



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**ANÁLISIS DE LOS GENES
RELACIONADOS CON LA RESPUESTA
A ESTRESES EN LENTEJA
(GENES *IPK*).**

**ANALYSIS OF GENES RELATED TO
STRESS RESPONSE IN LENTILS
(*IPK* GENES).**

Esther Barrio Andrés

GRADO EN BIOLOGÍA

Junio, 2020



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>OBJETIVOS:</i>	6
2. TRABAJO EXPERIMENTAL	7
2.1 <i>MATERIAL BIOLÓGICO</i>	7
2.2 <i>EXTRACCIÓN DE ADN</i>	7
2.2.1 <i>ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA</i>	8
2.2.2 <i>ANÁLISIS DE ADN MEDIANTE ABSORBANCIA</i>	9
2.3 <i>DISEÑO DE CEBADORES</i>	9
2.4 <i>PCR</i>	10
2.5 <i>SECUENCIACIÓN DE ADN</i>	11
2.6 <i>ANÁLISIS DE SECUENCIAS</i>	11
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSIÓN	22
4.1 <i>FAMILIA DE LOS GENES IPK1 α</i>	23
4.2 <i>FAMILIA DE LOS GENES IPK1 β</i>	25
4.3 <i>FAMILIA DE LOS GENES IPK2</i>	26
5. CONCLUSIÓN	29
6. BIBLIOGRAFÍA	30



RESUMEN

Los genes *IPK* (inositol fosfato quinasa) participan en la síntesis del ácido fítico, el cual es un compuesto antinutritivo que se encuentra en las plantas y que los animales no rumiantes no pueden digerir. Sin embargo, es imprescindible para la supervivencia de la planta al tener un papel muy importante en el desarrollo de la semilla actuando como almacén de fosfato, además es el encargado de desencadenar diversas respuestas ante los estreses que pueden experimentar las plantas. Los genes que se encuentran en este grupo y que han sido objeto de este trabajo, se han denominado *IPK1 α.1*, *IPK1 α.2*, *IPK1 β.1*, *IPK1 β.2*, *IPK 2.1*, *IPK 2.2*. Estos fueron amplificados en *Lens culinaris* utilizando la técnica de PCR, pudiéndose llevar a cabo gracias a los cebadores que se elaboraron a partir de las secuencias de los mismos obtenidas por métodos bioinformáticos. La secuenciación de los productos amplificados permitió el análisis filogenético de las nuevas secuencias, que se obtuvieron mediante el solapamiento de los fragmentos secuenciados. Gracias al análisis filogenético comparativo se ha establecido que estos genes se agrupan en tres familias. Las relaciones de homología entre las secuencias obtenidas y las secuencias de otras especies modelo como *Arabidopsis thaliana* o *Medicago truncatula*, han permitido inferir las distintas características y potenciales funciones de estas familias en la lenteja cultivada.

Palabras clave: ácido fítico, inositol, inositol fosfato, inositol fosfato quinasa, *Lens culinaris*, lenteja.

SUMMARY

IPK (inositol phosphate kinase) genes are involved in the synthesis of phytic acid, which is an antinutritive compound found in plants and that non-ruminant animals cannot digest. However, it is essential for the survival of the plant having a very important role in the development of the seeds acting as a phosphate store, and it is also in charge of triggering various responses to the stresses that plants may suffer. The genes found in this group and that have been the subject of this work, have been named *IPK1 α.1*, *IPK1 α.2*, *IPK1 β.1*, *IPK1 β.2*, *IPK 2.1* and *IPK 2.2*. All of them were amplified in *Lens culinaris* by using the PCR method, which could be carried out thanks to primers that were designed from the sequences obtained by bioinformatic methods. The sequencing of the amplified products allowed the phylogenetic analysis, which was possible thanks to the overlapping of the sequenced fragments. The



universidad
de león



homology relationships between the sequences obtained and the sequences of other model species such as *Arabidopsis thaliana* or *Medicago truncatula*, have allowed us to infer the different characteristics and potential functions of these families in cultivated lentil.

Key words: inositol, inositol phosphate, inositol phosphate kinases, *Lens culinaris*, lentil, phytic acid.

ABREVIATURAS USADAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

ADP: adenosín difosfato

IPK: inositol fosfato quinasa

InsP₆: mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato, o ácido fítico

PP-InsPs: inositol pirofosfato

PLC: fosfolipasa C

DAG: diacilglicerol

MIK: mio-inositol quinasa

ITPK: inositol trifosfato quinasa

°C: grados centígrados

Min: minutos

S: segundos

Pb: pares de bases

PCR: polimerase chain reaction (en español, reacción en cadena de la polimerasa)



universidad
de león



% v/v: porcentaje volumen/volumen

% p/v: porcentaje peso/volumen

x g: aceleración de la gravedad



1. INTRODUCCIÓN

La especie *Lens culinaris* pertenece a la familia Fabaceae que es la tercera más grande dentro de las plantas, teniendo dos decenas de especies cultivables que son esenciales para la alimentación a nivel global al caracterizarse por su alta composición en nutrientes y ser capaces de fijar nitrógeno (Bauchet *et al.*, 2019).

La lenteja es un alimento que relativamente no tiene factores antinutricionales, aunque respecto a la composición de aminoácidos posee poca metionina y cisteína, es una gran fuente de proteínas y aminoácidos, tanto para la nutrición animal como humana. El contenido de hidratos de carbono también es muy alto, fundamentalmente almidón; en cambio, el contenido de lípidos es muy bajo y la cantidad de fibra es inferior a otras leguminosas (Bhatty, 1988).

A pesar de que tiene pocos factores antinutricionales, posee algunos como pueden ser las saponinas que reducen la biodisponibilidad de micronutrientes y el ácido fítico que a su vez interactúa con proteínas, vitaminas y minerales limitando el valor nutritivo de las semillas (Ayet *et al.*, 1997).

Los inositoles polifosfatos son componentes antinutricionales en las plantas desde el punto de vista de consumo humano y de animales no rumiantes, ya que resultan en la síntesis del ácido fítico (InsP₆). El inositol pirofosfato (PP-InsPs) es una molécula de señalización intracelular que posee gran cantidad de energía, al tener uno o dos grupos difosfato unidos al anillo de inositol, este tiene como función la unión de fosfatos, de jasmonatos y participa en la síntesis de inositol hexakisfosfato (InsP₆) en plantas.

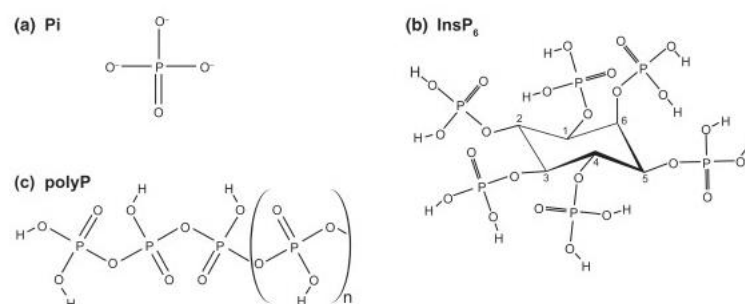


Figura 1: Estructura química de los grupos fosfatos que se unen al inositol para dar lugar a los inositoles polifosfato, como pueden ser el hexakisfosfato o ácido fítico aquí representado (Lorenzo-Orts *et al.*, 2020).



Conocer las rutas de síntesis y señalización con las que se obtienen los distintos inositoles polifosfato es de gran importancia para los mejoradores de plantas, por lo que se está intentando desarrollar estrategias que lleven a reducir el InsP_6 en las semillas, ya que a pesar de que posee gran cantidad de fósforo necesario para el desarrollo de la misma, para los animales no rumiantes supone un almacén de cationes y minerales al que no pueden acceder al no poder digerir el InsP_6 . (Bohn *et al.*, 2008). Esto limita la calidad alimenticia de las semillas y adicionalmente estos compuestos se eliminan en las excreciones contribuyendo a la contaminación por fosfatos, eutrofización y la contaminación de cuencas hidrográficas. (Abelson, 1999)

Por otra parte, esta reducción puede disminuir la vitalidad de la planta, por ello se está prestando más atención a la síntesis de inositoles polifosfatos que poseen 7 u 8 difosfatos unidos al anillo de inositol, estos derivan del InsP_6 , y son importantes tanto en el metabolismo energético de la planta, la señalización hormonal como la detección del fósforo inorgánico. (Desai *et al.*, 2014). Además, a los PP- InsPs , que son inositoles difosforilados, se les puede considerar como moléculas energéticas muy similares a ATP o ADP desde el punto de vista estructural, debido a los fosfatos que la forman y sus conexiones (Freed *et al.*, 2020).

Para poder modificar el contenido en InsP_6 , primero se ha de estudiar cómo se lleva a cabo la síntesis de este compuesto, la cual se caracteriza por seguir dos rutas, una dependiente de lípidos y otra independiente.

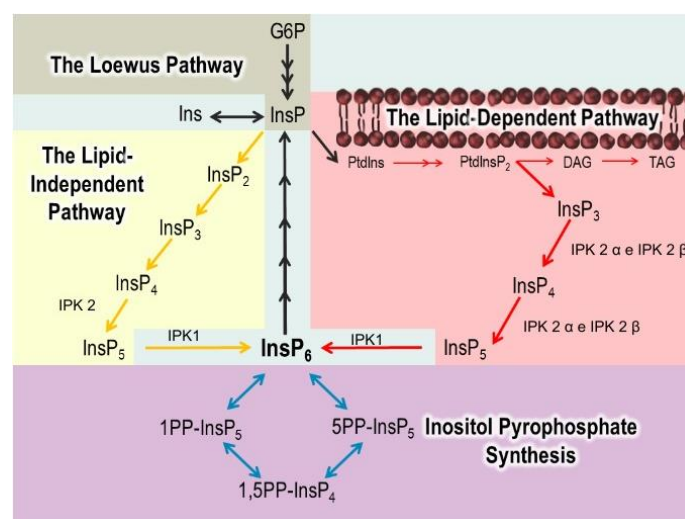


Figura 2: Rutas de síntesis de InsP_6 , en las que se indican los diferentes intermediarios y en algunos de los pasos, los genes que actúan sintetizando las enzimas que llevan a cabo dichos pasos. Obtenida de Freed *et al.* (2020).

