



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**ANÁLISIS EN LENTEJA (*LENS CULINARIS*
MEDIK.) DE MARCADORES MOLECULARES
RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL
ESTRÉS POR SALINIDAD.**

**ANALYSIS OF MOLECULAR MARKERS
RELATED TO SALT STRESS TOLERANCE IN
LENTIL (*LENS CULINARIS* MEDIK.)**

Esther Hernández Santillán
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Junio, 2021

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sensibilidad de las leguminosas al estrés salino	2
1.1.1. Germinación y crecimiento	3
1.1.2. Absorción y asimilación de minerales	3
1.1.3. Captación de luz y fijación de carbono	3
1.1.4. Desarrollo de las semillas y rendimiento	4
1.1.5. Calidad de la semilla	4
1.1.6. Fijación biológica de nitrógeno	4
1.2. Mecanismos de tolerancia	5
1.2.1. Homeostasis iónica y tolerancia a la sal	5
1.2.2. Protección osmótica y acumulación de solutos compatibles	6
1.2.3. Regulación antioxidante de la tolerancia a la sal	7
1.2.4. Regulación hormonal	7
1.3. La tolerancia a la sal en lenteja	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS	10
2.1. Material biológico	10
2.2. Determinación de las condiciones de salinidad	10
2.3. Siembra de <i>L. culinaris</i> (cultivar Alpo) y <i>L. odemensis</i>	10
2.4. Análisis estadístico de la germinación	11
2.5. Extracción de RNA de las muestras	11
2.6. Conversión a cDNA	12
2.7. PCR cuantitativa (qPCR)	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1. Análisis estadístico de la germinación	14
3.2. Extracción del RNA. Evaluación de la cantidad y calidad	16
3.3. PCR cuantitativa (qPCR)	17
4. CONCLUSIONES	26
5. REFERENCIAS	27

RESUMEN

Hoy en día, la salinidad es uno de los estreses abióticos más graves que afectan al crecimiento y productividad de los cultivos en todo el mundo, entre ellos la lenteja (*Lens culinaris* Medik). Además, se prevé un aumento drástico en la extensión de las tierras afectadas por estrés salino en los próximos años, lo cual afectará preocupantemente a la agricultura. Existen una amplia variedad de mecanismos utilizados por las plantas para combatir este tipo de estrés, sin embargo, es necesario un estudio más amplio sobre ellos y sobre los genes implicados en la respuesta frente a él. Debido a ello, el objetivo del presente trabajo es el análisis de genes en lenteja relacionados con la tolerancia al estrés por salinidad. Para ello, se utilizaron dos especies de lenteja distintas que presentaban diferentes niveles de tolerancia a dicho estrés (*L. culinaris* y *L. odemensis*) en condiciones de salinidad, y se estudió la expresión de un conjunto de genes utilizando la metodología de RT-qPCR. Los resultados obtenidos permitieron observar la diferencia entre las respuestas de cada genotipo y el importante papel que juegan los genes estudiados en la tolerancia al estrés salino, si bien la complejidad de las respuestas pone de manifiesto la necesidad de ampliar la investigación sobre ellos en nuevos genotipos.

Palabras clave: lenteja, *Lens culinaris*, *Lens odemensis*, salinidad, estrés abiótico, expresión génica

ABSTRACT

Nowadays, salinity is one of the most serious abiotic stresses affecting growing and productivity of crops worldwide, including lentil (*Lens culinaris* Medik). Also, a drastic increase in the area of land affected by salt stress is expected in the coming years, what will affect agriculture worryingly. There is a wide variety of mechanisms used by plants to confront this type of stress, nevertheless a broad study is needed about them and about the genes involved in the response to it. Due to this, the objective of the present study is to analyze the genes in lentil related to salt stress tolerance. To this effect, two different species of lentil showing different levels of tolerance (*L. culinaris* and *L. odemensis*) were germinated under salinity conditions, and a gene expression analysis for a set of genes was carried out using the RT-qPCR methodology. The results allow us to notice the different responses for each genotype, and the vital role of the studied genes in salt stress tolerance, even though it is necessary to expand the investigation about them in new lentil genotypes.

Key words: lentil, *Lens culinaris*, *Lens odemensis*, salinity, abiotic stress, gene expression.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el rendimiento de los cultivos se ve reducido por distintos factores limitantes. La degradación del suelo causado por la salinidad es uno de los estreses abióticos más graves que afectan al crecimiento y la productividad de las plantaciones de todo el mundo. El estrés salino tiene lugar en todas las regiones climáticas, y más del 20 % de la tierra cultivada a nivel mundial, incluido el 33 % de la tierra irrigada, se ve afectada por sus efectos. Se pronostica que estas cifras aumentarán en un 50 % para el año 2050, lo cual supone un grave problema para la agricultura (Singh *et al.*, 2021).

El estrés salino se manifiesta en las plantas a través de dos alteraciones importantes. En primer lugar, y de forma inmediata, altera el equilibrio osmótico en las células, seguido de un desequilibrio iónico lento y tóxico. Esto imita las condiciones fisiológicas de sequía que reducen la capacidad de absorción de agua por las plantas afectadas, de forma que la disminución del potencial hídrico conduce a una reducción de la expansión de las hojas y a una mayor absorción de iones Na^+ y Cl^- hasta niveles tóxicos que alteran los orgánulos y destruyen su metabolismo (Chakraborty *et al.*, 2012).

Además, bajo estrés salino, las células de la raíz acumulan un exceso de Na^+ en lugar de K^+ debido a la similitud de sus propiedades fisicoquímicas tales como su radio iónico o energía de hidratación. Esto conlleva cambios en la proporción K^+/Na^+ y desequilibrio de nutrientes. El K^+ citosólico tiene un papel importante en procesos metabólicos como reacciones enzimáticas, síntesis de proteínas y regulación de la presión osmótica (Shabala y Cuin, 2008). Por tanto, una proporción de K^+/Na^+ elevada en el citosol es considerada un criterio importante para mantener la homeostasis iónica bajo estrés salino, y su caída a niveles bajos genera estrés iónico, el cual provoca clorosis y necrosis en las hojas maduras y senescencia prematura de las hojas más viejas, reduciéndose el área fotosintética y afectando en última instancia al crecimiento y la productividad de las plantas (Carillo *et al.*, 2011). La gran variedad de efectos provocados por estrés salino en plantas se puede ver en el esquema de la **Figura 1**.

Las plantas, por su parte, han desarrollado varios mecanismos de adaptación contra la salinidad como la entrada restringida de Na^+ en las células, la exclusión de Na^+ de las láminas foliares y la compartimentalización del Na^+ principalmente en las vacuolas, a través del antiportador Na^+/H^+ , evitando su acumulación en citoplasma o pared celular (Singh *et al.*, 2021).

Hasegawa *et al.* (2000) demostraron el papel de la vía *salt overly sensitive* (SOS) en la

homeostasis iónica y la tolerancia a la sal, en la que las proteínas SOS participan en el desarrollo de las raíces laterales y la actividad del citoesqueleto. Los genes de tolerancia a la sal están regulados a través de una cascada de señalización iniciada principalmente por familias de factores de transcripción como APETALA 2/factor de unión a elementos de respuesta al etileno (AP2/ERF) (Xie *et al.*, 2019), cremallera de leucina básica (bZIP) (Zou *et al.*, 2008) y NAM/ATAF1/CUC2 (NAC) (Nakashima *et al.*, 2012), junto con la señalización regulada por hormonas vegetales (Fahad *et al.*, 2015).

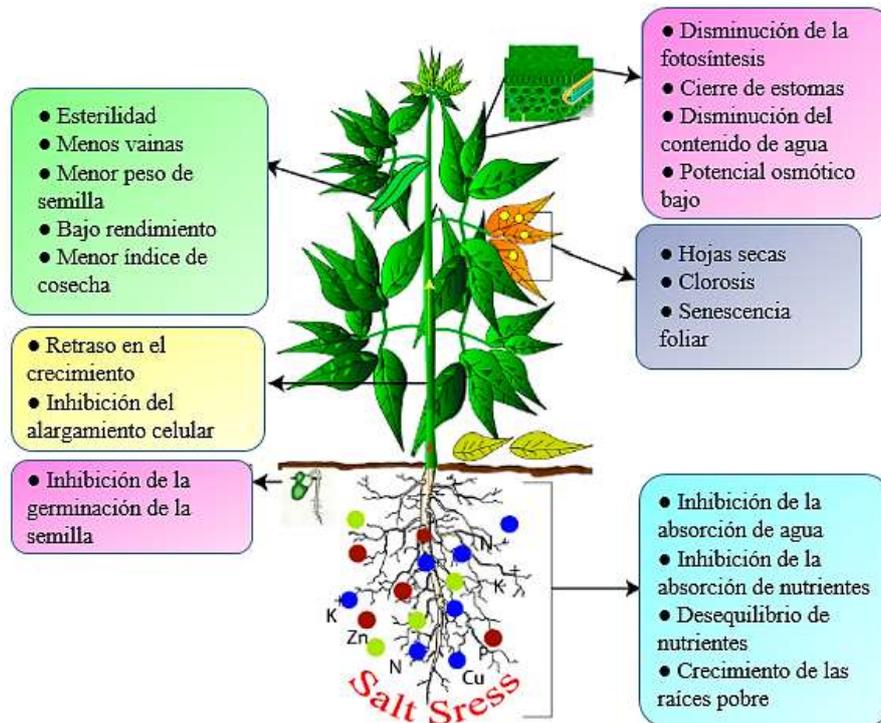


Figura 1.- Representación esquemática de la respuesta de las plantas al estrés salino. Adaptación de Nadeem *et al.* (2019).

1.1. Sensibilidad de las leguminosas al estrés salino

Centrándonos más en la respuesta que manifiestan las leguminosas al estrés salino, la salinidad tiene un impacto devastador en estas plantas debido a su efecto sobre la germinación y el crecimiento, la etapa reproductiva, la asociación simbiótica con *Rhizobium* y consecuentemente sobre la capacidad de fijación de nitrógeno característica de estas plantas, las funciones fisiológicas vitales o la regulación hormonal, además de reducir la fijación de carbono y causar una floración tardía y un número reducido de flores y de vainas. Todo esto en conjunto, conforma una de las principales amenazas para la productividad de los cultivos de leguminosas. (Nadeem *et al.*, 2019).

1.1.1. Germinación y crecimiento

El estrés salino afecta a la germinación inhibiendo la absorción de agua, el primer paso de este proceso fisiológico que activa las enzimas que hidrolizan las reservas de alimento e inician el metabolismo, y/o a causa del efecto tóxico de los iones en el embrión. El surgimiento de la raíz se ve restringido debido a la reducción del potencial hídrico entre la semilla y el medio externo (Farooq *et al.*, 2017). En las leguminosas, se observa una mayor sensibilidad al estrés salino durante las etapas de plántula y posterior desarrollo que en la etapa de germinación. Esto sigue el modelo bifásico de Munns (1993), donde el estrés osmótico reduce el crecimiento en la primera fase, y la toxicidad iónica aparece en la segunda fase. En las semillas de leguminosas, la movilización del almidón se produce principalmente durante el establecimiento de las plántulas, que es muy sensible al estrés por salinidad (Gholipour *et al.*, 2000).

1.1.2. Absorción y asimilación de minerales

La presencia de sal en el medio afecta a la disponibilidad, la absorción competitiva y la translocación de nutrientes a las partes aéreas de la planta. En condiciones de salinidad, la abundancia de concentraciones de iones Na^+ y Cl^- en la rizosfera provoca un desequilibrio nutricional en las plantas, debido a que estos iones interfieren con otros elementos como el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), boro (B), calcio (Ca), zinc (Zn), cobre (Cu), magnesio (Mg) y hierro (Fe). La competencia entre estos elementos enumerados y los iones Na^+ y Cl^- para introducirse en la planta inhibe la asimilación y absorción por el tejido foliar de los primeros (Farooq *et al.*, 2017).

Además, se ha visto que los efectos nocivos del estrés por salinidad en la planta pueden ocurrir también a través de un desequilibrio iónico, particularmente de K^+ y Ca^{2+} . Las plantas deben mantener concentraciones relativamente más altas de K^+ y Ca^{2+} para sobrevivir exitosamente a un ambiente salino. Sin embargo, las altas concentraciones de sal disminuyen las de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y otros cationes, que juegan un papel vital en la actividad fotosintética de la planta (Nadeem *et al.*, 2019).

1.1.3. Captación de luz y fijación de carbono

La salinidad reduce la fotosíntesis en leguminosas. Bajo condiciones de salinidad, la fijación de carbono en leguminosas (fotosíntesis C3) disminuye debido a una reducción de la disponibilidad de CO_2 causada por el cierre de los estomas (Flexas *et al.*, 2004). El estrés oxidativo inducido por el estrés salino está causado por la producción excesiva de especies

reactivas de oxígeno (ROS) que producen daño oxidativo en varios componentes celulares como proteínas, lípidos y DNA, lo cual interfiere con las funciones celulares vitales de la planta (Gupta y Huang, 2014).

1.1.4. Desarrollo de las semillas y rendimiento

El estrés salino inhibe el crecimiento de las leguminosas y reduce sus rendimientos entre un 12 y un 100 %. El número de vainas por planta, de semillas por vaina y el peso de las semillas individuales son los principales determinantes del rendimiento de la semilla en leguminosas (Farooq *et al.*, 2017).

