



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

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

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

Adrián Fernández Trapote
GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2021

En León, a 2 de Julio de 2021.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIAL Y MÉTODOS	9
2.1. Material biológico	9
2.2. Determinación de concentraciones óptimas de polietilenglicol	9
2.3. Siembra de semillas de Lupa	9
2.4. Extracción de RNA	10
2.5. Conversión a cDNA	11
2.6. PCR cuantitativa (qPCR)	11
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1. Germinación de <i>L.culinaris</i>. Análisis estadístico	14
3.2. Extracción de RNA. Detección de RNA extraído	16
3.3. Análisis de la expresión génica (qPCR)	17
4. CONCLUSIONES	23
5. REFERENCIAS	25

RESUMEN

La sequía es uno de los principales factores de estrés abiótico que afecta al crecimiento de las plantas y a su productividad, incluyendo las lentejas. Además, teniendo en cuenta el cambio climático y el calentamiento global, se prevé que las zonas con sequía aumenten, así como la intensidad de la misma. A pesar de que los mecanismos generales de resistencia frente a este estrés están siendo estudiados en profundidad, en cultivos como la lenteja apenas hay información. Este trabajo tiene como objetivo estudio de genes implicados en la resistencia a la sequía. Para ello se simularon las condiciones de estrés empleando polietilenglicol (PEG). Posteriormente se emplearon técnicas de análisis del transcriptoma, como reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) en lentejas tratadas con distintas concentraciones de PEG. Los resultados obtenidos permitieron comprobar las ventajas del uso de PEG y las diferentes respuestas entre tratamientos. Los cambios de expresión observados dependen del tejido utilizado lo que sugiere que la tolerancia puede estar determinada por una temprana y correcta detección del estrés desencadenante de los mecanismos necesarios para superarlo.

ABSTRACT

Drought is one of the main factors of abiotic stress which affects the plant growth and their productivity, including lentils. In addition, considering climate change and global warming, the areas with drought are expected to increase, as well as it's intensity. Although the general mechanisms of resistance to this stress are being studied in depth, there is hardly any information in crops such as lentils. The aim of this work is to study genes involved in drought resistance. In order to do so, stress conditions were simulated using polyethyleneglycol (PEG). Subsequently, transcriptome analysis techniques were used, such as quantitative polymerase chain (qPCR) reactions in lentils treated with different concentrations of PEG. The results obtained allowed us to verify the advantages of the use of PEG and the different responses between treatments.

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Lens culinaris* ($2n = 14$), cultivo autógamo cuyo genoma posee un tamaño aproximado de 4 Gbp (Polanco *et al.*, 2018), pertenece a la familia Fabaceae, la tercera familia más grande dentro del reino Plantae, teniendo dos docenas de especies cultivables que son esenciales para la alimentación a nivel global, ya que son una fuente rica en carbohidratos, proteínas y minerales como el hierro y el zinc. Además de esto destaca también su capacidad para fijar nitrógeno al suelo, actividad que la vuelve una planta con un papel vital en la agricultura (Bauchet *et al.*, 2019).

La lenteja tradicionalmente ha sido cultivada en regiones semiáridas, bajo condiciones de secano, por ello es considerada medianamente resistente a este estrés (Reda, 2015).

Hoy en día, el cultivo de lenteja se extiende por todo el Este Asiático, Norte de África, India, América del Norte y Australia, siendo Canadá el líder tanto en producción como en exportación (Pérez de la Vega, 2011). Solo en 2017, a nivel global, se produjeron aproximadamente 6.1 millones de toneladas de lenteja, de las cuales Canadá produjo 2.5 millones. A nivel nacional, en España se produjeron 24.000 toneladas, abarcando casi un tercio de la producción europea en ese mismo año (FAOSTAT, 2020)

La siembra de lentejas en España se concentra en su mayoría en las comunidades de Castilla y León y Castilla la Mancha, aunque pueden aparecer cultivos en otras zonas pero no tan importantes como los de estas comunidades (Soria, 1995). Como observamos en el mapa (Figura 1) las zonas de cultivo de lenteja se encuentran en zonas semiáridas (Salas, 2000), lo que nos da a entender que es un cultivo moderadamente resistente a la sequía.