- **DEPENDIENTE DE LÍPIDOS:** el componente lipídico de esta ruta es el fosfatidilinositol fosfato (PtdInsP) que contiene el inositol como anillo principal en la molécula (Figura 3); la bifosforilación de este grupo resulta en PtdIns(4,5)P₂ que es hidrolizado por la enzima denominada fosfolipasa C (PLC) dando lugar a InsP₃ y DAG (diacilglicerol). La fosforilación de InsP₃ a InsP₄ y después a InsP₅ se lleva a cabo por una inositol polifosfoquinasa específica (IPMK) que en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* está codificada por dos genes *AtIPK2α* y *AtIPK2β*. Ambos genes codifican enzimas con actividad 6/3 quinasa, pero su papel no es equivalente, ya que si el gen *AtIPK2β* está mutado y pierde su función se reduce la síntesis de InsP₆, mientras que si se produce la mutación del gen *AtIPK2α* la planta muere.

El último paso es la síntesis de InsP₆ a partir del InsP₅ gracias a la enzima inositol pentakisfosfato 2-quinasa (IPK) que es sintetizada por el gen *AtIPK1*. Por lo que si este gen presenta mutaciones y se reduce la expresión de su enzima, la síntesis de InsP₆ se ve altamente reducida.

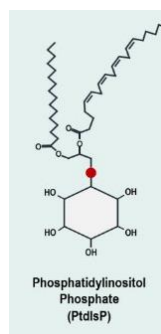


Figura 3: Esquema del componente lípido fosfatidilinositol fosfato (PtdInsP)

(Freed *et al.*, 2020).

- **INDEPENDIENTE DE LÍPIDOS:** esta ruta es llevada a cabo por una serie de inositol quinazas. La primera es la mio-inositol quinasa (MIK) que fosforila un InsP, dando lugar a un InsP₂ que se volverá a fosforilar a un InsP₃. Para obtener InsP₅, los inositoles que poseen 3 o 4 fosfatos son fosforilados específicamente de nuevo por enzimas denominadas inositol trifosfato quinasa (ITPK); si estas cantidades de enzimas disminuyen se observará una reducción en el InsP₆ final.

Las enzimas ITPKs actúan conjuntamente con las enzimas IPK2 para producir InsP₅, y para finalizar la ruta utiliza la misma enzima que en la ruta dependiente de lípidos, sintetizando InsP₆ gracias a la enzima IPK1.

Algunos estudios recientes se están focalizando en el gen codificante de IPK1 ya que además de actuar en las dos rutas anteriores es el encargado de llevar a cabo la última fosforilación para la obtención de InsP₆, por lo que si este gen es modificado la cantidad de InsP₆ final en la semilla se vería reducida.

La mayoría del InsP₆ se queda almacenado como fitato pero una parte de él se fosforila para dar lugar a PP-InsPs (Figura 4). Las enzimas que llevan a cabo esta síntesis son de dos clases, las denominadas difosfoinositol-pentakisfosfato quinetas o PPIP5Ks y las inositol hexakisfosfato quinetas o IP6Ks (Freed *et al.*, 2020). Mientras que en plantas se han identificado genes codificantes de PPIP5Ks (por ejemplo *AtVIH1/2* en *Arabidopsis*), la existencia de genes codificantes de IP6Ks todavía no se ha demostrado de un modo concluyente (Lorenzo-Orts *et al.*, 2020).

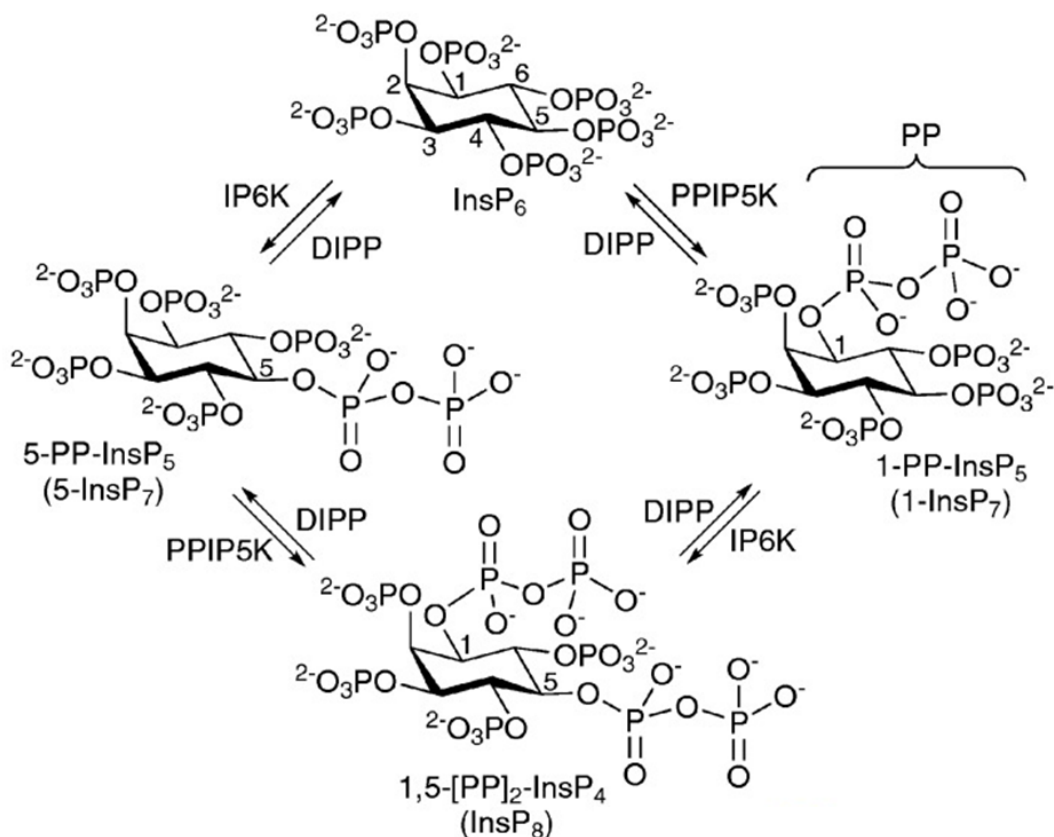


Figura 4: Biosíntesis y estructura molecular de los InsP₇ e InsP₈ (Riley *et al.*, 2015).



Además de poder modificar estos genes y de esa manera disminuir la síntesis del ácido fítico, también hay fosfatasas que hidrolizan los grupos fosfatos que están acoplados al anillo de inositol, los cuales actualmente se dividen en 5 familias que pueden ser estudiadas para la reducción de esta molécula en las semillas. (Jia *et al.*, 2019)

En recientes estudios se ha descubierto que las semillas que poseen bajo contenido en ácido fítico tienen grandes ventajas en la calidad de la comida y los piensos que se obtienen con ellas, además de aumentar la sostenibilidad agrícola. De manera que al poseer menos ácido fítico, los animales no rumiantes que se alimenten con estas semillas o sus derivados gestionarán mejor el fosforo que estas contengan, siendo así más sostenible ya que no se expulsará tanto en las excreciones reduciendo la contaminación por fosforo antes comentada. Además de que mejora la salud de estos animales, su productividad y calidad de producto. (Raboy, 2020)

Pero los inositoles pirofosfatos son moléculas de señalización muy importantes que pueden regular actividades esenciales para las células eucariotas, como pueden ser la permeabilidad de las membranas, el mantenimiento de los telómeros e incluso la apoptosis (Laha *et al.*, 2015). Se sabe que la función de los PP-InsPs en las plantas es actuar como moléculas de unión para grupos de proteínas (Williams *et al.*, 2015), y de esta manera regular actividades cruciales para la supervivencia de la planta. Por ejemplo, el InsP₆ se puede unir a un receptor auxínico actuando como cofactor (Tan *et al.*, 2007); las auxinas son unas fitohormonas que regulan numerosos procesos de desarrollo en las plantas y la respuesta a diferentes tipos de estrés (Teale *et al.*, 2006).

El jasmonato es otra fitohormona crítica para la defensa contra patógenos y cambios medioambientales que pueden dañar gravemente a la planta, además de ser clave para su fisiología (Browse, 2009); y el InsP₇ puede unirse a esta al igual que el InsP₅, que actúa como cofactor uniéndose al receptor del jasmonato (Freed *et al.*, 2020).

También se sabe que los PP-InsPs pueden unirse a receptores de hormonas y a complejos de transcripción que son claves junto a otras proteínas para la señalización del fósforo. Por lo tanto, reducir el InsP₆ de las plantas como se comentaba al principio puede ser beneficioso para el consumo de los humanos y los animales no rumiantes, pero para las plantas tiene unas consecuencias negativas ya que se reducen también los PP-InsPs, de manera que si la señalización del fosforo se ve alterada podría afectar negativamente al crecimiento y



desarrollo de la planta, reduciendo la viabilidad y alterando la estructura radicular (Rouached *et al.*, 2010). Además, puede modificar otras rutas de señalización como son las de acumulación de nitrato y otros micronutrientes, y la ruta del ABA que está directamente influenciando a las respuestas por estrés (Baek *et al.*, 2017). Y debido a la relación del jasmonato con los PP-InsPs, su reducción afectaría a la resistencia contra patógenos e insectos (Laha *et al.*, 2015).

1.1 OBJETIVOS:

- Estudio de los genes que participan en la síntesis de ácido fítico en lenteja como primer paso para su posterior utilización en los programas de mejora relacionados con la obtención de cultivares que presenten bajos niveles de dicho compuesto.
- Verificar y validar la existencia de los genes predichos a partir de datos obtenidos por métodos bioinformáticos mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación directa de los mismos.
- Análisis filogenético de los genes *IPK* secuenciados para poder inferir su posible función por homología con los genes caracterizados en otras plantas, especialmente en leguminosas.



2. TRABAJO EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para este experimento se ha usado el cultivar Alpo de la especie *Lens culinaris* Medik.