1.1.5. Calidad de la semilla

El estrés por salinidad tiene diversos efectos sobre la calidad y composición de las leguminosas. Reduce el contenido en carbohidratos, aminoácidos y proteínas de las semillas, pero puede aumentar el contenido de aceite en las legumbres. La reducción en el contenido de carbohidratos se debe generalmente a la toxicidad de iones específicos, a los desequilibrios nutricionales y/o a la reducción de la fotosíntesis. Sin embargo, el contenido reducido de proteínas y aminoácidos se atribuye a un menor suministro de N (Abdul Qados, 2011).

1.1.6. Fijación biológica de nitrógeno

El estrés salino interfiere con la fijación biológica y la absorción de N, lo cual limita el suministro de N en las leguminosas. La fijación biológica de N se lleva a cabo en unas estructuras especiales denominadas nódulos, que se desarrollan en las raíces de las leguminosas; sin embargo, el mecanismo de nodulación es muy sensible al estrés por salinidad (Farooq *et al.*, 2017).

El efecto adverso de la salinidad sobre la relación simbiótica entre la planta y *Rhizobium* se debe a una reducción de la actividad nitrogenasa causada por la disminución de la proteína leghemoglobina y la reducción de los bacteroides, las células diferenciadas especializadas en la fijación del N. El daño a los bacteroides inducido por la salinidad aumenta debido a la inhibición del suministro de C, principalmente en forma de malato, posiblemente debido a la inhibición de la sacarosa sintasa y la fosfoenol piruvato carboxilasa inducida por estrés salino (L'taief *et al.*, 2007). Las cepas de rizobios difieren significativamente en su sensibilidad al estrés salino, pudiendo algunas de ellas (como *Sinorhizobium meliloti*) mantener el crecimiento entre 300 y 700 mM NaCl. Sin embargo, la mayoría de ellos no pueden tolerar los efectos nocivos de las

altas concentraciones salinas (Elisaveta y Konstantina, 2021).

1.2. Mecanismos de tolerancia

Para intentar aumentar el rendimiento de las leguminosas bajo estrés salino, en primer lugar, es necesario comprender los mecanismos de tolerancia. Las plantas evolucionan a través de diversas adaptaciones como la homeostasis iónica, la acumulación de solutos compatibles, la protección osmótica, la regulación antioxidante y la regulación hormonal (Nadeem *et al.*, 2019).

1.2.1. Homeostasis iónica y tolerancia a la sal

La homeostasis iónica es uno de los mecanismos predominantes de las células bajo estrés salino. Ayuda a mantener concentraciones más bajas de Na^+ y concentraciones más altas de iones K^+ . La regulación del flujo de iones de Na^+ y K^+ intracelulares es fundamental para las actividades de varias enzimas citosólicas, así como para la regulación del volumen celular y el mantenimiento del potencial de membrana (Hasegawa *et al.*, 2000). Bajo condiciones de salinidad, las plantas eliminan las sales innecesarias del citosol a través de transporte activo primario junto con transporte secundario con el fin de mantener los niveles citosólicos de Na^+ y K^+ , de forma que las células vegetales regulan estos transportadores catiónicos en el tonoplasto y las membranas plasmáticas. Además, las plantas también recurren a la compartimentación o exclusión de Na^+ de la vacuola para evitar los efectos letales del Na^+ en el citosol celular (Li *et al.*, 2006).

Se ha descrito el papel de una vía denominada *salt overly sensitive* (SOS) en la homeostasis iónica y la tolerancia a la sal (**Figura 2**). La vía SOS se compone de tres proteínas principales, SOS1, SOS2 y SOS3. El gen *SOS1* codifica el antiportador de Na^+ / H^+ y es esencial para la regulación de la salida de Na^+ de la célula. La sobreexpresión de *SOS1* mejora la tolerancia a la sal en las plantas. El antiportador SOS1 ayuda a eliminar el exceso de Na^+ de las raíces, que carecen de vacuolas grandes que permitan una compartimentalización de Na^+ significativa, y participa en el transporte de Na^+ a larga distancia en el xilema (Nadeem *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2002). El homólogo de *SOS1* se ha observado en todas las plantas cultivadas y juega un papel fundamental en las leguminosas en condiciones de salinidad (Mishra *et al.*, 2014). *SOS2* codifica una proteína quinasa específica de serina / treonina y es estimulado por señales de Ca^{2+} provocadas por el estrés salino. Consta de un dominio regulador C-terminal y un dominio catalítico N-terminal. *SOS3* es una proteína de unión a Ca^{2+} (Nadeem *et al.*, 2019). Tiene un

sitio de miristoilación en el extremo N-terminal que juega un papel fundamental en la regulación de la tolerancia a la salinidad debido a su implicación en la unión con el Ca^{2+} y la interacción con SOS2 (Ishitani *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis*, la expresión del gen *SOS1* está regulada positivamente por el estrés de NaCl debido a su papel en la tolerancia al Na^+ . Y, a su vez, la función de la proteína SOS1 se encuentra controlada por otras dos proteínas de la vía SOS, SOS2 y SOS3 en raíz o CBL10 (SCaBP8) en tallo (Ji *et al.*, 2013). En cuanto al mecanismo de funcionamiento de la vía, *SOS3* y su equivalente en tallo (*CBL10*) codifican una proteína de unión a calcio que funciona como un sensor de calcio que percibe el aumento de Ca^{2+} citosólico desencadenado por el exceso de Na^+ que ha entrado en el citoplasma debido al estrés salino. Al unirse al Ca^{2+} , SOS3 es capaz de interactuar y activar a la proteína serina/treonina quinasa SOS2. El complejo SOS3-SOS2 se traslada a la membrana plasmática, donde SOS2 fosforila y activa a SOS1 y comienza a funcionar. Por otro lado, el complejo SOS3-CBL10 en tallos parece estar también involucrado en la acumulación y secuestro del Na^+ en vacuolas (Ji *et al.*, 2013; Van Zelm *et al.*, 2020).

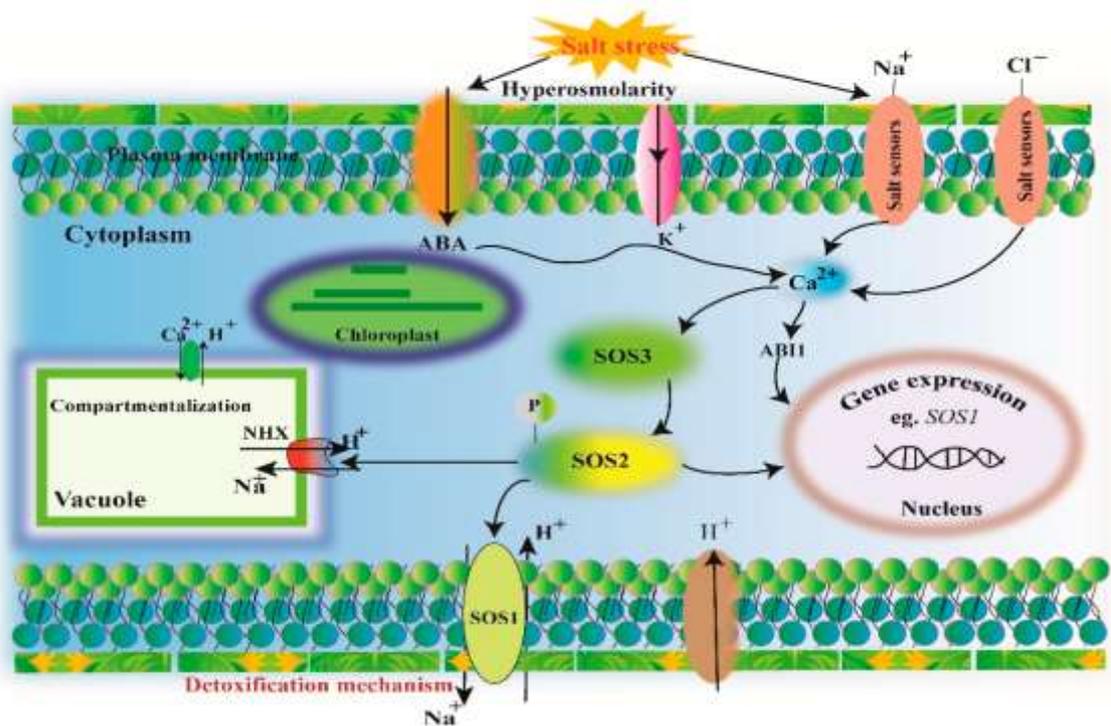


Figura 2.- Representación esquemática de la vía *salt overly sensitive* (SOS) para la respuesta al estrés salino. El aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol inducido por el estrés salino, es detectado por SOS3. SOS3 trabaja conjuntamente con SOS2 desencadenando su actividad quinasa. El complejo SOS2-SOS3 se localiza en la membrana plasmática. SOS2 fosforila entonces a SOS1 desencadenando su actividad antiportadora (Na^+ / H^+) que implica la salida de Na^+ de la célula (Nadeem *et al.*, 2019).

1.2.2. Protección osmótica y acumulación de solutos compatibles

Para afrontar los efectos osmóticos nocivos que conlleva el estrés salino, las plantas de cultivo ponen en marcha una estrategia denominada osmorregulación, en la cual el potencial hídrico de

la célula disminuye sin disminuir la turgencia. El ajuste del estrés osmótico se lleva a cabo a través de la absorción de iones y de la síntesis de solutos como polioles, azúcares, amidas, aminoácidos, compuestos de amonio cuaternario y proteínas (Garg y Noor, 2009). En diversos estudios se ha observado que la prolina y la glicina betaína (GB) son los osmolitos clave involucrados en la osmorregulación, que disminuyen los efectos del estrés osmótico en leguminosas (Qurashi y Sabri, 2013).

1.2.3. Regulación antioxidante de la tolerancia a la sal

El estrés por salinidad resulta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las células, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, conduciendo al estrés oxidativo. Las leguminosas tolerantes a la sal tienen un sistema de defensa antioxidante para tratar los ROS. Las plantas constan de una amplia gama de antioxidantes no enzimáticos como glutatión, carotenoides, flavonoides o flavonas; y otros enzimáticos como la glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasas (GPX), superóxido dismutasa (SOD) o glutatión S-transferasas (GST). El aumento de las actividades antioxidantes en las leguminosas ayuda a mejorar la tolerancia a la salinidad al proteger frente al estrés oxidativo (Nadeem *et al.*, 2019).

1.2.4. Regulación hormonal

Las hormonas vegetales o fitohormonas son sustancias químicas que participan en la regulación del crecimiento de las plantas. Las principales hormonas vegetales incluyen auxinas, citoquininas y giberelinas (promotoras del crecimiento) y etileno y ácido abscísico (ABA) (retardantes del crecimiento). Bajo estrés salino, normalmente se observan cambios en etileno y ABA, conocidas como las hormonas del estrés. El aumento en la concentración de ABA en las hojas y otros tejidos, no solo afecta al cierre de estomas, sino que mejora la adaptación a la sal mediante el ajuste osmótico y la síntesis de proteínas de estrés involucradas en la tolerancia a la sal. También se observó que, bajo condiciones de salinidad, la síntesis de etileno en nódulos y raíces activó la senescencia foliar, pero no se asoció con un crecimiento relativamente menor. Así, la salinidad produce cambios en las concentraciones de fitohormonas que inducen alteraciones en el ajuste osmótico, la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas (Farooq *et al.*, 2017).

La respuesta global de las leguminosas frente al estrés salino se puede ver en la **Figura 3**.

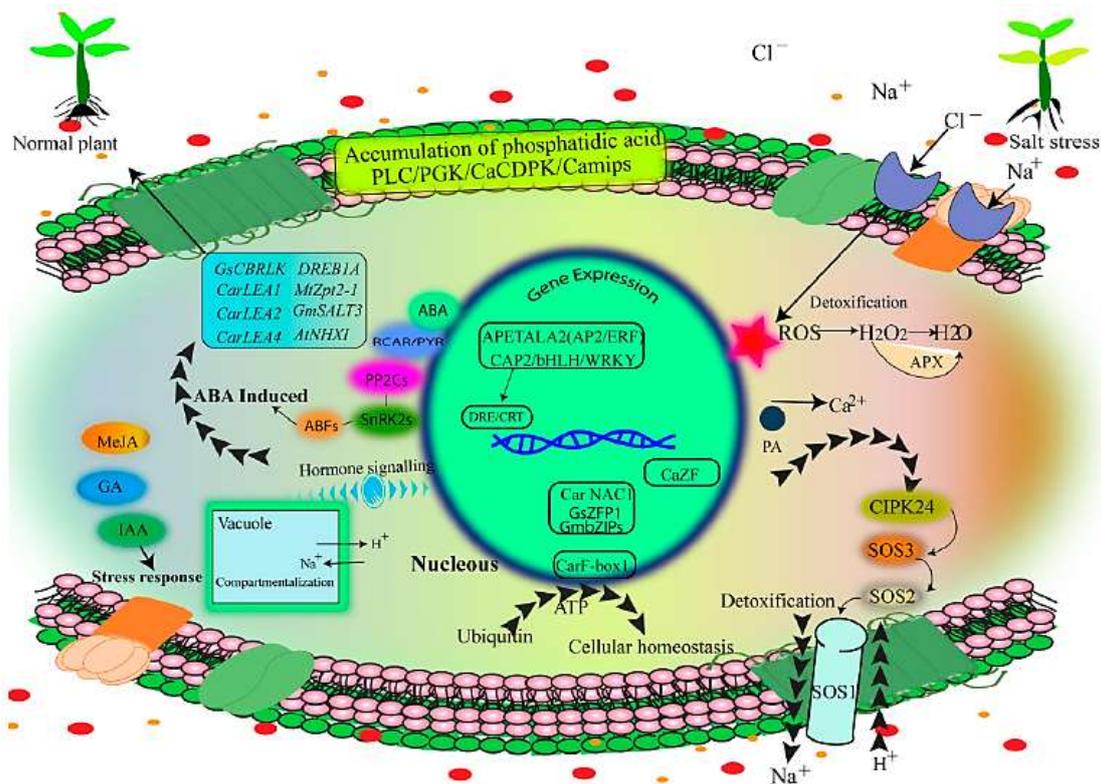


Figura 3.- Representación esquemática del mecanismo de tolerancia a la salinidad en leguminosas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los iones Ca^{2+} se incrementan bajo condiciones salinas. El estrés salino también induce la síntesis de ABA que, a su vez, regula positivamente la transcripción de los genes de los transportadores de iones (Nadeem *et al.*, 2019).