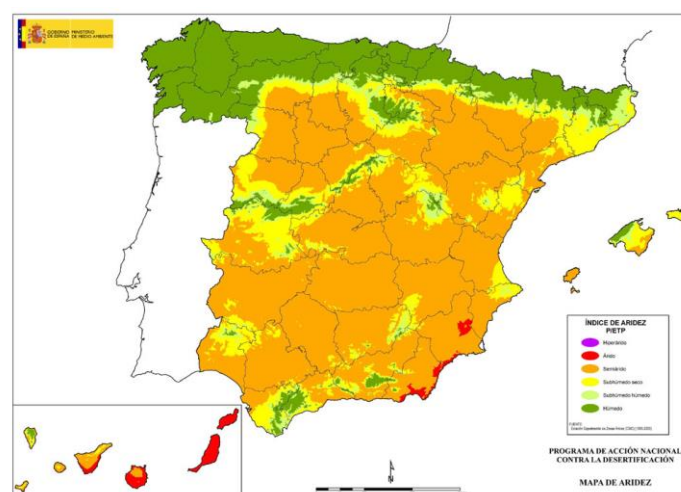


Figura 1: mapa de zonas áridas en España. La aridez es más acusada en las zonas rojas y va disminuyendo hacia las zonas verdes. (MITECO)

La lenteja es un cultivo moderadamente resistente a la sequía, pero su rendimiento se reduce bruscamente al intensificarse la situación de estrés, pudiendo alcanzarse hasta una disminución del 54 % (Singh *et al.*, 2017). Debido a la importancia de la disponibilidad de agua para el crecimiento y la productividad de los cultivos, el estrés por sequía supone una amenaza para la seguridad alimentaria mundial (Nadeem *et al.*, 2019). Este tipo de estrés es la causa más común de la escasez severa de alimentos, principalmente en países en desarrollo y puede llegar a suponer un desencadenante natural de hambrunas (Sehgal *et al.*, 2017).

Los factores de estrés ambiental como el calor, la sequía o la salinidad afectan a prácticamente toda la totalidad del ciclo de vida de la planta, desde su germinación hasta la etapa de madurez. La sensibilidad de las plantas a la sequía es un fenómeno complejo que depende de numerosos factores, como la etapa de crecimiento de la planta, el potencial genético, la duración y la gravedad del estrés (Sinha *et al.*, 2018). Una exposición prolongada al estrés por sequía induce una serie de cambios tanto a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico en las plantas. La sequía induce algunos efectos fatales en las plantas, como alterar la tasa de asimilación del carbono, la disminución de la turgencia, el aumento del daño oxidativo y los cambios en el intercambio de gases de las hojas, todo lo cual conduce a una reducción en el rendimiento. Además se ha comprobado que otros tipos de respuestas afectan a las plantas negativamente si estas son sometidas a sequía durante un periodo de tiempo prolongado, como el estrés oxidativo o el estrés osmótico (Huang *et al.* 2012). Esto conlleva un efecto sobre el tiempo de floración de la planta y sobre los órganos reproductores, provocando la esterilidad del grano de polen y una reducción en el número de vainas. El estrés por sequía induce una serie de respuestas bioquímicas y fisiológicas (como las que se pueden observar en la Figura 2) controladas por una serie de genes a nivel molecular, celular y de toda la planta que ayuda a mantener el control homeostático y así proteger a la planta del marchitamiento y la muerte celular (Singh *et al.*, 2016). Esto se logra manteniendo el equilibrio osmótico dentro de la célula, restaurando el metabolismo primario y secundario y restaurando la estructura terciaria de las proteínas. La mayoría de los mecanismos de respuesta al estrés por sequía de las plantas se han relacionado con la acumulación de metabolitos como la prolina, glicina betaína, carbohidratos solubles, antioxidantes, etc. (Singh *et al.*, 2017)