2.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Para dar comienzo a este experimento, lo primero que se llevó a cabo fue una extracción de ADN genómico a partir de semillas de lenteja de variedad Alpo. Para tener suficiente para toda la fase experimental se realizó la extracción de 10 semillas en total.

Se pulverizan las 10 semillas de lenteja entre dos placas de bronce y una vez obtenida la harina se recoge en un microtubo. Y se procede con el protocolo que se expone a continuación para 1 semilla, por lo que se multiplicaron todas las cantidades por 10. Para empezar, sobre la harina obtenida se añaden 750 μL de TENSP (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 0,5 M NaCl; 2 % SDS; 1 % PVP 40.000) pH 9,5, mezclándose en el vórtex y poniéndolo a incubar 30 minutos a 65 °C. Una vez hecho esto, se añaden 500 μL de cloroformo:octanol (24:1), se mezcla suavemente y se centrifuga 10 min a 20.000 x g. Con esto se observan claramente dos fases; de las cuales se toman 600 μL del sobrenadante y se pasan a un tubo nuevo junto con 600 μL de fenol.

Se repite el centrifugado a 20.000 x g. durante 5 min, se toman 500 μL del sobrenadante al que se le añade 500 μL de fenol y 500 μL de cloroformo:isoamilico (24:1), y se mezcla suavemente. Se centrifuga la muestra de nuevo 2 min a 20.000 x g. y se toman 300 μL del sobrenadante que se mezclan con isopropanol y se incuba 30 min a -70 °C.

Una vez concluido el tiempo de incubación se centrifuga a 20.000 x g. durante 15 min, se desecha el sobrenadante y se le añaden 200 μL de etanol al 70 %, se vuelve a centrifugar 5 min y se desecha el sobrenadante.

Para finalizar se seca el precipitado y se disuelve en 100 μL de H₂O milliQ estéril junto con 1 μL de RNAsa a 100 mg/mL, para eliminar los restos de RNA que puedan contaminar la muestra.



Una vez realizada la extracción de ADN se ha de comprobar que se ha realizado correctamente, para ello se utilizaron dos técnicas:

2.2.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La primera es una electroforesis, técnica usada para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico, para ello se prepara una mezcla que será la que se colocará en los pocillos del gel agarosa. Dicha mezcla se compone de 5 μL de la solución de ADN, 5 μL de tampón de carga (glicerol 30 % v/v; azul de bromofenol 0,5 % p/v) y 10 μL de H_2O ; además en el primer pocillo se coloca un ADN de referencia que muestre un conjunto de bandas de tamaños y concentraciones conocidos. El gel de agarosa en este caso se compone de 50 mL de tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) en los que se disuelve 0,5 g de agarosa, y colocándolo en un molde alargado con un peine adecuado se solidifica dando lugar al gel que se usa en la electroforesis. Una vez obtenidos todos los componentes se coloca el gel en un recipiente que con medio líquido tampón TAE 1X que transmitirá la corriente emitida a través de unos electrodos. Se aplicaron 100 voltios durante una hora aproximadamente haciendo posible que las moléculas de distinta movilidad se separasen. Pasada la hora el gel tiene que ser teñido sumergiéndolo en una dilución de bromuro de etidio en agua (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 min con agitación continua. Para revelar los resultados se usa un transiluminador que emite luz ultravioleta y nos permite obtener imágenes como la que se muestra en la Figura 5 en la que se observa claramente la banda de ADN extraído en comparación con la escalera de referencia que se puso en el primer pocillo. Aunque este resultado muestra que no se usó RNAsa en el procedimiento ya que aparece mucho residuo de RNA.

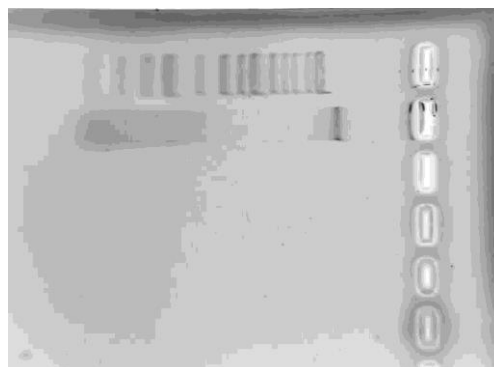


Figura 5: Gel de electroforesis de la extracción de ADN genómico de lenteja variedad Alpo.

2.2.2 ANÁLISIS DE ADN MEDIANTE ABSORBANCIA

Con el segundo método se trata de medir la cantidad de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro mediante la absorbancia de la solución en un rango de longitudes de onda. La concentración de ADN se cuantificó midiendo la densidad óptica a 260 nm (DO260) en el Nanodrop ND-1000 (Agilent Technologies) y teniendo en cuenta la relación de absorción a DO260/DO280 y DO260/DO230 con objeto de comprobar la pureza de las muestras.

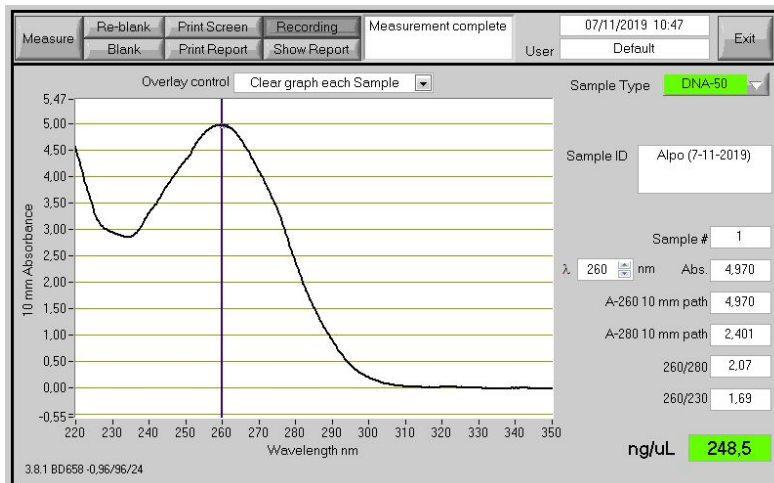


Figura 6: Gráfica en la que se observan los resultados de la extracción de ADN.

2.3 DISEÑO DE CEBADORES

Para poder proceder con el análisis de las secuencias de los genes que se van a estudiar en este trabajo se ha de realizar una amplificación de dichos genes, requiriéndose cebadores a cada extremo del gen o en su defecto si el gen es muy largo dividirlo en fragmentos que se solapan entre sí. Para obtener dichos cebadores se usaron las secuencias de varios posibles genes (*IPK1 α.1*, *IPK1 α.2*, *IPK1 β.1*, *IPK1 β.2*, *IPK 2.1* e *IPK 2.2*) obtenidas mediante el ensamblaje bioinformático de pequeñas secuencias procedentes de los datos de un transcriptoma de Alpo obtenido en el área de Genética. Estas secuencias se insertan en página web denominada Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) que sugiere una serie de cebadores que combinados de la manera correcta, con una distancia entre ellos adecuada y con unas temperaturas de reacción similares entre todos, permiten la amplificación de los distintos fragmentos de los genes.



2.4 PCR

Una vez obtenido el ADN de la variedad de lenteja que se va a usar para las PCR y los cebadores necesarios, se procedió a realizar la mezcla de compuestos necesarios para el proceso de amplificación, para lo cual se realizó la mezcla en un microtubo de los siguientes compuestos y cantidades:

COMPUESTO	CANTIDAD
Buffer 10X (Tris-HCl pH 8,5, (NH ₄) ₂ SO ₂ , 15 mM MgCl ₂ , 1% Tween-20®)	2,5 µL
dNTPs (10 mM de cada uno de los nucleótidos)	2 µL
BSA (10 mg/mL)	2 µL
<i>Taq</i> DNA polimerasa VWR (5 U/µL)	0,2 µL
Cebador <i>Forward</i> (10 µM)	1,25 µL
Cebador <i>Reverse</i> (10 µM)	1,25 µL
DNA (50 ng/µL)	2 µL
H ₂ O milliQ	13,8 µL
TOTAL	25 µL

Una vez añadidos y mezclados todos los componentes, se colocaron dichos microtubos en una máquina de PCR que siguiendo el programa INDEL lleva a cabo la reacción de amplificación realizando los siguientes ciclos: primero se incrementa la temperatura a 94 °C durante 5 min, y luego se producen 15 ciclos de 30 s a 94 °C, después baja la temperatura a 58 °C y se mantiene durante 1,5 min, para posteriormente volver a subir a 72 °C durante 1 min, a este ciclo le siguen 25 ciclos de 30 s a 94 °C, para finalizar se lleva a cabo 3 ciclos diferentes en los que la temperatura disminuye a 52 °C durante 1,5 min, sube 72 °C durante 1 min, y finalmente se mantiene en 72 °C durante 7 min; una vez finalizado este proceso se mantienen las muestras a 4 °C hasta su almacenamiento en un frigorífico.

Una vez finalizado el proceso de amplificación se realiza una electroforesis para comprobar que se haya realizado correctamente. Para lo cual se repite el procedimiento de electroforesis en un gel de agarosa que ha sido explicado anteriormente.



2.5 SECUENCIACIÓN DE ADN

Tras realizar la PCR en la que se amplificó el fragmento del gen que se quiere estudiar y se comprobó con una electroforesis que ha funcionado, se procedió a realizar la secuenciación de los mismos. Para ello se recurrió al Servicio de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León, en donde mediante el método de secuenciación de Sanger obtienen las secuencias del fragmento amplificado.

Debido a que los genes tienen demasiada longitud se tuvo que recurrir a secuenciarlos por fragmentos de modo que los *primers* no estuvieran a una distancia mayor de 1000 pares de bases. Dichos fragmentos se secuenciaron por separado tanto con el *primer forward* como con el *primer reverse*. De esta manera cuando finalmente se obtienen los datos de secuenciación se observan dos secuencias que, al proceder a transformar una de ellas en su secuencia invertida y complementaria, deberían ser solapantes e idénticas.