1.3. La tolerancia a la sal en lenteja

La lenteja es una especie de leguminosa muy sensible a la salinidad. Las respuestas que presenta frente al estrés salino varían con la etapa de crecimiento, el nivel de salinidad y con algunos factores ambientales. Al igual que las demás leguminosas, las lentejas son más susceptibles a este tipo de estrés durante el establecimiento de las plántulas y las etapas de crecimiento. Sus raíces son muy sensibles a los suelos salinos cuyo crecimiento se ve limitado afectando, entre otros, a la fijación de nitrógeno. También se producen retrasos en la germinación de las semillas y disminución de su viabilidad, así como del crecimiento. Además, la salinidad incrementa la pigmentación de las antocianinas en hojas, que lleva al amarillamiento, muerte y marchitamiento de las mismas. Se ven también afectadas las características morfológicas y fisiológicas de las plantas, como la altura, el contenido en clorofilas, la fotosíntesis, las actividades enzimáticas o el contenido de DNA y RNA entre otros (Gupta *et al.*, 2019).

En la lenteja (*Lens culinaris* subsp. *culinaris*, $2n = 14$) se han llevado a cabo enfoques de mejora genética convencionales, basados en cruzamientos entre líneas con diferentes grados de tolerancia a la salinidad. Sin embargo, los resultados obtenidos se han visto restringidos por las limitaciones en los fenotipados que se realizan en el laboratorio, por la baja variación genética

en los cultivares, por el desconocimiento de los genes que realmente aumentan la tolerancia al estrés en el campo y por la dificultad de transferencia de genes de especies silvestres (generalmente más resistentes) a la especie domesticada.

Actualmente se están desarrollando nuevas metodologías, basadas en el análisis de imagen, que sirvan para obtener rápidamente valores de tolerancia objetivos que puedan aplicarse a centenares o miles de plantas (Dissanayake *et al.*, 2020). Utilizando este tipo de análisis en combinación con las metodologías tradicionales, Dissanayake *et al.* (2021) han realizado un estudio de tipo GWAS (*genome-wide association study*) en el que analizaron más de 50000 marcadores genéticos de tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) en 276 cultivares que presentaron diferentes niveles de tolerancia. De este modo han detectado dos regiones en el genoma (una en el cromosoma 2 y otra en el cromosoma 4) que presentan genes asociados a la tolerancia a salinidad, si bien la identificación de los mismos está en curso. Es de señalar que el gen *SOS1* está localizado en la región del cromosoma 4, aunque es esa misma zona aparecen otros muchos genes que pudieran jugar un papel en la tolerancia al estrés.

Un enfoque alternativo y eficaz para obtener un conjunto de genes candidatos relacionados con la respuesta al estrés salino es la realización de estudios transcriptómicos, de modo que se identifiquen los genes que muestran mayores cambios de expresión en las condiciones de estrés. Esta aproximación ha sido la abordada por Singh *et al.* (2021), en cuyo trabajo se propone un conjunto de genes cuyos cambios de expresión en condiciones de estrés en el laboratorio podrían utilizarse como posibles indicadores del grado de tolerancia que presentarán las plantas en condiciones de campo.

Debido a la necesidad de obtener información acerca de los mecanismos y genes implicados en la respuesta a la salinidad, previa al estudio de posibles estrategias para la mejora de la tolerancia en estos ambientes, en el presente trabajo se analizarán los cambios de expresión en el gen *SOS1*, así como en el conjunto de genes propuesto por Singh *et al.* (2021) con el objeto de validar sus resultados en dos genotipos que se han utilizado previamente en el área de Genética de la Universidad de León, y para los que se dispone de un mapa genético muy completo (Polanco *et al.*, 2019).

Dentro del ciclo de vida de las plantas, el momento de la germinación es el más crítico (Foti *et al.*, 2019), por ello se ha elegido esta etapa para utilizarla como un indicadora del grado de tolerancia al estrés producido por la salinidad y en la que analizar los cambios de expresión génica.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

Para el estudio se utilizaron los genotipos de dos especies de lenteja: *Lens culinaris* subsp. *culinaris* Medik. cv. Alpo y *Lens odemensis* Ladiz. De cada una de estas dos especies se tomaron unas 100 semillas. Cabe señalar que, en el caso de *L. odemensis*, por ser una especie silvestre, consta de una cubierta dura, por lo que fue necesario realizar un procedimiento de escarificación mecánica en dichas semillas utilizando unas tijeras pequeñas. Este procedimiento consiste en realizar un corte en el tegumento con cuidado de no dañar el interior de la semilla, de forma que el endospermo entra en contacto con el aire y el agua, acelerándose la germinación. Una vez obtenidas todas las semillas, se llevó a cabo la esterilización de las mismas. Trabajando en campana de flujo laminar horizontal, se distribuyeron las semillas en dos tubos de ensayo según la especie y en ellos se realizaron los lavados correspondientes:

- Lavado rápido con alcohol 70 %
- Lavado con agua destilada estéril
- Lavado con una solución de hipoclorito sódico (3 partes de lejía apta para uso alimentario : 1 parte de agua destilada estéril) durante 3 minutos
- Dos lavados consecutivos con agua destilada estéril y mantenimiento de las semillas en el agua hasta realizar el siguiente paso.

2.2. Determinación de las condiciones de salinidad

Para realizar el estudio comparativo de la capacidad de tolerancia a niveles crecientes de salinidad, la reproducción de las condiciones salinas se consiguió con la preparación de distintas soluciones de NaCl. Se prepararon soluciones a distintas concentraciones: una solución control de concentración 0 mM NaCl y tres soluciones tratamiento de 30 mM NaCl, 60 mM NaCl y 120 mM NaCl. A partir de estas soluciones, se llevaron a cabo ensayos para comprobar su efecto sobre las semillas de lenteja.

2.3. Siembra de *L. culinaris* (cultivar Alpo) y *L. odemensis*

Las semillas se germinaron en placas de Petri, en el interior de las cuales se colocó un papel de filtro a medida, y se empapó con la solución correspondiente en cada caso. Se dispusieron 3 placas para cada grupo de estudio, es decir, se hicieron tres réplicas en cada caso. Los grupos de ensayo para cada especie de lenteja fueron: “Control”, “Tratamiento 30 mM NaCl”, “Tratamiento 60 mM NaCl” y “Tratamiento 120 mM NaCl”.

Durante todo el procedimiento de siembra, se trabajó en campana de flujo laminar horizontal y, además, se empleó el mechero de alcohol con el fin de esterilizar el material de trabajo y evitar la contaminación de las semillas en todo momento.

En primer lugar, se rotuló correctamente cada placa con su contenido. A continuación, en cada una de ellas se colocaron dos o tres capas de papel de filtro y se regó cada una con la solución correspondiente hasta cubrir la superficie, pero sin excederse: en caso del control, con agua estéril y en caso los tratamientos, con la solución correspondiente de NaCl. Después, se colocaron las semillas en cada placa utilizando unas pinzas esterilizadas, procurando que no estuvieran muy juntas entre sí. Se pusieron 11 semillas por placa. Una vez sembradas las semillas, se colocaron en bandejas y se introdujeron en la cámara de germinación, cuya configuración de temperatura era de 25 °C (± 1 °C) y de fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se mantuvo un control del estado de las semillas, regándolas en caso de ser necesario, observando su germinación y posibles contaminaciones. Tras 14 días de siembra, se recogieron las semillas de ambas variedades, tanto del control como de los tratamientos, y de las plántulas germinadas, los tejidos de la parte aérea (hojas y tallo) se cortaron en pequeños fragmentos y se introdujeron en tubos Falcon que se almacenaron a -80 °C para su futura extracción de RNA.

2.4. Análisis estadístico de la germinación

Utilizando herramientas estadísticas online proporcionadas por VassarStats (Lowry, 2021) se hizo una comparación de las réplicas de cada grupo para comprobar si existían diferencias significativas o no significativas. Para ello se utilizó el test de Fischer. En caso de obtener diferencias no significativas entre las réplicas, estas se utilizaron como un grupo homogéneo, utilizando el sumatorio de las mismas para realizar un análisis ANOVA y posterior análisis post-hoc con el fin de comparar los grupos dos a dos entre “Control”, “30 mM NaCl”, “60 mM NaCl” y “120 mM NaCl”, y entre *L. culinaris* (Alpo) y *L. odemensis*.

2.5. Extracción de RNA de las muestras

Se tomaron las muestras de parte aérea obtenidas tras la germinación y, en primer lugar, se llevó a cabo una homogenización de las mismas con nitrógeno líquido. En cada tubo de muestra (en total 8 tubos) se añadió nitrógeno líquido, y con ayuda de otro tubo se trituraron las muestras hasta obtener un polvo fino, siempre con cuidado de que no se descongelasen. Una vez pulverizados los tejidos, se procedió a la extracción del RNA en campana de flujo laminar

horizontal.

Para llevar a cabo dicha extracción, se siguieron los pasos indicados en el método de extracción de RNA descrito por Chang *et al.* (1993). En este protocolo, en primer lugar, se preparó un tampón de CTAB y β -mercaptoetanol (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2 % β -mercaptoetanol). Se mezcló con el material verde, se agitó y se incubó durante 15 min a 65 °C para lisar las células completamente. A continuación, se añadieron al lisado 10 mL de cloroformo:isoamílico 24:1 (CHISAM), para eliminar los restos del material vegetal y los compuestos solubles en la fase orgánica creada por el CHISAM, y se equilibraron los tubos por parejas añadiendo CHISAM para introducirlos en la centrífuga durante 20 min a 10000 x g a 4 °C. Después, se llevó a cabo el mismo procedimiento, de manera que se prepararon nuevos tubos de centrífuga con 15 ml de CHISAM y se transfirió a ellos la fase superior obtenida tras la primera centrifugación. Se equilibraron nuevamente por parejas, se mezcló bien el contenido, y se sometieron a centrifugación durante 20 min a 10000 x g a 4 °C.

Una vez finalizada la centrifugación, se transfirió la fase superior de los tubos a otros tubos nuevos y en ellos se añadieron 3 mL de LiCl 10 M, para la precipitación del RNA durante un mínimo de 12 horas a 4 °C, que se equilibró con un preparado de agua-DEPC. Finalmente, tras la precipitación, los tubos se sometieron a centrifugación durante 30 min a 10000 x g a 4 °C. Tras esto, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet (RNA) que se dejó secar y se diluyó en 500 μ L de agua-DEPC.

Finalmente, se llevó a cabo una limpieza y/o concentración del RNA utilizando acetato sódico 3 M pH 5,2 e isopropanol, y llevando a cabo 2 centrifugaciones sucesivas a 20000 x g una de 15 min y otra de 2 min, y, una vez obtenido el material genético, con el fin de confirmar su presencia y determinar su concentración y calidad en cada una de las muestras extraídas, se utilizó el espectrofotómetro NanoDropTM 100. Con los datos de concentración obtenidos se hizo una selección de las muestras que contenían mayor cantidad y calidad de RNA, seleccionando así de las 8 muestras que se tenían, las correspondientes a las partes aéreas de *L. culinaris* (Alpo) “Control”, *L. culinaris* (Alpo) “30 mM NaCl”, *L. odemensis* “Control” y *L. odemensis* “30 mM NaCl” para los pasos posteriores.

2.6. Conversión a cDNA

A partir del RNA extraído de las muestras mencionadas anteriormente, se llevó a cabo su conversión a DNA complementario (cDNA) utilizando el kit *High-Capacity RNA-to-cDNATM* de Thermo Fisher, que contiene el tampón adecuado y la mezcla de enzimas necesaria que, con su actividad conjunta, proporcionan una transcripción inversa específica gracias a las

reacciones producidas en el termociclador. Una vez obtenidos los cDNAs, se conservaron congelados a -20 °C hasta su utilización en el siguiente paso.

2.7. PCR cuantitativa (qPCR)

Por último, se realizaron una serie de PCRs cuantitativas para cuantificar la expresión en las muestras de ciertos genes relacionados con la salinidad. Como genes de referencia o controles se utilizaron los genes *β-tubulina* (Singh *et al.*, 2017) y *RPL2* (Proteína Ribosomal L2) (Sinha *et al.*, 2019) debido a que son genes de expresión constitutiva. Por otro lado, para el estudio de los genes de tolerancia a salinidad, en primer lugar se tomaron los *primers* de genes descritos por Singh *et al.* (2021) como participantes en la respuesta a la salinidad en *Lens culinaris*.