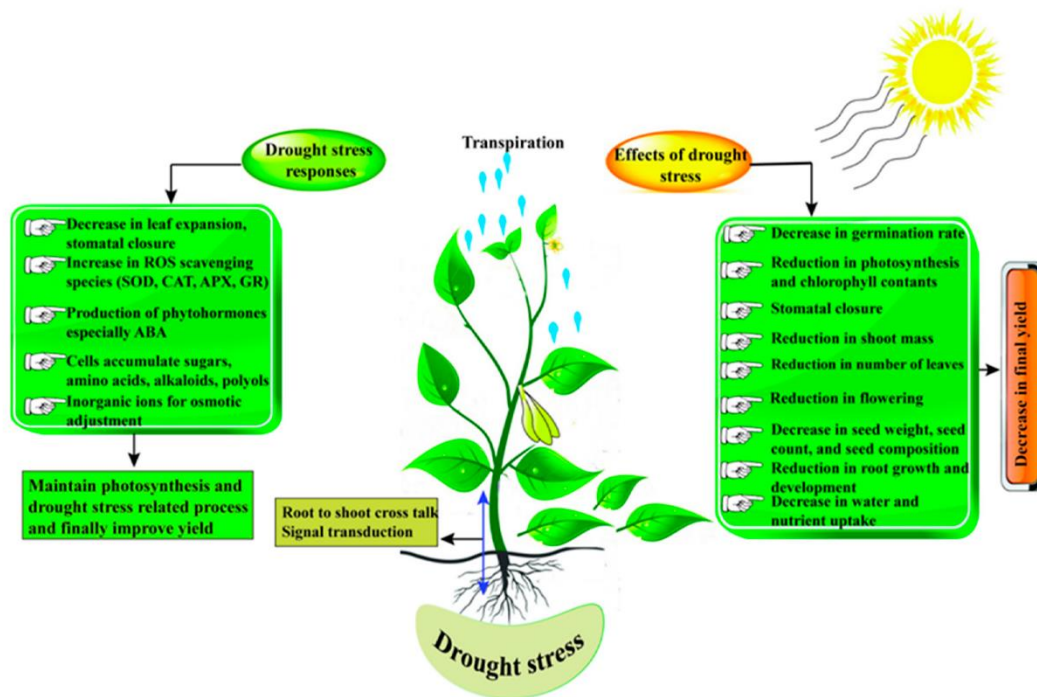


Figura 2: efecto del estrés por sequía en plantas y sus posibles respuestas (Nadeem *et al.*, 2019)

La fotosíntesis es un proceso fundamental para las plantas, ya que es el responsable de su crecimiento y desarrollo. El estrés por sequía afectará a la fijación de carbono al alterar la actividad enzimática de distintas enzimas responsables de este proceso (como la rubisco, por ejemplo). Otro de los factores fisiológicos que se ve alterado al someter a la planta a estrés hídrico es el control de los estomas para optimizar el uso del agua, evitando pérdidas de agua excesiva durante periodos de sequía prolongada. Al someter a distintas leguminosas a estrés hídrico varios estudios (Miyashita *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015) concluyeron que la conductancia estomática disminuye a medida que se prolonga el estrés.

A lo largo de la evolución las plantas han adquirido distintos mecanismos de tolerancia a la sequía, adaptaciones tales como el escape y la evitación, la acumulación de solutos, la regulación de antioxidantes y la regulación hormonal. El escape de la sequía es una de las muchas estrategias empleadas por las plantas en condiciones en las cuales es probable que se produzca una limitación de agua al final de la temporada de crecimiento, y asegurar que las plantas puedan completar su ciclo vital de la manera más rápida posible mientras tengan condiciones favorables para ello. Por el contrario, la evitación de la sequía se puede definir como un mecanismo de crecimiento lento asociado a estomas pequeños o cerrados con niveles de fotosíntesis reducidos y un bajo metabolismo celular, con lo que se busca minimizar las pérdidas de agua y preparar a las plantas para la sequía venidera (Shavrukov *et al.*, 2017). En cuanto a la acumulación de solutos compatibles, se trata de una estrategia fundamental para la

osmoprotección de la planta y su ajuste osmótico en condiciones de estrés hídrico. Este mecanismo de tolerancia de osmoprotección se basa en la asociación de elementos no tóxicos con numerosos componentes celulares, mientras que la regulación osmótica mantiene la turgencia de las celular al mantener el agua en el interior de estas. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se postula como la respuesta inicial de las plantas al estrés por sequía y actúa como mensajero para activar los mecanismos de defensa de la planta. Las ROS pueden actuar como compuestos de señalización a bajas concentraciones y a la vez desencadenan diversas respuestas en condiciones de sequía. Cuando la concentración de ROS se excede, estos provocan un estrés oxidativo a la planta, lo que conduce a la alteración de las propiedades intrínsecas de las biomoléculas y a la muerte celular. Para hacer frente a la acumulación de ROS las plantas mantienen una mayor cantidad de moléculas antioxidantes como respuesta al estrés por sequía. Por último, la regulación hormonal, actúa mediante las fitohormonas (giberelinas, citoquinas, auxinas, ácido abscísico y etileno entre otras), regulando y controlando todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Lamaoui *et al.*, 2018). Estas fitohormonas controlan diversos procesos durante la respuesta de la planta a la sequía al inducir cambios morfológicos como puede ser la apertura o el cierre de los estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración.