2.6 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Se utilizó el programa MEGA5.2 (Tamura *et al.*, 2011) para procesar estos datos, de manera que se alineaban las dos secuencias correspondientes a un fragmento con el gen de referencia que se usó para diseñar los cebadores y una vez obtenida la secuencia se procedía a comprobar que los nucleótidos que solapaban entre los fragmentos fuesen completamente iguales. Si se detectaba alguna diferencia se procedía a comprobar su fiabilidad con la herramienta Trace Editor en el MEGA, la cual muestra la gráfica con la que se ha obtenido la secuencia y los nucleótidos aparecen representados como picos bien diferenciados; por lo que si entre dos secuencias se encontraban dos nucleótidos diferentes y en una no se veía un pico claro en la gráfica se seleccionaba como fiable el que tenía el pico diferenciado. De esta manera se seleccionaron una de las secuencias idénticas de cada fragmento del gen y se procedió a comprobar si dichos fragmentos se solapaban dando lugar a una secuencia completa de cada gen en *Lens culinaris*.

Una vez obtenida la secuencia se identificó la zona codificante de la secuencia. Para ello se utilizó la información del borrador del genoma del lenteja v1.2 disponible en la página web KnowPulse (Sanderson *et al.*, 2019), el cromosoma y el sitio en este donde se encontraba el gen correspondiente, con lo que usando las distintas herramientas que proporciona la página se obtuvieron las zonas UTR y las zonas codificantes que son las que se usaron para el análisis.



Seleccionadas dichas zonas, se procedió al análisis filogenético que comienza con la obtención de distintas secuencias estrechamente relacionadas con los genes a estudiar. Para ello se utilizó la herramienta BLASTX disponible en la página web KnowPulse frente a los genomas de distintas leguminosas (guisante, judía, soja y dos variedades de garbanzo) y en la página web Phytozome para los genomas de las especies modelo *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana*, que también fueron usadas en el alineamiento.

Para realizar el análisis filogenético se usó la zona codificante de proteína (CDS) de todas las secuencias. En primer lugar se llevó a cabo el alineamiento por el método Muscle (neighbor joining) utilizando para ello la traducción a secuencias proteínicas. Basándose en dicho alineamiento, se realizó un dendrograma de las secuencias de ADN utilizando el método de máxima verosimilitud. La confianza estadística de cada nodo en los dendrogramas fue estimada mediante 1.000 réplicas “bootstrap”.



3. RESULTADOS

A partir de las secuencias disponibles en Área de Genética, obtenidas de un estudio de transcriptoma, se seleccionaron los cebadores que se iban a usar para realizar las PCRs.

A continuación se muestran las tablas con los cebadores seleccionados para llevar a cabo la amplificación y secuenciación del gen; en estas tablas se representa el nombre asignado para el cebador, el número de la base del gen en la que comienza, la longitud en número de bases del cebador, la temperatura de fusión (T_m) que es la temperatura a la que el 50% del ADN está desnaturalizado, y las bases nitrogenadas que componen el cebador.

IPK1 α .1

PRIMER	Inicio	Longitud	T_m (°C)	secuencia
1.F	16	22	58,7	GACAAGCTAAATTGCATCATCC
1.R	639	20	59,3	TAAAATGCTTCCCAGCAACA
2.F	288	20	59,8	ATCGACCCTCCCGAGTTAAT
2.R	1156	20	60,1	ACAGCCATCGGAAATGAAAG

IPK1 α .2

PRIMER	Inicio	Longitud	T_m (°C)	secuencia
1.F	1	23	58,4	TCCAACCCTAAATGACATTATGA
1.R	658	20	59,8	CTTCGGGAGCATCAAGAATC
2.F	283	20	59,6	TCTCGCTCTCGCTTCTTCTT
2.R	1159	20	59,7	CCTGTGGTGGCATCTCAGTA
3.F	792	20	60,6	GGCCTGGGAGAGTTTGAAGT
3.R	1642	20	60	CTGGACCCACCCAATTCTA

IPK1 β .1

PRIMER	Inicio	Longitud	T_m (°C)	secuencia
1.F	2	23	57,9	TTCACCTCACACTTTACTCCT
1.R	567	20	60,1	ATTGCATCTGGAGGGTCAAG
2.F	201	22	58,9	AGCTTCAGATTTCAACCACAAA
2.R	1049	20	59,9	CCAATAAAGGTCTCGGTGGA
3.F	700	20	59,3	AACCAAAGCTGGAATGAAGC
3.R	1516	20	59	GCAGCAATGAAAGTTCTCCA



IPK1 β.2

PRIMER	Inicio	Longitud	Tm (°C)	secuencia
1.F	11	24	60	TCTTTTCATTTCAATTTTCGTTCA
1.R	639	20	60,3	AACAAGCTGACTTGGGATGC
2.F	313	21	59,7	TGGAGAAATCTGAGGTCGGTA
2.R	1168	20	59,1	CATCCTTGGTCCCATATTCC
3.F	836	20	60	TGTCAGAGCTGGAACCTCCT
3.R	1691	20	60,1	TTTTGGCACCTTCATTGACA

IPK 2.1

PRIMER	Inicio	Longitud	Tm (°C)	secuencia
1.F	44	22	60,1	CCAAATTTTCTTTCTGCGTTTC
1.R	581	20	58,3	GCGATATCTTCCATGACGAG
2.F	227	21	60,1	TTGCGTAAACTTTGCATTTCC
2.R	1070	20	58,7	TGATCAATGGCACCTTTAGC
3.F	755	20	60,1	GCTGGCAGCCTGATAGAAAG
3.R	1604	19	59,9	GCGCAAACCATTGAGAGA
4.F	1221	22	60	TGGATCGTGTTGTAATCGACTC
4.R	2101	24	58,8	GGCAAAAAGTTATGAACAAAAAGA
5.F	1718	22	59,2	AGCAATTGTGTGAATGAGGAAG
5.R	2579	23	59	AAACCGAGTAAAAATGGTTTCAA

IPK 2.2

PRIMER	Inicio	Longitud	Tm (°C)	secuencia
1.F	18	22	59,5	TCAGACCAAATGAGAAATCCAA
1.R	692	21	58,7	CAGATCTCAATCCGGAGATTC
2.F	321	20	59,4	TTCTCGGCCCTTCATAGAC
2.R	1170	21	60	CAGCCCTAAGAAAACCATTCC



Sabiendo los cebadores que se iban a utilizar se dedujeron los fragmentos de cada gen que se debían obtener en cada una de las amplificaciones, suponiendo que dichos genes no presentaran intrones, como posteriormente se comprobó en los denominados *IPK1 α* y en los *IPK 2*, cuyos esquemas se muestran en la Figura 7.

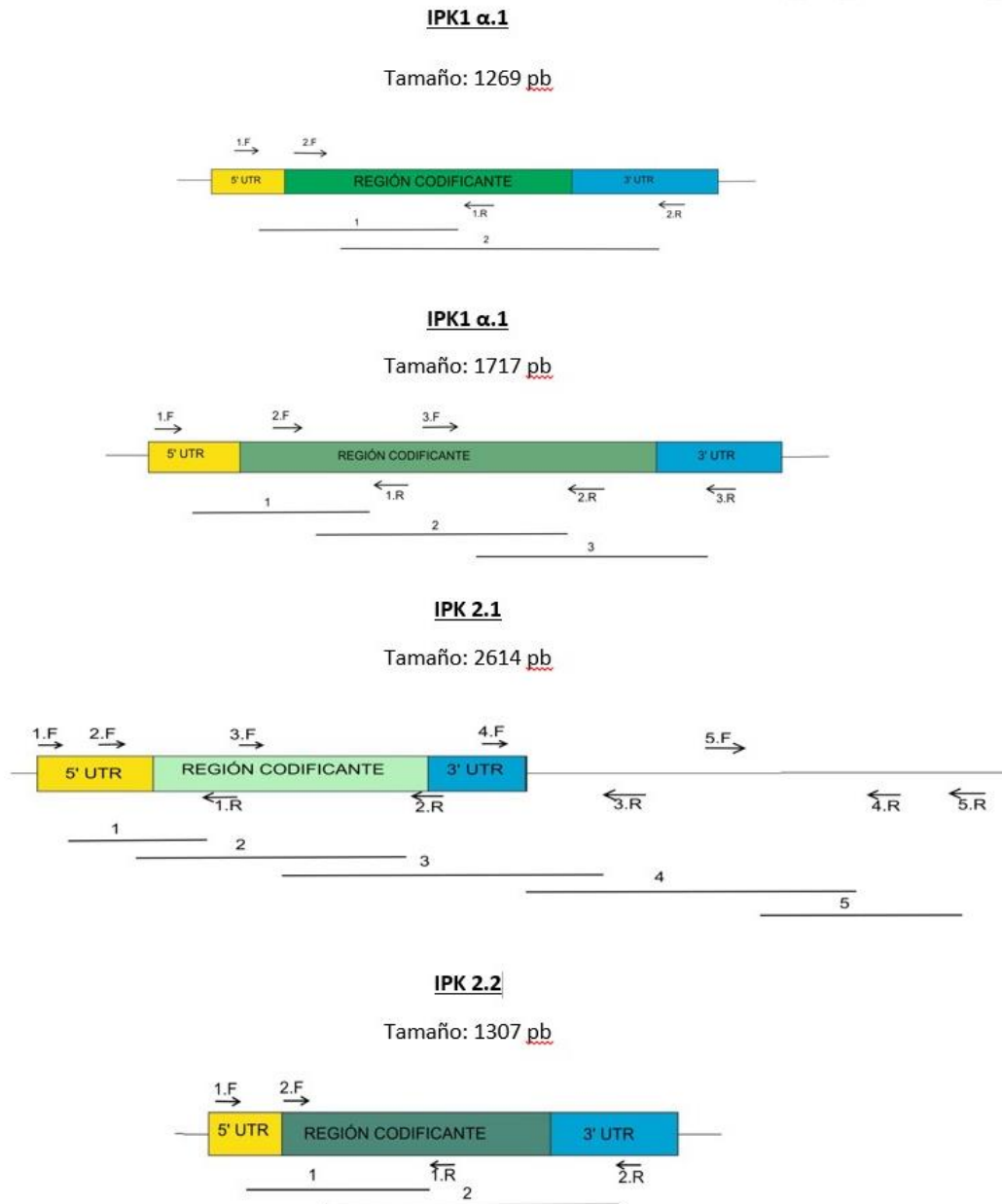


Figura 7: Esquema de los distintos genes a estudiar, en el que se muestran las zonas UTR y la codificante con los cebadores que se usaron para la PCR y que dan lugar a los fragmentos que se muestran enumerados, además se muestra el tamaño de las secuencias que se usaron como referencia para obtener los cebadores. Escala aproximada.