A continuación, se comprobó que los *primers* seleccionados eran específicos del gen diana que se buscaba amplificar en cada caso, utilizando la herramienta BLASTn de KnowPulse (Sanderson *et al.*, 2019). Buscando en la base de datos de lenteja (*Lens culinaris*: CDC Redberry Genome 1.2), se comprobó que ambos *primers*, *forward* y *reverse*, se encontraban sólo en la secuencia del gen de interés y a ambos lados de esta. Por otro lado, se conoce que el gen *SOS1* es un gen importante en la respuesta a la salinidad. Por ello, se utilizaron las herramientas BLASTn y JBrowse de KnowPulse (Sanderson *et al.*, 2019) para buscar la secuencia del gen *SOS1* en el genoma de lenteja. Una vez localizado, se copió su secuencia génica para proceder al diseño de *primers* utilizando Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). En la **Tabla 2**, en la sección de resultados, se muestran los *primers* que se utilizaron para cada uno de los genes a amplificar.

La RT-qPCR se llevó a cabo en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems™). Primeramente, haciendo uso del programa StepOne asociado al equipo, se diseñó la placa de 96 pocillos que se iba a preparar e introducir en el equipo, el cual realizaría un programa determinado. Para la realización de la RT-qPCR se partió de los cDNAs obtenidos de las muestras de parte aérea de ambas variedades de lenteja, que en total eran 4 cDNAs: *L. culinaris* (Alpo) “Control”, *L. culinaris* (Alpo) “30 mM NaCl”, *L. odemensis* “Control” y *L. odemensis* “30 mM NaCl”. Lo primero que se hizo fue una dilución 1:10 de los cDNAs, y, en cada pocillo de la placa se añadieron:

- 7,5 µL de NZY qPCR Green Master Mix (2x) ROX plus (NZYTech)
- 2 µL de cDNA diluido 1:10
- 1,2 µL de cada *primer*
- 4,3 µL de Agua MiliQ

Para que la homogeneidad entre pocillos fuera la mayor posible, se añadieron por separado y uno por cada lado los *primers* correspondientes en cada pocillo y, por otro lado, se realizó una mezcla de los componentes restantes añadiendo las cantidades correspondientes para 27 reacciones. Una vez cargados todos los pocillos de la placa con su contenido correspondiente, esta se introdujo en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems™) en el que se llevó a cabo la RT-qPCR siguiendo los siguientes ciclos: 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto, y una etapa final de desnaturalización desde 60 °C hasta 95 °C con incrementos graduales de 0,3 °C. El equipo realizó la RT-qPCR de forma automática, dándonos los resultados que se analizaron con el software StepOne v2.3. Además, la eficiencia de la amplificación para cada pareja de *primers* se analizó con el programa LinRegPCR v2020.2 (Ruijter *et al.*, 2009).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis estadístico de la germinación

Para el análisis del efecto salino, como se comentó en la sección de materiales y métodos, se probaron distintas concentraciones de NaCl sobre las variedades de lenteja. Este método para la inducción de estrés por salinidad ha sido utilizado por varios autores como Foti *et al.* (2019), siendo un método sencillo para identificar genotipos de lenteja tolerantes a la salinidad. Este autor utiliza NaCl en tres niveles de concentración distintos (50, 100 y 200 mM) incluyendo los respectivos controles. Existen otros procedimientos para inducir el estrés salino utilizados por otros autores como pueden ser la utilización de cultivos hidropónicos o los estudios en campo. La mayor complejidad de estos últimos ha llevado a que en muchos casos se comience con análisis de tolerancia sencillos en el estado de germinación o plántula, ya que se ha comprobado que es un carácter heredable y que facilita el cribado e identificación de genotipos prometedores en la mejora de este carácter (Foti *et al.*, 2019).

En nuestro caso, para ver las diferencias entre las tasas de germinación entre los cuatro grupos (Control, 30 mM NaCl, 60 mM NaCl y 120 mM NaCl), se tomaron los datos de germinación a los 14 días y se sometieron a un análisis estadístico (**Tablas 1 y 2 Anexo**). Para ello se supuso como hipótesis nula que no existían diferencias entre los grupos que se compararon. En primer lugar, para ambas variedades, se realizó el test exacto de Fischer para las 3 réplicas de cada grupo, no obteniéndose diferencias significativas entre ellas, por ello se admitió que eran homogéneas y se trataron como un único conjunto. Haciendo el sumatorio de las tres réplicas, para cada grupo se calculó el porcentaje de germinación y el intervalo de confianza del 95 % para dicho porcentaje. A continuación, se transformaron los porcentajes de germinación

realizando el arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje expresado en grados, para obtener una distribución normal con el fin de realizar el análisis ANOVA y observar las diferencias entre todos los grupos. Se obtuvo que había diferencias significativas entre uno o más tratamientos ($p = 2,88 \times 10^{-9}$) por lo que seguidamente se realizó un análisis post-hoc de Scheffé para comparar 2 a 2 los distintos grupos de tratamientos, obteniéndose los resultados que se muestran en las **Tabla 3 del Anexo** y que se pueden observar más visualmente en la **Figura 4**.

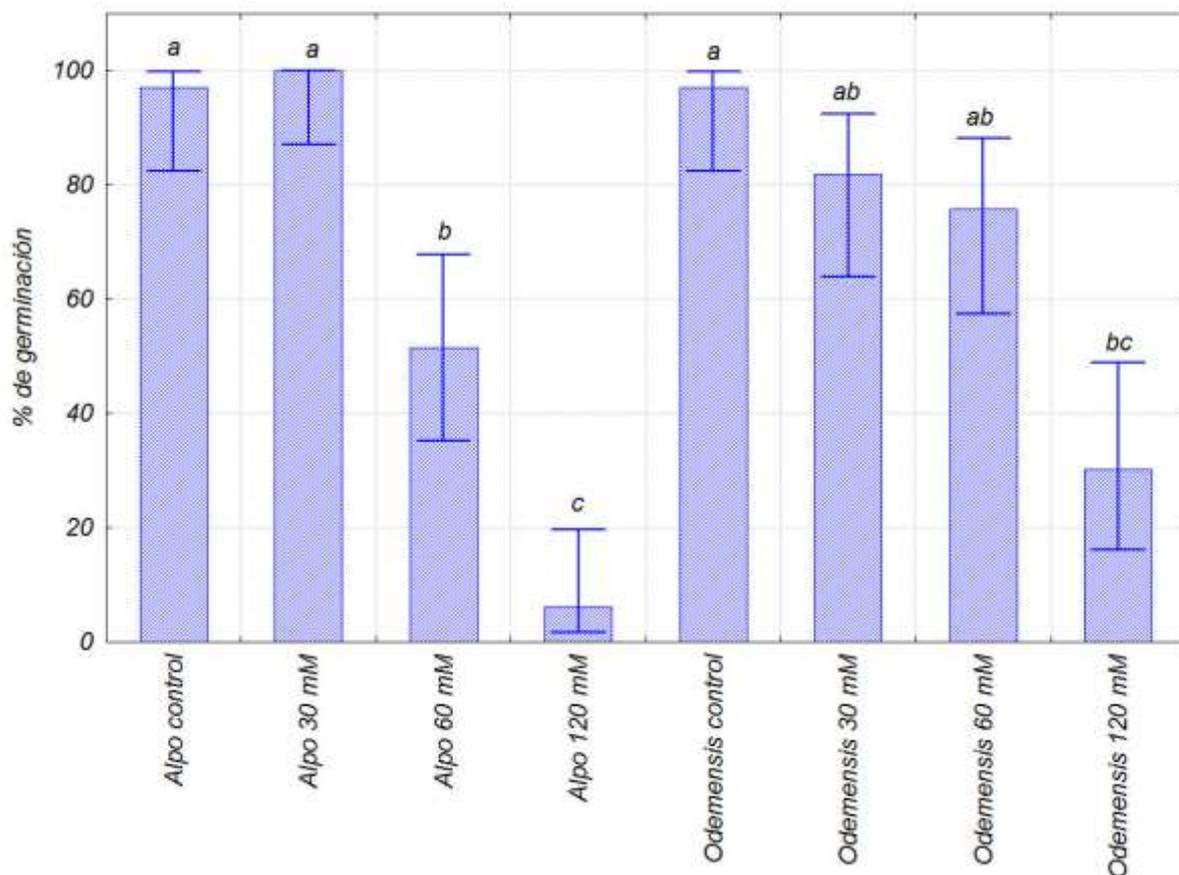


Figura 4.- Porcentajes de germinación a los 14 días de siembra en cada grupo de tratamiento (“Control”, “30 mM NaCl”, “60 mM NaCl”, “120 mM NaCl”) para *L. culinaris* (Alpo) y *L. odemensis*. Los valores con las mismas letras (a, b, c) en las barras no son significativamente diferentes.

A la vista de los resultados obtenidos podemos comprobar cómo el estrés salino inducido por NaCl afecta negativamente a la germinación de las semillas y al crecimiento de las plántulas, tal y como se comentó en la introducción y que apuntaban varias fuentes de información (Faroq *et al.*, 2017, Nadeem *et al.*, 2019). Si comparamos los resultados obtenidos con los tratamientos entre *L. culinaris* (Alpo) y *L. odemensis*, por lo general, parece haber una mayor tolerancia por parte de *L. odemensis*, ya que muestra mayores porcentajes de germinación que *L. culinaris* conforme las concentraciones de sal son más elevadas. En *L. culinaris* (Alpo) vemos como ya se encuentran efectos significativos con el tratamiento de 60 mM NaCl, mientras que en *L. odemensis* los efectos aparecen a mayor concentración de NaCl (120 mM).

Esto podría deberse al hecho de que *L. odemensis* es una especie silvestre y estas especies suelen estar expuestas a condiciones climáticas y edáficas estresantes como podría ser el estrés causado por salinidad (Singh *et al.*, 2017). Sin embargo, serían necesarios estudios posteriores para determinar si realmente *L. odemensis* es más tolerante a las condiciones de estrés por salinidad en condiciones de campo, aunque los datos parecen apuntar en esa dirección.

Tras varios días de tratamiento se observó que las concentraciones de 60 mM NaCl y, sobre todo, de 120 mM NaCl, eran demasiado agresivas ya que, a pesar de obtener algunas semillas germinadas, la longitud de la parte aérea era demasiado pequeña como para poder realizar los análisis posteriores (**Figura 1 Anexo**). Debido a ello se optó por trabajar con las semillas sometidas al tratamiento de 30 mM NaCl para los ensayos realizados posteriormente.

3.2. Extracción del RNA. Evaluación de la cantidad y calidad.

Una vez realizada la extracción del RNA, se comprobó su presencia, cantidad y calidad utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™, capaz de medir la absorbancia del RNA y mostrarnos su concentración y calidad aproximadas. Esta evaluación debe realizarse teniendo en cuenta dos proporciones importantes: la relación de absorbancia de 260/280 nm y la relación 260/230 nm que indican la calidad y la pureza. Unos valores >1,8 en las relaciones mencionadas generalmente se consideran indicadores de buena calidad del RNA (Fleige y Pfaffl, 2006). La extracción y evaluación de RNA se hizo en *L. culinaris* (Alpo) y *L. odemensis*, en los grupos “Control” y “30 mM NaCl” obteniéndose de la parte aérea de las plántulas. Los resultados de concentración obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1.- Concentraciones medias de RNA (ng/μL) extraído de las partes aéreas de las réplicas de los grupos “Control” y “30 mM NaCl”

<i>L. culinaris</i> (Alpo)		<i>L. odemensis</i>	
Control	30 mM NaCl	Control	30 mM NaCl
2670,4	20	591,4	143,3

A continuación, se muestra una de las gráficas de absorbancia obtenidas con NanoDrop™ (**Figura 5**) que revela que el RNA con el que estamos tratando tiene tanto una buena calidad, ya que las proporciones 260/280 y 260/230 se encuentran entre los indicadores de una buena muestra (> 1,8), como una cantidad adecuada (591,4 ng/μL).

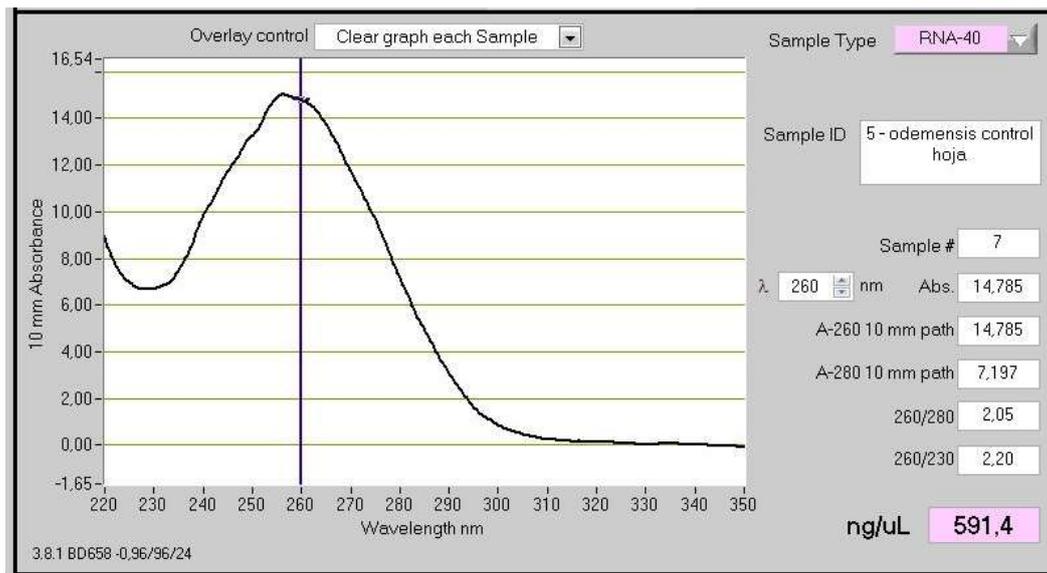


Figura 5.- Gráfica de absorción obtenida con NanoDrop™ para el RNA extraído de la parte aérea de la muestra de *L. odemensis* “Control”.

