp 71-74.
- Wei, B., Hou, K., Zhang, H., Wang, X., Wu, W. (2020) "Integrating transcriptomics and metabolomics to studies key metabolism, pathways and candidate genes associated with drought-tolerance in *Carthamus tinctorius* L. Under drought stress", *Industrial Crops & Products*, 151, 112465.
- Yao, J., Liu, H., Huang, J., Gao, Z., Wang, G., Li, D., Yu, H., Chen, X. (2020) "Accelerated dryland expansion regulates future variability in dryland gross primary production", *Nature Communications*, 11(1), 1665.
- Zhou H., Zhao J., Yang Y., Chen C., Liu Y., Jin X., Chen L., Li X., Deng X.W., Schumaker K.S., Guo Y. (2012) "Ubiquitin-specific protease16 modulates salt tolerance in Arabidopsis by regulating Na(+)/H(+) antiport activity and serine hydroxymethyltransferase stability." *Plant Cell*, 24(12), pp 5106-5122.
- Zhou, J., Wang, J., Zheng, Z., Fan, B., Yu, J., Chen, Z. (2015) "Characterization of the promoter and extended C-terminal domain of Arabidopsis WRKY33 and functional analysis of tomato WRKY33 homologues in plant stress responses", *Journal of Experimental Botany*, 66(15), pp 4567-4583.