De las diferentes PCRs que se llevaron a cabo para amplificar dichos fragmentos se obtuvieron una serie de geles de electroforesis que resultaron en algunas de las figuras que aquí se muestran.

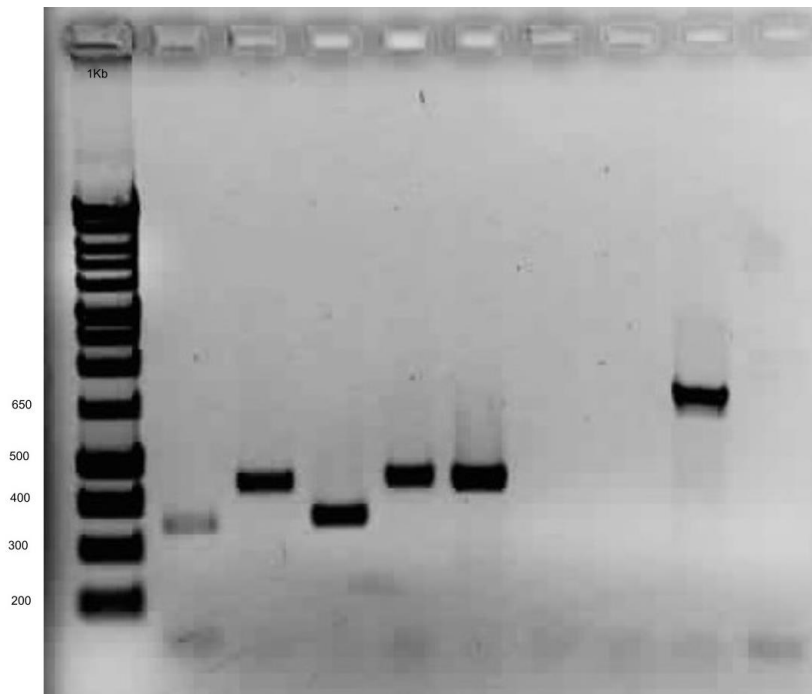


Figura 8: Imagen obtenida de un gel de electroforesis en la cual se pueden observar las distintas bandas obtenidas tras la amplificación por PCR de distintos fragmentos de los genes a estudiar.

En el pocillo número 1 que se muestra en la figura 8, se puede ver la escalera de referencia que se usa para determinar la longitud de los fragmentos de las bandas que se observan en los demás pocillos. Además, se puede comprobar que en algunos de los pocillos, como por ejemplo el número 6 y 7 no se han obtenido bandas por lo que la PCR no fue exitosa y habría que repetir el proceso hasta obtener una banda definida.

Tras varias PCRs, con algunas parejas de *primers* nunca se obtuvo un producto de amplificación claro y que permitiera proceder a su amplificación. En la siguiente tabla se muestran los fragmentos que se pudieron secuenciar con los cebadores anteriormente indicados y aquellos que siempre dieron resultados negativos.

Tabla 2: Fragmentos de los distintos genes que fue posible secuenciar.

FRAGMENTOS	TAMAÑO	SECUENCIADO	FRAGMENTOS	TAMAÑO	SECUENCIADO
<i>IPK1 α.1</i>			<i>IPK1 β.2</i>		
1	623 pb	SI	1	628 pb	NO
2	868 pb	SI	2	855 pb	NO
<i>IPK1 α.2</i>			3	855 pb	SI
1	658 pb	SI	<i>IPK 2.1</i>		
2	876 pb	SI	1	537 pb	SI
3	850 pb	SI	2	843 pb	SI
<i>IPK1 β.1</i>			3	849 pb	SI
1	565 pb	NO	4	880 pb	SI
2	848 pb	NO	5	861 pb	SI
3	816 pb	SI	<i>IPK 2.2</i>		
			1	674 pb	SI
			2	849 pb	SI

La razón por la que sólo se consiguieron amplificaciones con la pareja 3 de cebadores a partir de los genes *IPK1β* se puso de manifiesto cuando se obtuvo un permiso temporal de acceso al borrador del genoma de la lenteja. Estos genes presentan un gran número de exones e intrones, y las parejas de cebadores 1 y 2 utilizadas se anclaban en secuencias separadas a mayor distancia que la Taq DNA polimerasa usual puede amplificar con eficiencia. Los esquemas de estos genes y la posición de los cebadores se muestran en la Figura 9.

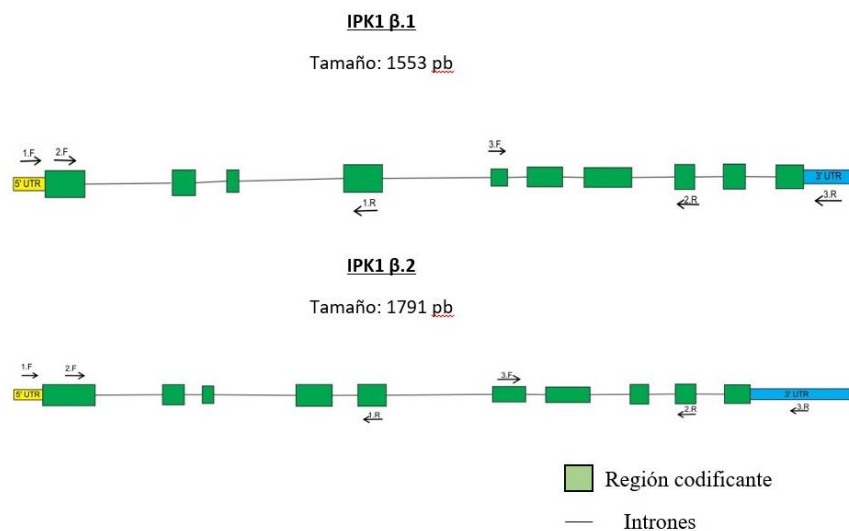


Figura 9: Esquemas de los genes *IPK1 β*, en los que se observan los intrones que poseen. Los tamaños que se observan en la imagen corresponden únicamente con los exones.

Después de saber los fragmentos que se habían amplificado correctamente se llevó a cabo su secuenciación de manera que se obtuvieron una serie de gráficas que permitían saber la serie de bases nitrogenadas que conformaban el fragmento de cada gen.

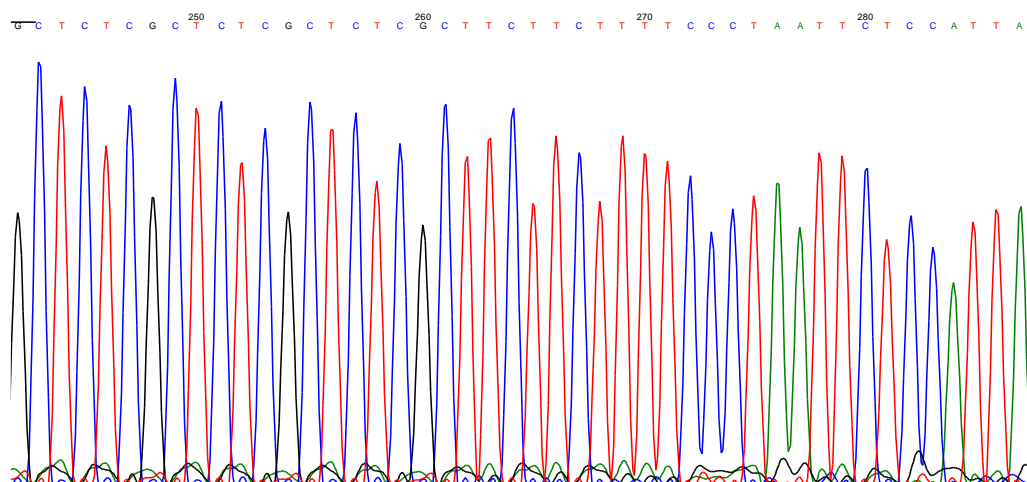


Figura 10: Gráfica que se obtiene al realizar la secuenciación de un fragmento de ADN amplificado, en este caso es una parte de la secuenciación del fragmento 1 del gen *IPK1 α.2* que se llevó a cabo con el cebador *forward*.

Obtenidas las secuencias de los distintos fragmentos (Anexo 1) de un mismo gen, se comprobó que la secuenciación fuese correcta, además de si las zonas solapantes de los fragmentos coincidían y si no coincidían como se ha comentado antes se comprobaban las gráficas de secuenciación para determinar cuál era la secuenciación fiable y con la que se iba a trabajar. Para finalizar se aunaron todos los fragmentos de un mismo gen en una misma secuencia y dio comienzo el análisis filogenético determinando las zonas codificantes del gen (las secuencias completas se encuentran en el Anexo 2)



Figura 11: Imagen en la que se muestra la secuencia de referencia del gen *IPK 2.1* (denominada 2.1), el final del fragmento 3 y el inicio del fragmento 4, con esto se observa el solapamiento de los fragmentos que luego permitirá aunarlos en una sola secuencia.

A partir de las secuencias se determinaron las zonas codificantes de la proteína, para posteriormente proceder a identificar en las bases de datos aquellos genes que presenten una alta homología pertenecientes a otras leguminosas cultivadas y a la especie modelo del grupo



de las leguminosas (*Medicago truncatula*), así como a *Arabidopsis thaliana*, ya que en ambas la información sobre el papel de los genes es muy completa, y proporciona las posibles funciones que podrían presentar los genes secuenciados en lenteja. Las leguminosas cultivadas que se escogieron por disponer de genomas secuenciados y anotados, y de acceso libre en la página web KnowPulse fueron: guisante (*Pisum sativum* Caméor v1a), garbanzo tipo Kabuli (*Cicer arietinum* CDC Frontier v1.0), garbanzo tipo Desi (*Cicer arietinum*, ICC4958 v2.0), soja (*Glycine max*, Williams 82 v4.0) y alubia (*Phaseolus vulgaris*, G19833 v2.0). Las secuencias de las especies modelo se buscaron en la página web Phytozome v12.