3.3. PCR cuantitativa (qPCR)

Para llevar a cabo el análisis de expresión y ver los cambios producidos debido al estrés salino, se realizaron PCRs cuantitativas del cDNA obtenido procedente de la parte aérea de los grupos “Control” y “30 mM NaCl” tanto de *L. culinaris* (Alpo) como de *L. odemensis*. Para ello, se estudiaron los cambios en la expresión de varios genes relacionados con la tolerancia a la salinidad descritos por Singh *et al.* (2021).

Para el uso de estos genes, se tomaron los *primers* descritos por Singh *et al.* (2021) y, utilizando la herramienta BLASTn implementada en la página web KnowPulse (Sanderson *et al.*, 2019) se comprobó si ambos aparecían en la secuencia de un gen con la distancia y orientación adecuadas, y si eran específicos del gen en cuestión. Por ejemplo, para comprobar los *primers* del gen *XLOC_004022*, se cogieron las secuencias de los *primers forward* y *reverse*. Se pusieron en formato fasta y se realizó la búsqueda con BLASTn en el genoma de lenteja, obteniéndose los resultados mostrados en las **Figuras 6 y 7**.

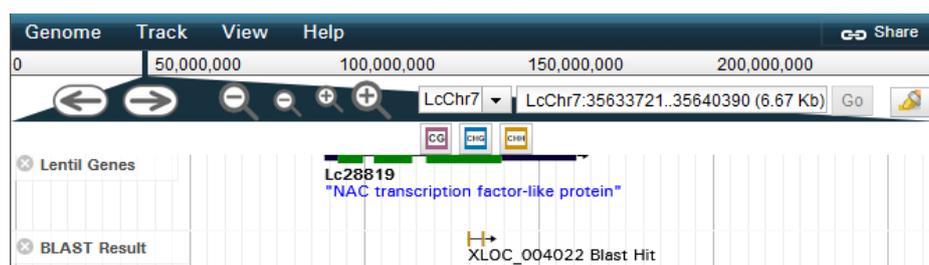


Figura 6.- Resultado de la búsqueda en BLASTn de KnowPulse de los *primers forward* y *reverse* para el gen *XLOC_004022*. La posición de los *primers* en el genoma de lenteja se visualizó mediante la utilización del programa JBrowse (Buels *et al.*, 2016).

Dichos *primers* pertenecen al gen *Lc28819* del genoma de lenteja, localizado en el cromosoma 7 y que está anotado como codificante de una proteína similar al factor de transcripción NAC.

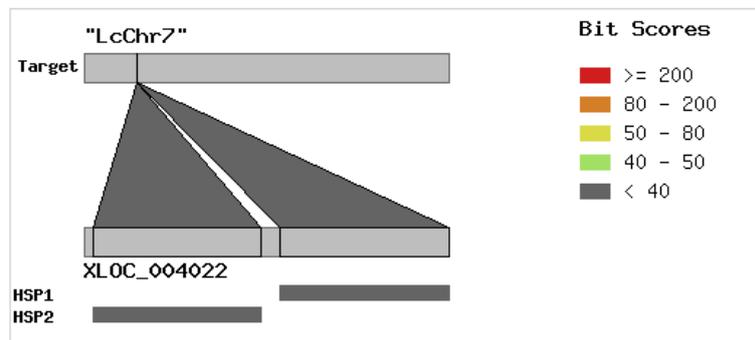


Figura 7.- Posición de los *primers* dentro del gen *Lc28819*

El esquema de la **Figura 7** indica que la secuencia de ambos *primers* aparece en una zona contigua del genoma y en ambas cadenas, siendo específicos del gen en cuestión. Un resultado como el que se presenta indica que los cebadores descritos son útiles para amplificar el gen de interés.

Este procedimiento se llevó a cabo con todos los genes que se utilizan en este estudio, excepto para el gen *SOS1*. Este se ha descrito como un gen muy importante en la respuesta a salinidad en las plantas (Ji *et al.*, 2013) y por ello se buscó específicamente utilizando BLASTn y JBrowse de la plataforma KnowPulse (Sanderson *et al.*, 2019). De este modo se identificó el gen *Lc18674* y su secuencia se introdujo en el programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) para buscar los *primers* que nos permitan analizar el gen *SOS1*. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la **Figura 8**.

Pair 1:						
<input checked="" type="checkbox"/>	Left Primer 1:	Primer_F				
Sequence:		CAAATCCGATCCTTCAATGG				
Start:	171	Length:	20 bp	Tm:	60.3 °C	GC: 45.0 %
				ANY:	5.0	SELF: 3.0
<input checked="" type="checkbox"/>	Right Primer 1:	Primer_R				
Sequence:		CTGGGGAAGCAATAGTTTGG				
Start:	247	Length:	20 bp	Tm:	59.6 °C	GC: 50.0 %
				ANY:	4.0	SELF: 1.0
Product Size:		77 bp		Pair Any:	4.0	Pair End: 1.0

Figura 8.- *Primers forward y reverse* para el gen *SOS1* obtenidos con el programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007).

Con los cebadores obtenidos se llevó a cabo el mismo procedimiento que con los anteriores. Los resultados que se obtuvieron mostraron que estos *primers* eran específicos y podían utilizarse para la amplificación del gen *SOS1* en la qPCR. Finalmente, como controles se utilizaron los genes codificantes de β -tubulina y *RPL2* (Proteína Ribosomal L2) , genes de

expresión constitutiva que fueron identificados como muy estables en condiciones de estrés abiótico (Sinha *et al.*, 2019) y cuyos *primers* fueron descritos por Singh *et al.* (2021) y Sinha *et al.* (2019) respectivamente. A continuación, en la **Tabla 2**, se muestran los genes utilizados en el estudio junto con los *primers* para la amplificación.

Tabla 2.- Genes seleccionados para el ensayo RT-qPCR y *primers forward* (F) y *reverse* (R)

Gen	Descripción	Primers 5'-3'
<i>β-tubulina</i>	β-tubulina	F: CAATGCCACACTTTCTGTGC R: AGAAAGCCTTACGCCTGAAC
<i>RPL2</i>	Proteína Ribosomal L2	F: ATTGAGCTGAACCCAGGACAA R: GACGTGGGCTCCTTCAAGATC
<i>Lc18674</i>	SOS1 (<i>Salt Overly Sensitive 1</i>)	F: CAAATCCGATCCTTCAATGG R: CTGGGGAAGCAATAGTTTGG
<i>Lc06915</i>	Polifenol oxidasa	F: GGATTCATCACCGGCTTGGT R: TCATCAACCTCCAACACCCA
<i>Lc16074</i>	Transportador de la familia de las proteínas intrínsecas principales (MIP)	F: TCCTCAATGCAACCAACCAT R: CCAAGTAAATGGGCTACCA
<i>Lc07532</i>	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa 2	F: ACCTTCTACAACAAGCGGCA R: GGACACGTGGGTCTGAAGTT
<i>Lc10899</i>	Glicosiltransferasa	F: TCTGCTTGTGGACTGTTGGG R: GTCCAAGGATCCATCGGTGA
<i>Lc28819</i>	Proteína similar al factor de transcripción NAC	F: CGGAAGCCAAACACATGGGA R: GAACCTCTTCTCCGTGGGG

Una vez realizadas las qPCRs, los datos obtenidos se analizaron utilizando el software de StepOne v2.3, el cual muestra los datos de la amplificación como diversos parámetros tales como las curvas de temperatura de desnaturalización, los niveles de fluorescencia de los fluorocromos utilizados (SYBR Green y ROX) en cada ciclo, las curvas de amplificación o los niveles de expresión génica. Además, este software nos muestra una tabla resumen en la que se incluyen los errores detectados en cada pocillo como pueden ser una desviación estándar alta del C_t (*Cycle threshold* o ciclo umbral) en el grupo de réplicas, error en el algoritmo exponencial cuando el software es incapaz de identificar la región exponencial del gráfico de amplificación, no amplificación o, uno de los errores más comunes observados, la aparición de múltiples picos de temperatura de desnaturalización (T_m) en las curvas de desnaturalización (**Figura 9**).

Los errores detectados se analizaron manualmente de forma que, si afectaban drásticamente a los estudios posteriores como la expresión de los genes, se descartaron del análisis para optimizar los resultados. Adicionalmente, para completar la información sobre la qPCR se utilizó el programa LinRegPCR v2020.2 (Ruijter *et al.*, 2009) que nos dio datos

complementarios como la eficiencia media y la desviación estándar de los *primers* utilizados (Tabla 4 Anexo).

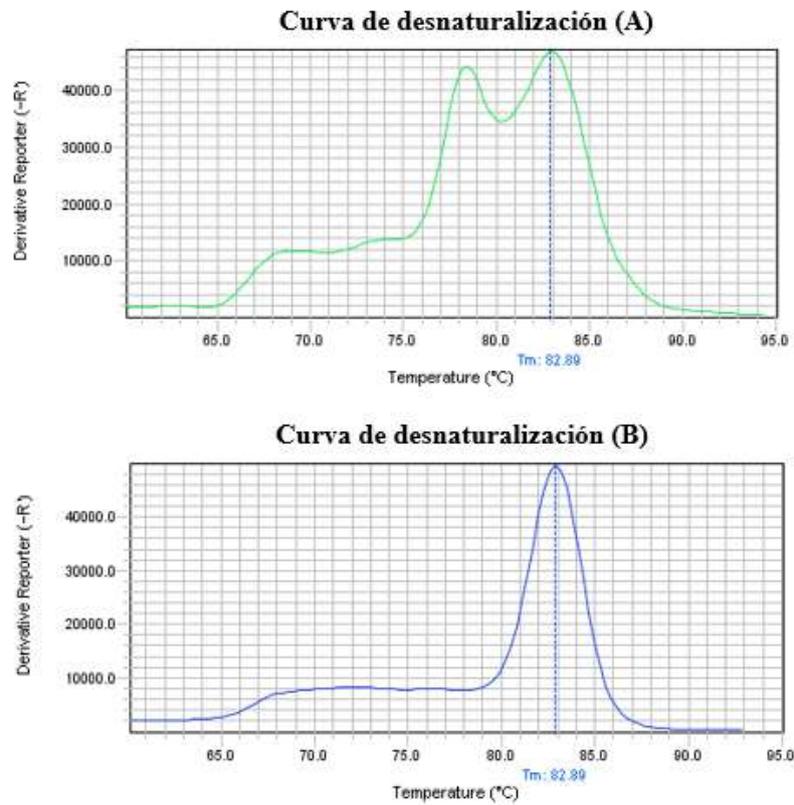


Figura 9.- Curvas de desnaturalización obtenidas en la qPCR. (A) Curva con múltiples picos de T_m correspondiente a la amplificación del gen *Lc06915* de una de las réplicas del grupo “Control” de *L. culinaris* (Alpo). Fue descartada al contener este error. (B) Curva con un solo pico de T_m , sin errores, correspondiente a la amplificación del gen *Lc07532* de una de las réplicas del grupo “Control” de *L. culinaris* (Alpo).

Una vez corregidos los errores manualmente, se analizó la expresión de los genes amplificados, observando si aumentaba o disminuía de forma significativa. Con los datos obtenidos por el software de StepOne™ se obtuvo la gráfica de expresión para cada gen en cada uno de los casos (Figura 10) respecto al control (*RPL2*) ya que para el gen de la β -tubulina no se detectó expresión, posiblemente debido a un error en la secuencia de los *primers* o a una degradación de los mismos. Para expresar la cuantificación relativa (RQ) se utilizó el logaritmo en base dos. En todos los casos se han tomado como referencia las muestras de Alpo control para los cambios relativos de expresión.

Fijándonos en los valores de RQ se pudieron determinar los cambios de expresión mencionados de manera que, si el intervalo de confianza al 95 % no solapa con el intervalo de confianza del control, el gen ha cambiado significativamente su expresión. Si el cambio ha sido un aumento en la expresión, el gen se expresará tantas veces más como corresponda el valor de RQ. Sin embargo, si el cambio ha sido una disminución en la expresión, el gen se expresará tantas veces

menos como el inverso de RQ (1/RQ). Si los intervalos de confianza de las muestras control y de los tratamientos solapan, el gen no habrá cambiado su expresión significativamente. Aquellos casos en los que los intervalos de confianza han sido diferentes de 0, pero han solapado con los intervalos de confianza de los controles, se han considerado como posibles cambios de expresión, aunque no hayan alcanzado el nivel de significación estadística del 5 %.