Con las secuencias obtenidas se realizó el alineamiento y a partir del mismo se determinó el modelo evolutivo más adecuado, resultando ser el denominado T92 (Tamura 3-parámetros) + G = 0,97 (la tabla que muestra todos los modelos probados se encuentra en el Anexo 3) que una vez indicado en la tabla para elaborar el árbol filogenético se aplicó a dos categorías discretas de posiciones, la de los lugares sinónimos y la de los lugares no sinónimos.

Sabiendo cual es el mejor modelo para llevar a cabo el árbol filogenético, se usó éste en el método de máxima verosimilitud combinándolo con dos opciones distintas de análisis, "complete deletion" y "all sites". La opción "complete deletion" elimina del análisis todas las posiciones nucleotídicas en las que aparecen huecos causados en el proceso de alineamiento en alguna de las secuencias, de modo que el resultado se basa en el estudio del mismo número de lugares en todos los casos, mientras que la opción "all sites" utiliza todas las posiciones, aunque en algunas secuencias aparezca un hueco en dicho lugar.

En ambos casos los árboles filogenéticos fueron prácticamente idénticos, por lo que solo se muestra el obtenido con la metodología "all sites" en la Figura 12.

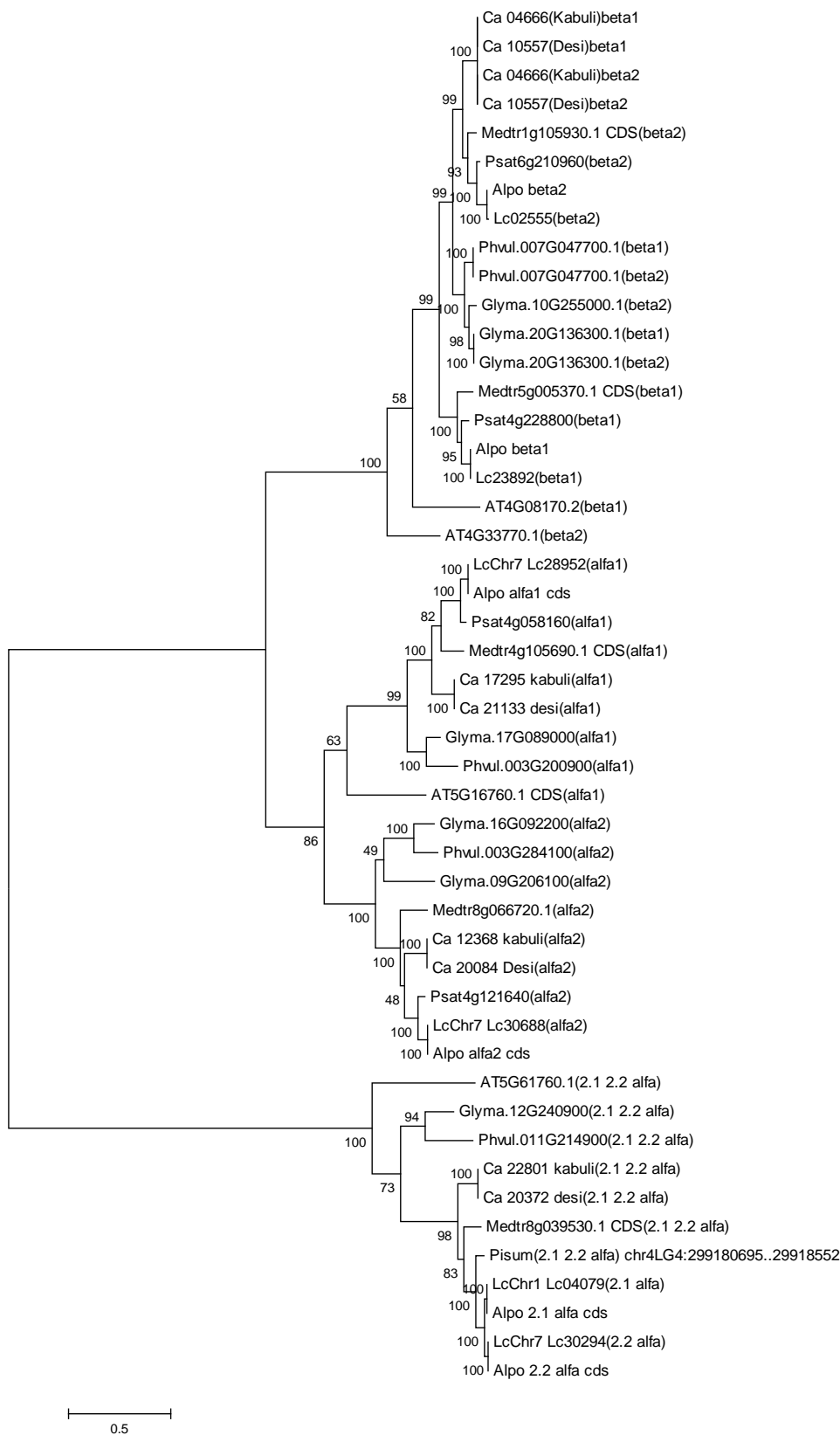


Figura 12: Árbol filogenético obtenido del alineamiento de todas las secuencias a estudiar, usando el modelo adecuado (Tamura 3 parametros) y el método All Sites, con el programa MEGA 5.2.



En el árbol filogenético se observan una serie de números en las ramas que son los que indican el porcentaje en el que dicho grupo aparece en el análisis “bootstrap”, además la escala que se indica representa el número de sustituciones nucleotídicas por posición.

Se observan claramente 3 familias bien diferenciadas en el árbol filogenético. Una de las cuales está conformada por las secuencias que pertenecen al *IPK1 β.1* e *IPK1 β.2*, esta familia se encuentra más próxima filogenéticamente a la familia conformada por los genes *IPK1 α*, que se divide claramente en dos subfamilias, una conformada con los genes relacionados con *IPK1 α.1* y la otra con los genes relacionados con *IPK1 α.2*. Y por último se observa otra más alejada filogenéticamente de las otras dos pero aun así relacionada, que la conforma los genes *IPK 2.1* e *IPK 2.2*, los cuales están entremezclados filogenéticamente.



4. DISCUSIÓN

La importancia que presentan las semillas de leguminosas en la alimentación, tanto humana como animal, hace que la optimización de la calidad nutritiva sea uno de los objetivos fundamentales en los programas de mejora genética de estas especies. Entre los varios compuestos considerados como antinutritivos que acumulan dichas semillas, destaca el ácido fítico (InsP₆ o mio-inositol 1,2,3,4,5,6 hexa-kis fosfato) que se deposita en las vacuolas en forma de fitatos. La obtención de cultivares que presenten bajos niveles de este compuesto se ha visto limitada a la utilización de los mutantes naturales que aparecen con muy baja frecuencia. El conocimiento de los genes que participan en la síntesis y degradación del ácido fítico proporciona una herramienta para la posible manipulación de los mismos, bien en su actividad o en sus procesos de regulación, de ahí que sea importante conocer qué familias génicas se presentan en las distintas especies, así como el número y actividad de los genes que las forman. Puesto que el ácido fítico también actúa de molécula reguladora de otros muchos procesos esenciales para las plantas, como por ejemplo las respuestas a diferentes tipos de estreses, el objetivo final sería conseguir cultivares con bajo contenido de fitatos en las semillas, pero sin que otros procesos se vean alterados y comprometan la supervivencia de la planta.

La información disponible en el Área de Genética procedente de un estudio bioinformático del transcriptoma en el cultivar Alpo de lenteja permitió detectar la presencia de secuencias presuntamente relacionadas con genes implicados en la síntesis de ácido fítico, pero era necesario validar dicho resultado mediante la secuenciación real de estos genes.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que en la lenteja existen como mínimo 3 familias génicas activas, ya que sus productos se encontraron en el transcriptoma de la planta. Por otra parte, las secuencias obtenidas son idénticas a las predichas en el ensamblaje bioinformático del transcriptoma, lo que indica la fiabilidad de los métodos utilizados.

La fuente de información más rápida sobre las posibles funciones de los genes detectados nos la proporciona la homología que presentan con otras secuencias caracterizadas, en especial con las especies modelo *Arabidopsis* y *Medicago*, de ahí la importancia de realizar los estudios filogenéticos, a partir de los cuales analizar los cambios acumulados a lo largo del



tiempo y el grado de similitud entre las secuencias, especialmente las que codificarán las proteínas.

Analizando más en profundidad el árbol filogenético de la Figura 12, dentro de las tres familias previamente mencionadas se pueden observar relaciones entre las secuencias obtenidas por secuenciación y las secuencias que se han obtenido en otras especies de esos mismos genes.

La especie de referencia que más ha sido estudiada y descrita es *Arabidopsis thaliana*, cuyos genes aparecen en el árbol con las letras AT seguidas de unos números de referencia. Para la especie modelo de las leguminosas *Medicago truncatula*, también existe una gran cantidad de información sobre sus genes que en el dendrograma aparecen como Medtr seguido de los números de referencia. Gracias a haber incluido estas especies en el árbol filogenético se pueden deducir las características y funciones de estas familias de genes, cuya información ha sido obtenida de la página web UniProt.

En el dendrograma se observa claramente que las secuencias se dividen en dos grupos principales. El primero de ellos engloba los genes denominados *IPK1 α* e *IPK1 β* , todos ellos codificantes de proteínas pertenecientes a la familia inositol 1, 3, 4-trifosfato 5/6-quinasa, aunque la estructura de sus genes es muy distinta. Mientras que los genes *IPK1 α* no presentan intrones, en el caso de los genes *IPK1 β* aparecen 10 exones y 9 intrones, lo que permite la síntesis de varios mRNAs diferentes

El segundo gran grupo está formado por los genes de tipo *IPK2* que codifican proteínas de la familia inositol polifosfato quinasa

4.1 FAMILIA DE LOS GENES *IPK1* α

Los genes de la familia *IPK1 α* aparecen en todas las leguminosas analizadas de manera duplicada, y se han denominado $\alpha 1$ y $\alpha 2$ como se comprueba en el dendrograma, en la soja (*Glycine max*) suelen aparecer dos secuencias relacionadas con cada uno de los grupos; esto indica el carácter poliploide de esta especie, ya descrito previamente (Pfeil *et al.*, 2005)

También se encuentra en la especie *Arabidopsis* un único gen con alta homología a los anteriores, especialmente con las secuencias $\alpha 1$, denominado *ITPK1* estando referenciado en el árbol filogenético con el código AT5G16760.1. Puesto que la búsqueda en el genoma de *Arabidopsis* no ha proporcionado un segundo gen estrechamente relacionado con los de tipo

$\alpha 2$, pudiera ser que en la rama evolutiva que ha conducido a las leguminosas haya existido una duplicación después de haberse separado de la rama evolutiva en la que está incluida *Arabidopsis*.

Este gen se expresa principalmente en las silicuas, dando lugar a un único mRNA que cuando se traduce a proteína sufre un procesamiento en el que solo se elimina la primera metionina. La proteína, denominada inositol-tetrakisfosfato 1-quinasa, se localiza en el citoplasma donde presenta varias actividades como la inositol-1,3,4-trifosfato 5-quinasa, la inositol -1,3,4-trifosfato 6-quinasa y la inositol tetrakisfosfato 1-quinasa. Desde el punto de vista biológico lleva a cabo tres procesos distintos, la fosforilación del inositol, el procesamiento metabólico del inositol trifosfato y la biosíntesis del inositol hexakisfosfato (*Figura 12*).

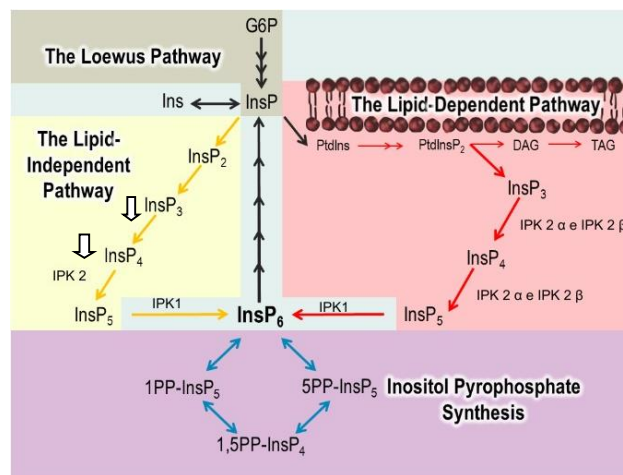
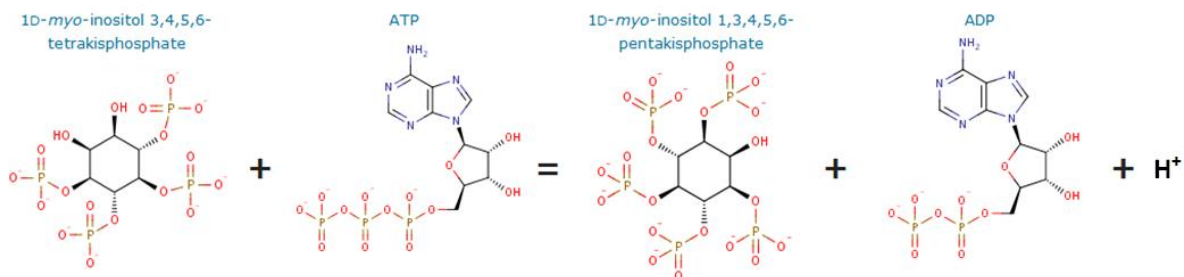


Figura 12: Esquema de la síntesis del ácido fítico en el que se encuentran señaladas con una flecha las reacciones en las que actúa el producto de este gen.

Para llevar a cabo las diferentes funciones moleculares, la quinasa es capaz de fosforilar tanto el Ins(3,4,5,6)P4 como el Ins(1,3,4)P3.





Así como la fosforilación del Inositol (3,4,5,6)tetrakisfosfato que da lugar al Ins(1,3,4,5,6)P₅, cuya reacción tiene importancia reguladora ya que el Ins(3,4,5,6)P₄ es un inhibidor de Ca⁺² en la membrana plasmática, activando los canales de Cl⁻; mientras que su producto no lo es.

Además, fosforila Ins(1,3,4)P₃ en el oxígeno 5 y 6 para formar Ins(1,3,4,6)P₄; estas moléculas son esenciales para la ruta de síntesis del hexakisfosfato, antes comentada.

Si se produce una mutación en este gen que elimine la actividad enzimática de la proteína, aparecen fenotipos deletéreos ya que no pueden llevar a cabo las reacciones antes comentadas y no se sintetiza InsP₆ (ácido fítico), por lo que se reducen los niveles de este en el tejido de la semilla, y a su vez se disminuye la supervivencia de la planta.

4.2 FAMILIA DE LOS GENES *IPK1 β*

Las dos secuencias de lenteja que se denominaron en un primer momento *β.1* y *β.2* se agrupan en un único conjunto, además en el dendrograma aparecen intermezcladas, lo que sugiere que pertenecen a una única familia con varios genes. En esta familia también se encuentran dos genes en *Arabidopsis* al igual que en las demás leguminosas. En la búsqueda de genes homólogos a *IPK1 β.1* de *Lens culinaris*, el de mayor similitud en *Arabidopsis* fue el referenciado como AT4G08170.2, mientras que para *IPK1 β.2* fue AT4G33770.1.

El gen AT4G08170 se denomina *ITPK3* en *Arabidopsis* y la proteína que codifica se denomina inositol-tetrakisfosfato 1-quinasa 3. Este gen presenta 9 intrones y puede dar lugar al menos a dos mRNAs distintos durante su procesamiento, aunque el número real pudiera ser de hasta 7, el significado funcional de las diferencias no se conoce.

Este gen se expresa en altos niveles en las hojas y las flores de la planta y en niveles más bajos en la raíz, tallos, hojas de los tallos y en las silicuas. El mRNA mayoritario codifica una proteína que presenta la actividad inositol-1,3,4-trifosfato 5-quinasa, inositol-1,3,4-trifosfato 6-quinasa y inositol tetrakisfosfato 1-quinasa. Estas funciones son idénticas a las que lleva a cabo la familia de genes *IPK1α* que se ha comentado anteriormente, lo que sugiere una redundancia funcional, aunque el momento de expresión y su regulación explicaría las diferencias fenotípicas observadas en los mutantes obtenidos. Además realiza una serie de procesos biológicos como son la fosforilación del inositol, el procesamiento metabólico del inositol trifosfato y parece que este tipo de genes están implicados en la regulación de la respuesta de la planta frente a heridas.



Para llevar a cabo estas funciones el gen sintetiza dicha proteína, que es una quinasa capaz de fosforilar tanto en $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ como el $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, al igual que la quinasa de la familia de los genes *IPK1* α . Por ello lleva a cabo las mismas reacciones que se han comentado con anterioridad.

En cambio, la secuencia de *Arabidopsis* que mostró mayor homología *IPK1* $\beta.2$ de *Lens culinaris* fue AT4G33770. Este gen, también denominado *ITPK2*, codifica la proteína inositol-tetrakisfosfato 1-quinasa 2 que lleva a cabo las mismas funciones catalíticas que las proteínas anteriores (inositol-tetrakisfosfato 1-quinasa 1 e inositol-tetrakisfosfato 1-quinasa 3). Sin embargo, su papel parece diferente debido a que los mutantes que carecen de este gen funcional presentan alteraciones en el desarrollo de las cubiertas de la semilla, con contenidos reducidos de mucílagos y modificaciones en las proporciones suberina y cutina. También presentan alteraciones en la columela de la caliptra.

Este gen se expresa en las raíces de las plántulas, cotiledones, hojas de roseta, hojas de los tallos, tallos, flores, silicuas y semillas. Aunque durante el tiempo de desarrollo de la semilla se expresa en la cubierta de la semilla entre el segundo y sexto día después de la fertilización.

Como se ha comentado en el gen anterior, los genes de esta familia poseen intrones y en este caso parece que puede dar lugar a dos mRNA distintos.

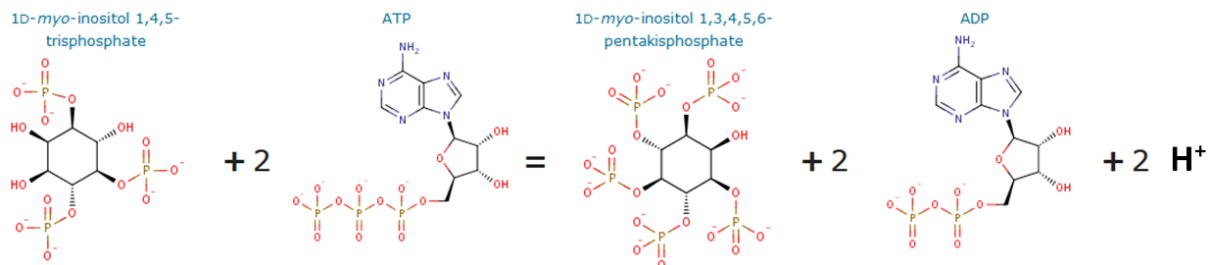
4.3 FAMILIA DE LOS GENES *IPK2*

Para finalizar, describiremos las características de la familia que engloba los genes *IPK 2.1* e *IPK 2.2*. En *Arabidopsis* solo se ha encontrado suficiente homología con la secuencia del gen denominado *IPK2 β* (AT5G61760.1). Del mismo modo, también aparece un único gen en el resto de las especies de leguminosas analizadas, por lo que es posible que se haya producido una duplicación reciente en la rama evolutiva que conduce a la lenteja. De hecho, en guisante, que es la especie filogenéticamente más emparentada con la lenteja de las analizadas, también aparece un único gen. Se consideró la posibilidad de que la existencia de dos genes en lenteja se debiera a un error en la secuenciación, ya que ambos son prácticamente idénticos. Sin embargo, cuando se tuvo acceso al borrador del genoma de lenteja, también se identificaron estos dos genes y situados en dos cromosomas diferentes.