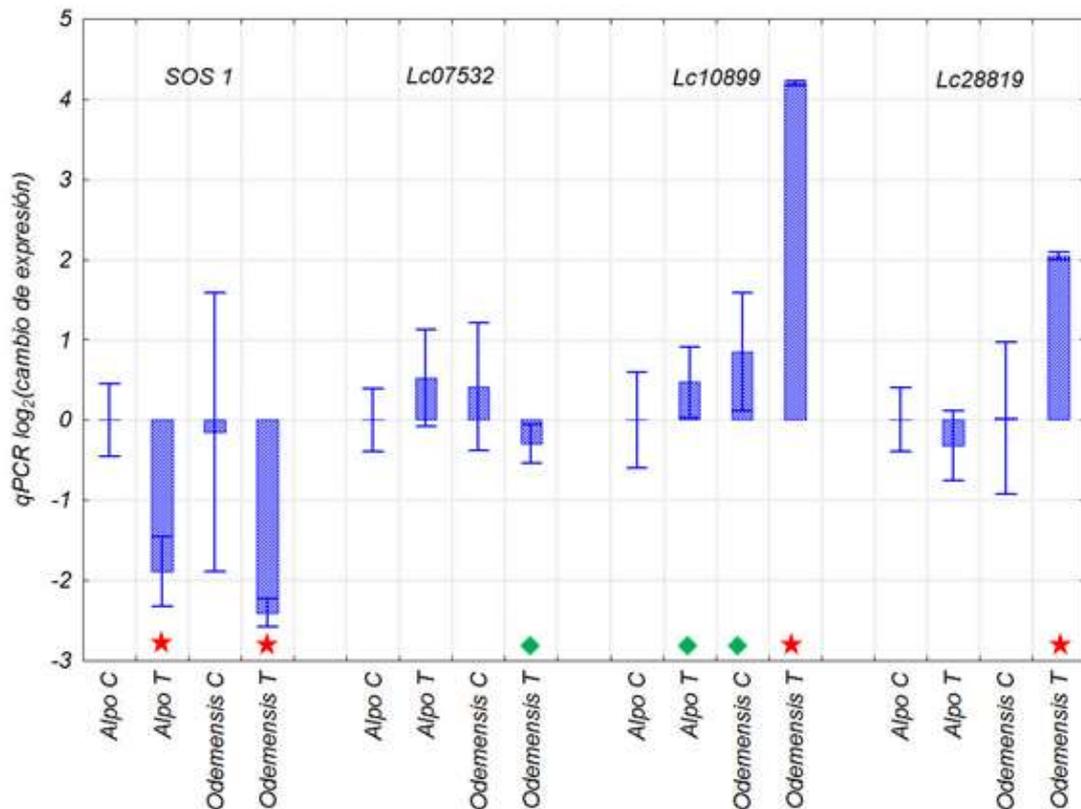


Figura 10.- Resultados de los análisis mediante qPCR. Se pueden observar los cambios de expresión (eje de ordenadas) para cada gen utilizado (indicado en la parte superior) con respecto al control endógeno (*RPL2*) en los grupos “Control (C)” y “Tratamiento: 30 mM NaCl (T)” tanto de *L. culinaris* (Alpo) como de *L. odemensis* (eje de abscisas). Las estrellas en rojo indican los cambios de expresión estadísticamente significativos, los rombos en verde sugieren cambios de expresión, si bien no alcanzan el nivel de significación estadística.

- SOS1:** Como se comentó en la introducción, SOS1 es el principal componente de la vía SOS (*Salt Overly Sensitive*) la cual media la señalización celular bajo estrés salino para mantener la homeostasis iónica (Ji *et al.*, 2013). La pérdida de función de los genes *SOS* da como resultado diferentes niveles de hipersensibilidad al NaCl, siendo los mutantes *sos1* los más sensibles identificados. Estudios en tomate, con plantas transgénicas que sobreexpresaban el homólogo de *SOS2* de *Solanum lycopersicum*, demostraron una mayor actividad antiportadora de Na⁺/H⁺ y K⁺/H⁺ en las membranas intracelulares de la raíz (Huertas *et al.*, 2012). También se ha demostrado que *SOS3* juega un papel clave en la mediación de la reorganización dependiente de Ca²⁺ de los filamentos de actina durante el estrés salino. El ensamblaje y disposición anormal de la actina bajo estrés salino fue más pronunciado en plantas mutantes para *SOS3*, lo cual

indica que la hipersensibilidad a la sal del mutante *sos3* resulta parcialmente de la desorganización de sus filamentos de actina (Ye *et al.*, 2013).

En cuanto a la expresión de este gen en las variedades de lenteja utilizadas en el estudio y como se puede observar en la **Figura 10**:

- *Lens culinaris* (cultivar Alpo) Tratamiento: Su expresión disminuyó significativamente con un valor de RQ de 0,270. Es decir, este gen se expresó 3,704 veces menos.
- *Lens odemensis* Control: Su expresión muestra un nivel similar al de Alpo en las condiciones control.
- *Lens odemensis* Tratamiento: Su expresión disminuyó significativamente con un valor de RQ de 0,189. Es decir, este gen se expresó 5,291 veces menos.

Los resultados no concuerdan con lo publicado en la bibliografía, lo cual ha supuesto una sorpresa ya que en la gran mayoría de los trabajos y en muchas especies distintas encontraron un aumento de expresión bajo condiciones de estrés salino. Sin embargo, recientemente se ha demostrado en *Arabidopsis* que la expresión de *SOS1* depende también del genotipo en otros genes, especialmente algunos que codifican para factores de transcripción de tipo bZIP (Rolly *et al.*, 2020), de modo que plantas de genotipo silvestre presentan inhibición del gen *SOS1* si el gen *AtbZIP62* se activa, mientras que los mutantes de pérdida de función para este gen son los que presentan un incremento en los niveles de mRNA de *SOS1* en respuesta al estrés salino. Además, en los análisis GWAS (Dissanayake *et al.*, 2021), el gen *SOS1* aparece entre los candidatos a proporcionar tolerancia a la salinidad, sin embargo, en los estudios transcriptómicos de lenteja (Singh *et al.*, 2021), este gen no se menciona entre los que cambian de expresión en condiciones de estrés salino. Para comprobar este resultado habría que realizar un estudio en un conjunto de genotipos más amplio y con diferentes metodologías para la inducción del estrés salino.

- **Lc07532**: este gen codifica para una 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis del ácido abscísico (ABA) a partir de carotenoides en respuesta al estrés hídrico (Qin y Zeevaart, 1999).

Una respuesta conocida de las plantas al estrés hídrico es la acumulación de ABA, que es causada por la síntesis *de novo*. Al analizar los efectos de varios estreses sobre la expresión del gen *NCED1* en caupí (*Vigna unguiculata*) se encontró que el gen estaba fuertemente inducido bajo condiciones de alto contenido en sal (Aswath *et al.*, 2005). En concordancia, este gen se encontró regulado al alza bajo condiciones de salinidad en el estudio de Singh *et al.* (2021),

siendo en el caso del genotipo sensible al estrés el que mostró un mayor incremento, mientras que para el genotipo tolerante no se incluye entre los que cambian de expresión. Es posible que los genotipos más tolerantes al estrés salino presenten un nivel de expresión lo suficientemente alto en condiciones normales.

En cuanto a la expresión de este gen en las variedades de lenteja utilizadas en el estudio y como se puede observar en la **Figura 10**:

- *Lens culinaris* (cultivar Alpo) Tratamiento: Su expresión no cambió significativamente.
- *Lens odemensis* Control: La expresión en esta especie se mostró similar a la de Alpo.
- *Lens odemensis* Tratamiento: Su expresión disminuyó con un valor de RQ de 0,815. Es decir, este gen se expresó 1,227 veces menos, aunque no alcanzó la significación estadística necesaria.

Los resultados no concuerdan con lo publicado generalmente en la bibliografía, aunque podría indicar que la respuesta observada, al depender en lenteja del genotipo en concreto y su nivel de tolerancia, se deba a que las muestras utilizadas sean relativamente tolerantes a este estrés.

● **Lc10899**: codificante de una glicosiltransferasa (GT), una enzima encargada de unir una molécula de azúcar a un aceptor específico, formando un enlace glicosídico. Este tipo de enzimas se encuentran en la mayoría de los organismos vivos, teniendo una particular importancia en las plantas, que convierten los productos de la fotosíntesis en disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Además, las GT producen otras moléculas de vital importancia como los polisacáridos de la pared celular, glicoproteínas y diversos tipos de pequeñas moléculas con azúcares adheridos (Keegstra y Raikhel, 2001).

Varios estudios de caracterización funcional de GT de plantas indican que estas proteínas podrían desempeñar un papel importante en el crecimiento, desarrollo e interacción de las plantas con el medio ambiente.

- Participan en la homeostasis hormonal, crucial para el crecimiento, desarrollo y las respuestas de adaptación a los cambios del medio ambiente. Se cree que la glicosilación es un mecanismo que controla el nivel de distintas fitohormonas, ya que se han identificado glucósidos de todas las hormonas clásicas excepto del etileno en plantas. Bioensayos de las actividades de los glucósidos hormonales por aplicación exógena mostraron que las actividades hormonales, por lo general, podrían reducirse o perderse tras la glicosilación, la cual podría alterar el reconocimiento entre los receptores y las hormonas, o cambiar las propiedades de las hormonas (Wang y Hou, 2009).

- Participan en la respuesta defensiva. Hay varios ejemplos que implican el papel de la glicosilación de metabolitos secundarios en la respuesta de defensa de las plantas a diversos estreses (Wang y Hou, 2009).
- Participan en la detoxificación. Las plantas parecen formar enlaces glicosídicos para disminuir la toxicidad de los patógenos, además de poder detoxificar compuestos químicos exógenos como herbicidas, insecticidas, contaminantes o xenobióticos (Loutre *et al.*, 2003).
- Participan en la biosíntesis, modificación, almacenamiento y transporte de metabolitos secundarios (Lim *et al.*, 2005).

Hay varios estudios sobre la implicación de estas GT en el estrés salino. Por ejemplo, la expresión ectópica de la glicosiltransferasa UGT85A5 de *Arabidopsis* en tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgénico mejoró la tolerancia a la sal en las plantas (Sun *et al.*, 2013), o una glicosiltransferasa UGT76C2 modificadora de las citoquininas de *Arabidopsis* mejoró la tolerancia a la sequía y a la sal en el arroz (*Oryza sativa*) (Li *et al.*, 2020). Otro ejemplo es la expresión del gen *CrUGT87A1*, un gen de glicosiltransferasas de azúcar UDP (UGT) de *Carex rigescens*, que aumenta la tolerancia a la sal al acumular flavonoides antioxidantes en *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2021), o la glicosiltransferasa QUA1, que regula la señalización de Ca²⁺ asociada a cloroplastos durante el estrés por salinidad o por sequía en *Arabidopsis* (Zheng *et al.*, 2017).

En cuanto a la expresión de este gen en las variedades de lenteja utilizadas en el estudio y como se puede observar en la **Figura 10**:

- *Lens culinaris* (cultivar Alpo) Tratamiento: Su expresión aumentó significativamente con un RQ de 1,385. Es decir, este gen se expresó 1,385 veces más.
- *Lens odemensis* Control: Su expresión es similar a la de Alpo control y similar a la detectada en el cultivar cuando se somete a estrés salino (este gen se expresó 1,802 veces más).
- *Lens odemensis* Tratamiento: Su expresión aumentó significativamente con un valor de RQ de 18,403. Es decir, este gen se expresó 18,403 veces más.

En el estudio de Singh *et al.* (2021) este gen se encontraba regulado negativamente en el genotipo sensible, lo cual nos lleva a pensar que los cambios en la expresión de este gen pueden estar relacionados con el nivel de tolerancia a la salinidad en lenteja. Este gen es el que mayor cambio de expresión ha mostrado de todos los analizados en este trabajo.

- **Lc28819**: el cual codifica para una proteína similar al factor de transcripción NAC (NAM,

ATAF1-2 Y CUC), una superfamilia de factores de transcripción compleja específica de plantas. Se ha descubierto que la familia NAC está involucrada en varios procesos como la formación del meristemo apical del tallo, el desarrollo de las flores, la división celular, la senescencia foliar, la formación de paredes secundarias y la respuesta a estreses bióticos y abióticos. La función del dominio NAC se ha asociado con la localización nuclear, la unión al DNA y la formación de homodímeros o heterodímeros con otras proteínas que contienen este dominio. Sin embargo, la región C-terminal funciona como una región reguladora de la transcripción, actuando como un activador o represor de esta. Los factores de transcripción NAC juegan un papel vital en las redes de señalización durante las respuestas al estrés en plantas. La regulación precisa de los genes NAC durante las respuestas a estrés abiótico en las plantas contribuyen al establecimiento de redes de señalización complejas, y el papel de los genes *NAC* en dichas respuestas los convierte en candidatos prometedores para la generación de plantas transgénicas tolerantes al estrés (Shao *et al.*, 2015). Por lo tanto, el aumento de expresión en cultivares tolerantes pudiera reflejar el establecimiento de protección adicional para sus células, así como rigidez y fuerza a toda la planta para resistir las condiciones de estrés por salinidad y este comportamiento fue el observado en el estudio de Singh *et al.* (2021).

En cuanto a la expresión de este gen en las variedades de lenteja utilizadas en el estudio y como se puede observar en la **Figura 10**:

- *Lens culinaris* (cultivar Alpo) Tratamiento: Su expresión no cambió significativamente.
- *Lens odemensis* Control: Su expresión se mostró similar a la de Alpo control.
- *Lens odemensis* Tratamiento: Su expresión aumentó significativamente con un valor de RQ de 4,140. Es decir, este gen se expresó 4,140 veces más.

Los resultados obtenidos en este estudio respecto a este gen son similares a lo observado en la bibliografía e indicarían una mayor tolerancia al estrés del genotipo silvestre.

Finalmente, hubo dos genes en los que no se analizó la expresión, debido a que las amplificaciones no fueron específicas, ya que las curvas de desnaturalización mostraron varios picos. Estos fueron los siguientes:

- **Lc06915**: codifica para una polifenol oxidasa (PPO), una enzima que contiene cobre ampliamente distribuida en las plantas. Esta enzima es la responsable de la reacción de pardeamiento en frutas y verduras. Su actividad se da en presencia de oxígeno molecular, y se produce en dos reacciones distintas. La primera actividad, monofenolasa o cresolasa, cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles. La segunda actividad de la PPO, difenolasa o

catecolasa, consiste en la oxidación de los o-difenoles a las o-quinonas correspondientes, que son moléculas altamente reactivas (Can *et al.*, 2014). Esta enzima mostró una mayor concentración bajo estrés por salinidad en rábano (*Raphanus sativus L.*) y judía (*Phaseolus vulgaris*), mostrando la misma tendencia en el estudio de Singh *et al.* (2021).

- **Lc16074**: este gen codifica para un transportador de la familia de la proteína intrínseca principal (MIP) putativo (Singh *et al.*, 2021). Las MIP juegan un papel importante en muchos organismos, ya que forman canales transmembrana que facilitan el transporte de distintos solutos a través de la membrana. La mayoría de las MIP de plantas tienen capacidad de transporte de agua y, por lo tanto, se denominan comúnmente acuaporinas. A nivel transcripcional, varios informes demostraron la capacidad de respuesta de las MIP de las plantas a la sequía, la baja temperatura, la alta salinidad, la luz o los estímulos hormonales. De esta forma, genes de acuaporinas que están regulados al alza o a la baja por la sequía y el estrés salino se han identificado en varias especies. La supresión de MIP puede interpretarse como una medida para reducir la pérdida de agua en las células, reducir la absorción de agua por las células y/o disminuir los flujos de agua a través de los tejidos. Se ha demostrado que el ABA puede regular la expresión de MIPs y que estabiliza las acuaporinas durante altas tasas de flujo de agua a través de los poros, aumentando la conductividad (Deshmukh *et al.*, 2013). Este gen se encuentra entre los genes regulados a la baja en el estudio de Singh *et al.* (2021).

Las posibles razones por las que estos dos últimos genes fallaron en la amplificación en nuestras muestras mientras que en las de Singh *et al.* (2021) funcionaron correctamente pueden ser que los *primers* se hubieran degradado; que presentaran fallos en el diseño o síntesis de forma que no reconocieran su sitio de hibridación con el DNA o a causa de errores experimentales.

4. CONCLUSIONES

En este estudio, se buscaba validar los datos que Singh *et al.* (2021) encontraron con ciertos genes relacionados con la respuesta al estrés salino en un genotipo de lenteja tolerante y en otro sensible. En concreto se trataba de comprobar si los cambios de expresión podrían servir como indicadores del grado de tolerancia frente a este estrés, ya que algunos de los genes mostraban una regulación diferente según fuera la planta. Sin embargo, se ha observado que estos cambios no son trasladables al resto de los genotipos, dependiendo la respuesta frente a la salinidad de cada genotipo en particular. El genotipo que presentó una mayor tolerancia al estrés en este trabajo fue *L. odemensis*, presentando también mayores cambios en la expresión génica y mayor

tasa de germinación bajo efecto salino que el susceptible *L. culinaris* (Alpo). Esto podría estar relacionado con la naturaleza silvestre de *L. odemensis*.

Por otro lado, se ha podido comprobar como la simulación del estrés salino a partir de NaCl da buenos resultados, permitiendo diferenciar distintos grados de sensibilidad y siendo, además, un método sencillo de aplicar, que puede utilizarse para una primera aproximación a la valoración de la tolerancia, especialmente en los programas de mejora genética en los que es necesario evaluar numerosos genotipos.

Finalmente, cabe destacar la importancia de ampliar la investigación sobre las respuestas a la salinidad en leguminosas y otras plantas para aumentar el conocimiento sobre los genes inducidos por este estrés, las vías de señalización implicadas o la expresión génica en los distintos estadios de desarrollo, lo cual ayudará en la obtención de nuevas variantes tolerantes a la salinidad que contribuyan en la lucha frente a uno de los grandes problemas que afectan a los cultivos hoy en día.

5. REFERENCIAS

- Abdul Qados, A. M. S. (2011) "Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.)", *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1), pp. 7–15. doi:10.1016/j.jssas.2010.06.002.
- Aswath, C. R., Kim, S. H., Mo, S. Y. y Kim, D. H. (2005) "Transgenic plants of creeping bent grass harboring the stress inducible gene, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, are highly tolerant to drought and NaCl stress", *Plant Growth Regulation*, 47(2–3), pp. 129–139. doi:10.1007/s10725-005-3380-6.
- Buels, R., Yao, E., Diesh, C. M., Hayes, R. D., Munoz-Torres, M., Helt, G., Goodstein, D. M., Elsik, C. G., Lewis, S. E., Stein, L. y Holmes, I. H. (2016) "JBrowse: A dynamic web platform for genome visualization and analysis", *Genome Biology*, 17(1), pp. 1–12. doi:10.1186/s13059-016-0924-1.
- Can, Z., Dincer, B., Sahin, H., Baltas, N., Yildiz, O. y Kolayli, S. (2014) "Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis* L.) from Turkey", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(6), pp. 829–835. doi:10.3109/14756366.2013.858144.
- Carillo, P., Grazia, M., Pontecorvo, G., Fuggi, A. y Woodrow, P. (2011) "Salinity Stress and Salt Tolerance", en Shanker, A. (ed.) *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. 1ª ed. Italy: InTech, pp. 21-38. doi:10.5772/22331.
- Chakraborty, K., Sairam, R. K. y Bhattacharya, R. C. (2012) "Differential expression of salt overly sensitive pathway genes determines salinity stress tolerance in *Brassica* genotypes", *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, pp. 90–101. doi:10.1016/j.plaphy.2011.10.001.
- Chang, S., Puryear, J. y Cairney, J. (1993) "A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees", *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), pp. 113–116. doi:10.1007/BF02670468.
- Deshmukh, R. K., Vivancos, J., Guérin, V., Sonah, H., Labbé, C., Belzile, F. y Bélanger, R. R. (2013) "Identification and functional characterization of silicon transporters in soybean using comparative genomics of major intrinsic proteins in *Arabidopsis* and rice", *Plant Molecular Biology*, 83(4–5), pp. 303–315. doi:10.1007/s11103-013-0087-3.
- Dissanayake, R., Cogan, N. O. I., Smith, K. F. y Kaur, S. (2021) "Application of genomics to understand salt tolerance in lentil", *Genes*, 12(3), pp. 1–18. doi:10.3390/genes12030332.

- Dissanayake, R., Kahrood, H. V., Dimech, A. M., Noy, D. M., Rosewarne, G. M., Smith, K. F., Cogan, N. O. I. y Kaur, S. (2020) "Development and application of image-based high-throughput phenotyping methodology for salt tolerance in lentils", *Agronomy*, 10(12), p. 1992. doi:10.3390/agronomy10121992.
- Elisaveta, K. y Konstantina, K. (2021) "Physiological effects of salinity on nitrogen fixation in legumes -a review", *Journal of Plant Nutrition*, pp. 1–10. doi:10.1080/01904167.2021.1921204.
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, Najeeb, Faiq, M., Khan, M. R., Tareen, A. K., Khan, A., Ullah, A., Ullah, Nasr y Huang, J. (2015) "Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review", *Plant Growth Regulation*, 75(2), pp. 391–404. doi:10.1007/s10725-014-0013-y.
- Farooq, M., Gogoi, N., Hussain, M., Barthakur, S., Paul, S., Bharadwaj, N., Migdadi, H. M., Alghamdi, S. S. y Siddique, K. H. M. (2017) "Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes", *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, pp. 199–217. doi:10.1016/j.plaphy.2017.06.020.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. y Sharkey, T. D. (2004) "Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants", *Plant Biology*, 6(3), pp. 269–279. doi:10.1055/s-2004-820867.
- Foti, C., Khah, E. M. y Pavli, O. I. (2019) "Germination profiling of lentil genotypes subjected to salinity stress", *Plant Biology*, 21(3), pp. 480–486. doi:10.1111/plb.12714.
- Foti, C., Khah, E. M. y Pavli, O. I. (2019) "Response of Lentil Genotypes Under PEG-induced Drought Stress: Effect on Germination and Growth", *Plant*, 6(4), pp. 75-83. doi:10.11648/j.plant.20180604.12.
- Garg, N. y Noor, Z. (2009) "Genotypic differences in plant growth, osmotic and antioxidative defence of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. modulated by salt stress", *Archives of Agronomy and Soil Science*, 55(1), pp. 3–33. doi:10.1080/03650340802393303.
- Gholipoor, M., Ghasemi-Golezani, K., Khoorie, F. R. y Moghaddam, M. (2000) "Effects of salinity on initial seedling growth of chickpea (*Cicer Arietinum* L.)", *Acta Agronomica Hungarica*, 48(4), pp. 337–343. doi:10.1556/AAgr.48.2000.4.3.
- Gupta, B. y Huang, B. (2014) "Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization", *International Journal of Genomics*. doi:10.1155/2014/701596.
- Gupta, D., Dadu, R. H. R., Sambasivam, P., Bar, I., Singh, M., Beera, N. y Biju, S. (2019) "Toward Climate-Resilient Lentils: Challenges and Opportunities", en Kole, C. (ed.) *Genomic Designing of Climate-Smart Pulse Crops*. 1ª ed. Switzerland: Springer, pp. 165–234.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. y Bohnert, H. J. (2000) "Plant cellular and molecular responses to high salinity", *Annual Review of Plant Biology*, 51, pp. 463–499. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.463.
- Huertas, R., Olías, R., Eljakaoui, Z., Javier Gálvez, F., Alvarez Morales, P. DE, Belver, A. y Pilar Rodríguez-rosales, M. (2012) "Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato", *Plant, Cell and Environment*, 35, pp. 1467-1482. doi:10.1111/j.1365-3040.2012.02504.x.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C. S., Shi, W. y Zhu, J. K. (2000) "SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding", *Plant Cell*, 12(9), pp. 1667–1677. doi:10.1105/tpc.12.9.1667.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A. y Li, X. (2013) "The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles", *Molecular Plant*, 6(2), pp. 275–286. doi:10.1093/mp/ss017.
- Keegstra, K. y Raikhel, N. (2001) "Plant glycosyltransferases", *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), pp. 219–224. doi:10.1016/S1369-5266(00)00164-3.
- L'taief, B., Sifi, B., Zaman-Allah, M., Drevon, J. J. y Lachaâl, M. (2007) "Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium ciceri* symbiosis", *Journal of Plant Physiology*, 164(8), pp. 1028–1036. doi:10.1016/j.jplph.2006.05.016.

- Li, W. Y. F., Wong, F. L., Tsai, S. N., Phang, T. H., Shao, G. y Lam, H. M. (2006) "Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells", *Plant, Cell and Environment*, 29(6), pp. 1122–1137. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01487.x.
- Li, Y., Liu, F., Li, P., Wang, T., Zheng, C. y Hou, B. (2020) "An *Arabidopsis* cytokinin-modifying glycosyltransferase UGT76C2 improves drought and salt tolerance in rice", *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.560696.
- Lim, E. K., Jackson, R. G. y Bowles, D. J. (2005) "Identification and characterisation of *Arabidopsis* glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde", *FEBS Letters*, 579(13), pp. 2802–2806. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.016.
- Loutre, C., Dixon, D. P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D. J. y Edwards, R. (2003) "Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline", *Plant Journal*, 34(4), pp. 485–493. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01742.x.
- Lowry, R. (2021) *VassarStats: Website for Statistical Computation*. Disponible en: <http://vassarstats.net/> (Accedido: 3 de junio de 2021).
- Mishra, S., Panda, S. K. y Sahoo, L. (2014) "Transgenic asiatic grain legumes for salt tolerance and functional genomics", *Reviews in Agricultural Science*, 2(0), pp. 21–36. doi:10.7831/ras.2.21.
- Munns, R. (1993) "Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses", *Plant, Cell & Environment*, 16(1), pp. 15–24. doi:10.1111/j.1365-3040.1993.tb00840.x.
- Nadeem, M., Li, J., Yahya, M., Wang, M., Ali, A., Cheng, A., Wang, X. y Ma, C. (2019) "Grain legumes and fear of salt stress: Focus on mechanisms and management strategies", *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), p. 799. doi:10.3390/ijms20040799.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) "NAC transcription factors in plant abiotic stress responses", *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, pp. 97–103. doi:10.1016/j.bbagr.2011.10.005.
- Polanco, C., Sáenz de Miera, L. E., González, A. I., García, P., Fratini, R., Vaquero, F., Javier Vences, F. y De La Vega, M. P. (2019) "Construction of a high-density interspecific (*Lens culinaris* x *L. odemensis*) genetic map based on functional markers for mapping morphological and agronomical traits, and QTLs affecting resistance to *Ascochyta* in lentil", *PLoS ONE*, 14(3), p. e0214409. doi:10.1371/journal.pone.0214409.
- Qin, X. y Zeevaart, J. A. D. (1999) "The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), pp. 15354–15361. doi:10.1073/pnas.96.26.15354.
- Qurashi, A. W. y Sabri, A. N. (2013) "Osmolyte accumulation in moderately halophilic bacteria improves salt tolerance of chickpea", *Pakistan Journal of Botany*, 45(3), pp. 1011-1016.
- Rolly, N. K., Imran, Q. M., Lee, I. J. y Yun, B. W. (2020) "Salinity stress-mediated suppression of expression of salt overly sensitive signaling pathway genes suggests negative regulation by AtbZIP62 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), p. 1726. doi:10.3390/ijms21051726.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den hoff, M. J. B. y Moorman, A. F. M. (2009) "Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data", *Nucleic Acids Research*, 37(6), pp. 1-12. doi:10.1093/nar/gkp045.
- 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", *Frontiers in Plant Science*, 10. doi:10.3389/fpls.2019.00965.
- Shabala, S. y Cuin, T. A. (2008) "Potassium transport and plant salt tolerance", in *Physiologia Plantarum*, 133(4), pp. 651–669. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.01008.x.