El gen *IPK2 β* codifica la proteína inositol polifosfatomultiquinasa β , la cual es una quinasa que posee una amplia especificidad de sustrato, llevando a cabo la fosforilación de las



siguientes moléculas, Ins(1,4,5)P₃, Ins(1,4,5,6)P₄, Ins(1,3,4,5)P₄, Ins(1,3,4,6)P₄ e Ins(1,2,3,4,6)P₅.



Este gen se expresa específicamente en las hojas, tallos, raíces, silicuas y flores. Se ha detectado también en los conductos vasculares, en las células del estigma, en las zonas de abscisión de las silicuas y en las raíces. Además, se expresa en el polen maduro pero no en los granos de polen inmaduros.

Participa en la vía de señalización de auxinas, regula la ramificación de las ramas axilares y es necesaria para la síntesis de fitatos en semillas.

Las mutaciones que ocasionan la pérdida de función de este gen son compensadas en parte por el gen *IPK2α*. Así *IPK2α* complementa totalmente su función en los tejidos, pero no en las semillas por lo que la planta da lugar a una generación de semillas sin fitato. Este hecho hace de esta familia génica el blanco ideal para obtener cultivares con bajo contenido de ácido fítico, aunque no está libre de efectos pleiotrópicos deletéreos, ya que su sensibilidad a la glucosa está alterada lo que afecta al desarrollo de las semillas y la germinación se ve disminuida en presencia de determinados compuestos inhibidores de la síntesis de giberelinas.

Volviendo al análisis global del árbol filogenético, señalar que también se observa como en las 3 familias, las secuencias del cultivar Alpo que se han obtenido en este experimento son prácticamente idénticas a las secuencias que aparecen en el borrador de *Lens culinaris* (*Lc*), y que las relaciones con las secuencias de otras leguminosas reflejan las relaciones evolutivas entre ellas. Así siempre aparecen directamente relacionadas con la otra especie de la misma tribu (Fabeae) *Pisum sativum* (*Psat*), a continuación con *Medicago truncatula*, perteneciente a la tribu Trifolieae, después con garbanzo (*Cicer arietinum*, *Ca*) de la tribu Cicereae, y en último lugar con las especies de la tribu Phaseolae, la judía (*Phaseolus vulgaris*, *Phvul*) y la soja (*Glycine max*, *Glyma*), agrupándose las secuencias de estas dos últimas en primer lugar. Sólo en las secuencias del gen *IPK1 α.2* se observa un intercambio de posición entre *Cicer* y *Medicago*.



Por último se debe resaltar la importancia que presentan las especies modelo y la gran cantidad de información que se puede deducir de las homologías entre secuencias. Evidentemente hasta que no se realiza el análisis funcional directo no se puede establecer completamente el papel que tiene un gen en un proceso, pero gracias a este tipo de análisis se puede partir de una hipótesis concreta que poner a prueba. En relación a la obtención de cultivares con bajo contenido de ácido fítico en las semillas podemos basarnos en los experimentos realizados en *Arabidopsis*. Debido a la facilidad con la que en esta especie se obtienen mutantes con genes no funcionales o que se sobreexpresan, ya se han realizado trabajos modificando los genes correspondientes en esta especie intentando así reducir la cantidad de ácido fítico en las semillas, lo que puede servir como guía y dar una idea de cómo pueden ser los resultados en futuros experimentos en lenteja. En uno de estos experimentos se comprobó cómo mutando distintos genes de manera que no llegasen a expresarse, se reducía claramente la síntesis de ácido fítico. Estos genes son el *ITPK1* y el *IPK2 β* , incluyendo solo los que se han estudiado para este trabajo (Kim et al., 2011), y que serán los primeros genes de estudio en proyectos futuros.

También es necesario señalar que en el metabolismo y la acumulación del ácido fítico intervienen otros muchos genes de los que, de momento carecemos de información en lenteja. Es previsible que en un futuro próximo, cuando se haga público el genoma de esta especie, se aceleren los conocimientos sobre estos procesos.



5. CONCLUSIÓN

En este trabajo se han validado las secuencias de los genes *IPK* obtenidas por métodos bioinformáticos, comprobándose con la secuenciación de los mismos en *Lens culinaris*. Se han detectado tres familias de estos genes que son las compuestas por los genes *IPK1* α , *IPK1* β e *IPK2*, lo cual ha sido posible gracias a la obtención de un árbol filogenético que ha relacionado las secuencias obtenidas y las secuencias de distintas especies modelo como por ejemplo *Arabidopsis thaliana*. Además al realizar esta comparación se observa como, por ejemplo, en la familia de los genes *IPK2* hay dos genes distintos en lentejas, mientras que en el resto de las especies solo se encuentra un gen, esto lleva a pensar en una duplicación reciente en la línea filogenética que conduce a la del genoma de lenteja, y también se han detectado posibles duplicaciones en la línea que conduce a las leguminosas. Por último, se han identificado algunos genes cuyo posterior análisis, tanto de expresión como de variabilidad en nuevos genotipos, pudiera ser clave en el desarrollo de nuevos cultivares con contenidos reducidos en ácido fítico y mejor composición nutricional.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Abelson, P.H. (1999) “A potential phosphate crisis”, *American Association for the Advancement of Science*, 283(5410), pp. 1-11.
- Ayet, G., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M.M., Robredo, L.M., Muzquiz, M., de la Cuadra, C., Castaño, A. y Osagie, A. (1997) “Effect of germination, under different environmental conditions, on saponins, phytic acid and tannins in lentils (*Lens culinaris*)”, *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 74, pp. 273-279.
- Baek, D., Chun, H.J., Yun, D.-J., Kim, M.C. (2017) “Cross-talk between phosphate starvation and other environmental stress signaling pathways in plants”, *Molecules and cells*, 40, pp. 697–705.
- Bauchet, G.J., Bett, K.E., Cameron, C.T., et al. (2019) “The future of legume genetic data resources: Challenges, opportunities, and priorities”, *Legume Science*, 1(16).
- Bhatta, R.S. (1988) “Composition and quality of lentil (*Lens culinaris* Medik)”, *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21, pp. 144-160.
- Bohn, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K. (2008) “Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding”, *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3), pp.165-191.
- Browse, J. (2009) “Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone”, *Annual Review of Plant Biology*, 60, pp. 183–205.
- Desai, M., Rangarajan, P., Donahue, J.L., et al. (2014) “Two inositol hexakisphosphate kinases drive inositol pyrophosphate synthesis in plants”, *Plant*, 80(4), pp. 642-653.
- Fassetti, F., Leone, O., Palopoli, L., Rombo, S. E. y Saiardi, A. (2011) “IP6K gene identification in plant genomes by tag searching”, *BMC Proceedings*, 5(2), S1.
- Freed, C., Adepoju, O. y Gillaspay, G. (2020) “Can inositol pyrophosphates inform strategies for developing low phytate crops?”, *Plants*, 9(1), pp. 1-9.
- Jia, Q., Kong, D., Li, Q., Sun, S., Song, J., Zhu, Y. y Huang, J. (2019) “The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), pp. 1–15.
- Kim, S. I. y Tai, T. H. (2011) “Identification of genes necessary for wild-type levels of seed phytic acid in *Arabidopsis thaliana* using a reverse genetics approach” *Molecular Genetics and Genomics*, 286(2) pp. 119–133.



- Laha, D., Johnen, P., Azevedo, C., Dynowski, M., Weiß, M., Capolicchio, S. y Schaaf, G. (2015) “VIH2 regulates the synthesis of inositol pyrophosphate InsP8 and jasmonate-dependent defenses in Arabidopsis”, *Plant Cell*, 27(4), pp. 1082–1097.
- Lorenzo-Orts, L., Couto, D. y Hothorn, M. (2020) “Identity and functions of inorganic and inositol polyphosphates in plants”, *New Phytologist*, 225(2), pp. 637–652.
- Pfeil, B.E., Schlueter, J.A., Shoemaker R.C. y Doyle, J. J. (2005) “Placing paleopolyploidy in relation to taxon divergence: a phylogenetic analysis in legumes using 39 gene families”, *Systematic biology*, 54(3), pp. 441-454.
- Raboy, V. (2020) “Low phytic acid crops: Observations based on four decades of research”, *Plants*, 9(2), pp. 1-5.
- Riley, A.M., Wang, H., Shears, S.B. y Potter, B.V. (2015) “Synthetic tools for studying the chemical biology of InsP8”, *Chem Commun (Camb)*, 51(63), pp. 12605-12608.
- Rouached, H., Arpat, A.B., Poirier, Y. (2010) “Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks”, *Molecular Plant*, 3, pp. 288–299.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., Zheng, N. (2007) “Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase”, *Nature*, 446, pp. 640–645.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K. (2006) “Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, pp. 847–859.
- Williams, S.P., Gillaspay, G.E., Perera, I.Y. (2015) “Biosynthesis and possible functions of inositol pyrophosphates in plants”, *Frontiers in Plant Science*, 6(67).



PÁGINAS WEB CONSULTADAS

- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., y Leunissen, J.A.M. (2007) *Primer3Plus, pick primers from a DNA sequence*. Disponible en: <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> (Accedido: 10 de 02 de 2019)
- Sanderson, L.A., Caron, C.T., Tan, R., Shen, Y., Liu, R. y Bett, K.E. (2019) *KnowPulse: A Web-Resource Focused on Diversity Data for Pulse Crop Improvement*. Disponible en: <https://knowpulse.usask.ca/> (Accedido: 23 de 04 de 2020)

PROGRAMAS DE ORDENADOR UTILIZADOS

- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (2011) MEGA (Versión 5.2) [*Programa de ordenador*]. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/> (Accedido: 17 de 11 de 2018)



universidad
de león





universidad
de león



Según la normativa vigente de la comisión de
TFG, firma este TFG:

Fdo.: Esther Barrio Andrés