- Shao, H., Wang, H. y Tang, X. (2015) "NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: Progress and prospects", *Frontiers in Plant Science*, 6(october), pp. 1–8. doi:10.3389/fpls.2015.00902.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. y Zhu, J. K. (2002) "The putative plasma membrane NA⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance NA⁺ transport in plants", *Plant Cell*. Oxford University Press, 14(2), pp. 465–477. doi:10.1105/tpc.010371.
- Singh, D., Singh, C. K., Kumari, S., Tomar, R. S. S., Karwa, S., Singh, R., Singh, R. B., Sarkar, S. K. y Pal, M. (2017) "Discerning morpho-anatomical, physiological and molecular multiformity in cultivated and wild genotypes of lentil with reconciliation to salinity stress", *PLoS ONE*, 12(5), p. e0177465 doi:10.1371/journal.pone.0177465.
- Singh, Dharmendra, Singh, C. K., Taunk, J., Sharma, S., Gaikwad, K., Singh, V., Sanwal, S. K., Singh, Deepti, Sharma, P. y Pal, M. (2021) "Transcriptome skimming of lentil (*Lens culinaris* Medikus) cultivars with contrast reaction to salt stress", *Functional and Integrative Genomics*, 21(1), pp. 139–156. doi:10.1007/s10142-020-00766-5.
- Sinha, R., Sharma, T. R. y Singh, A. K. (2019) "Validation of reference genes for qRT-PCR data normalisation in lentil (*Lens culinaris*) under leaf developmental stages and abiotic stresses", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(1), pp. 123–134. doi:10.1007/s12298-018-0609-1.
- Sun, Y. G., Wang, B., Jin, S. H., Qu, X. X., Li, Y. J. y Hou, B. K. (2013) "Ectopic expression of *Arabidopsis* glycosyltransferase UGT85A5 enhances salt stress tolerance in tobacco", *PLoS ONE*, 8(3), p. 59924. doi:10.1371/journal.pone.0059924.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. y Leunissen, J. A. M. (2007) "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3", *Nucleic Acids Research*, 35(suppl.2), pp. 71-74. doi:10.1093/nar/gkm306.
- Wang, J. y Hou, B. (2009) "Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites", *Frontiers of Biology in China*, 4(1), pp. 39-46. doi:10.1007/s11515-008-0111-1.
- Xie, Z., Nolan, T. M., Jiang, H. y Yin, Y. (2019) "AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis*", *Frontiers in Plant Science*, 10, p. 228. doi:10.3389/fpls.2019.00228.
- Ye, J., Zhang, W. y Guo, Y. (2013) "*Arabidopsis* SOS3 plays an important role in salt tolerance by mediating calcium-dependent microfilament reorganization", *Plant Cell Reports*, 32(1), pp. 139–148. doi:10.1007/s00299-012-1348-3.
- Van Zelm, E., Zhang, Y. y Testerink, C. (2020) "Salt tolerance mechanisms of plants", *Annual Review of Plant Biology*, 71, pp. 403–433. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100005.
- Zhang, K., Sun, Y., Li, M. y Long, R. (2021) "CrUGT87A1, a UDP-sugar glycosyltransferases (UGTs) gene from *Carex rigescens*, increases salt tolerance by accumulating flavonoids for antioxidation in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, pp. 28–36. doi:10.1016/j.plaphy.2020.12.006.
- Zheng, Y., Liao, C., Zhao, S., Wang, C. y Guo, Y. (2017) "The glycosyltransferase QUA1 regulates chloroplast-associated calcium signaling during salt and drought stress in *Arabidopsis*", *Plant and Cell Physiology*, 58(2), pp. 329–341. doi:10.1093/pcp/pcw192.
- Zou, M., Guan, Y., Ren, H., Zhang, F. y Chen, F. (2008) "A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance", *Plant Molecular Biology*, 66(6), pp. 675–683. doi:10.1007/s11103-008-9298-4.

ANEXO

Tabla 1 Anexo. - Resultados de la germinación de las semillas de *L. culinaris* (Alpo) tras 14 días de siembra bajo los distintos tratamientos, y de los análisis estadísticos realizados.

		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Test exacto de Fisher (p)	Porcentaje de Germinación (%)	Intervalo de confianza (95 %) (%)
Control	Germinadas	11	11	10	1,0	96,97	82,49 - 99,84
Control	No germinadas	0	0	1			
30 mM	Germinadas	11	11	11	1,0	100	87,02 - 100
30 mM	No germinadas	0	0	0			
60 mM	Germinadas	7	5	5	0,746	51,52	35,22 - 67,50
60 mM	No germinadas	4	6	6			
120 mM	Germinadas	0	1	1	1,0	6,06	1,68 – 19,61
120 mM	No germinadas	11	10	10			

Tabla 2 Anexo. - Resultados de la germinación de las semillas de *L. odemensis* tras 14 días de siembra bajo los distintos tratamientos, y de los análisis estadísticos realizados.

		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Test exacto de Fisher (p)	Porcentaje de Germinación (%)	Intervalo de confianza (95 %) (%)
Control	Germinadas	11	11	10	1,0	96,97	82,49 - 99,84
Control	No germinadas	0	0	1			
30 mM	Germinadas	8	9	10	0,850	81,82	63,92 - 92,38
30 mM	No germinadas	3	2	1			
60 mM	Germinadas	9	8	8	1,0	75,76	57,37 - 88,26
60 mM	No germinadas	2	3	3			
120 mM	Germinadas	4	3	3	1,0	30,30	16,21 - 48,87
120 mM	No germinadas	7	8	8			

Tabla 3 Anexo. - Resultados del análisis post-hoc de Scheffé en el que se comparan 2 a 2 los distintos grupos de tratamientos. Las abreviaturas indican: A (*L. culinaris* Alpo); O (*L. odemensis*); C (control); 30, 60 y 120 (Concentraciones (mM) de NaCl). En rojo se han remarcado aquellos grupos entre los que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

	A30	A60	A120	OC	O30	O60	O120
AC	0,993	0,001	<0,001	1,000	0,247	0,081	<0,001
A30	x	<0,001	<0,001	0,993	0,060	0,017	<0,001
A60		x	0,004	<0,001	0,224	0,538	0,712
A120			x	<0,001	<0,001	<0,001	0,131
OC				x	0,247	0,082	<0,001
O30					x	0,998	0,008
O60						x	0,031

Tabla 4 Anexo. - Secuencia, eficiencia de amplificación y desviación estándar para cada par de *primers* utilizado en el análisis por qPCR. Los valores de eficiencia media se encuentran entre 1,000 y 2,000, siendo 1,000 un 0 % de eficiencia y 2,000 un 100 %.

Gen	Primers 5'-3'	Eficiencia media	Desviación estándar
<i>β-tubulina</i>	F: CAATGCCACACTTTCTGTGC R: AGAAAGCCTTACGCCTGAAC	1,827	0,012
<i>RPL2</i>	F: ATTGAGCTGAACCCAGGACAA R: GACGTGGGCTCCTTCAAGATC	1,932	0,021
<i>Lc18674</i>	F: CAAATCCGATCCTTCAATGG R: CTGGGGAAGCAATAGTTTGG	1,939	0,029
<i>Lc06915</i>	F: GGATTCATCACCGGCTTGGT R: TCATCAACCTCCAACACCCA	1,523	0,013
<i>Lc16074</i>	F: TCCTCAATGCAACCAACCAT R: CCCAAGTAAATGGGCTACCA	1,771	0,023
<i>Lc07532</i>	F: ACCTTCTACAACAAGCGGCA R: GGACACGTGGGTCTGAAGTT	1,963	0,024
<i>Lc10899</i>	F: TCTGCTTGTGGACTGTTGGG R: GTCCAAGGATCCATCGGTGA	1,934	0,024
<i>Lc28819</i>	F: CGGAAGCCAAACACATGGGA R: GAACCTTCTTCCGTGGGG	1,903	0,016

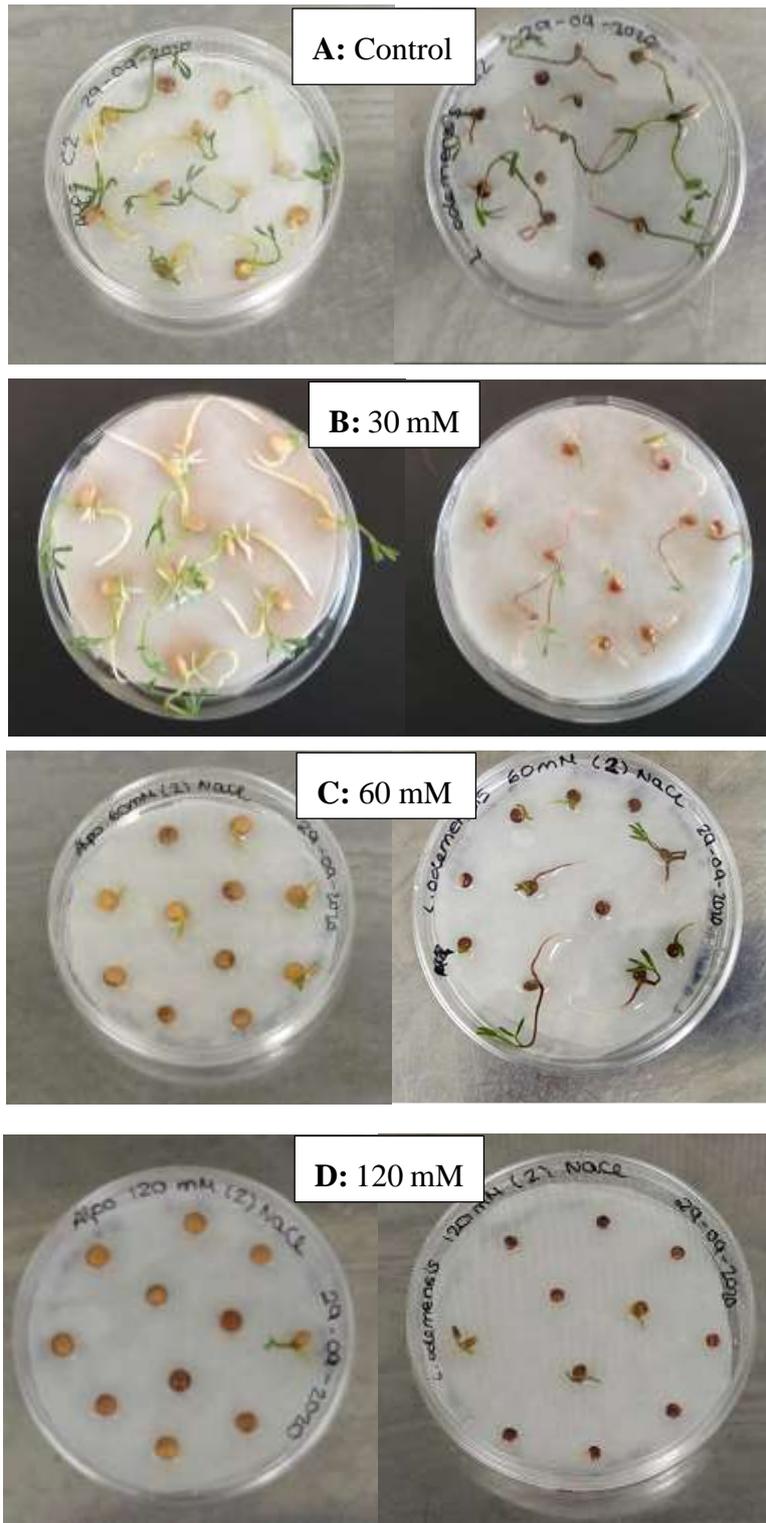


Figura 1 Anexo. - Semillas a los 14 días de germinación en los grupos Control (A), 30 mM NaCl (B), 60 mM de NaCl (C) y 120 mM de NaCl (D) en *L. culinaris* (Alpo) (izquierda) y *L. odemensis* (derecha) para la réplica número 2, donde se puede ver que los tratamientos 60 y 120 mM de NaCl eran demasiado agresivos, ya que, a pesar de haber algunas semillas germinadas, en la mayoría la longitud de la parte aérea es insuficiente como para poder realizar los estudios posteriores. Sin embargo, con el tratamiento 30 mM de NaCl se obtuvieron varias semillas germinadas cuyas partes aéreas eran suficientemente grandes en ambas especies de lenteja.