Los mecanismos de tolerancia frente a la sequía en las plantas son muy complejos y variables (Choukri *et al.*, 2020). Se ha comprobado y documentado varias clases importantes de genes cuya expresión se altera bajo estrés por sequía, entre ellos los más destacables son los implicados en el metabolismo celular, como la desintoxicación celular, los genes de la familia de las aldehído deshidrogenasas, genes implicados en el transporte celular y en la transducción de señales, genes que codifican factores de transcripción que están implicados en la regulación transcripcional, etc.

La tolerancia a los diferentes estreses abióticos está gobernada por numerosos genes o QTLs (quantitative trait loci), cada uno de los cuales por lo general contribuye de forma pequeña a la expresión de tolerancia, además de depender de interacciones con otros genes y del ambiente. La respuesta de las leguminosas a la sequía se ha estudiado utilizando tanto enfoques de mapeo de QTLs como con análisis transcriptómicos de alto rendimiento, y a través de marcadores moleculares de diferentes tipos (Nadeem *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020).

En el caso de la lenteja, se han desarrollado multitud de variedades mejoradas respecto a la germinación, al crecimiento de las plántulas, al rendimiento, la resistencia a enfermedades y otras características, sin embargo, es una tarea más complicada la de seleccionar la variedad

adecuada que permita un rendimiento constante en condiciones de sequía. Esto se debe a la complejidad de este carácter, lo que ha sido puesto de manifiesto en el trabajo de Idrissi *et al.* (2016). En este estudio se identificaron hasta 18 QTLs relacionados con la tolerancia a este estrés, la mayoría de ellos con un efecto pequeño sobre el fenotipo final, si bien uno fue capaz de explicar casi el 30 % de la variación, lo que le hace un objetivo interesante en los programas de mejora.

La información sobre cambios transcriptómicos bajo estrés por sequía en lentejas es todavía muy limitada. Trabajos recientes (Singh *et al.*, 2017; Morgil *et al.*, 2019; Hosseini *et al.*, 2021) han analizado los genes relacionados con la resistencia mediante técnicas de análisis del transcriptoma basadas en una secuenciación masiva de RNA. En estos trabajos se realizaron secuenciaciones del transcriptoma (tras la extracción de RNA y posterior conversión a cDNA) y una búsqueda de genes expresados diferencialmente en las plantas de lenteja germinadas simulando condiciones de sequía. Los resultados obtenidos se comprobaron mediante qPCR. Los estudios indicaron resultados interesantes como una regulación positiva (aumento de expresión) de los genes relacionados con la oxidación-reducción, con la cadena de transporte de electrones, la senescencia de órganos, etc. También se observó una regulación negativa (reducción de la expresión) en genes involucrados en la regulación negativa del ácido abscísico (ABA), la síntesis de proteínas de la pared celular, etc.

Una aproximación diferente es la utilizada en el trabajo de Sinha *et al.* (2018), enfocada al estudio de los cambios de expresión de un número limitado de genes que previamente se hubieran identificado como claves en la respuesta a la sequía. En este estudio (2018) se analizó la respuesta de 8 genes marcadores de estrés por sequía en 8 variedades de lenteja: *DREB1A*, *DREB2A*, *DREB1C*, *RD22*, *ERD*, *ERD1*, *RD29* y *caleosina*. Los genes *DREB* codifican factores de unión a elementos de respuesta a la deshidratación, factores de transcripción involucrados en la regulación de la transducción de señales y genes sensibles al estrés, lo que quiere decir que una sobreexpresión de estos genes reflejaría una capacidad de tolerancia mayor. En cuanto a los genes *RD22* y *RD29*, son genes inducibles por sequía (de hecho las siglas de su nombre derivan de *Responsive to Dehydration*) y por frío que codifican proteínas de estrés tipo LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) y que poseen una región promotora que contiene elementos sensibles a la deshidratación (DRE). Los genes *ERD* y *ERD1* se tratan también de genes inducibles por sequía (*ERD* proviene de *Early Responsive to Dehydration*) además de sobreexpresarse también por senescencia natural. El gen *caleosina* fue implicado en un primer momento en la traducción de proteínas degradadoras de lípidos durante la germinación, pero

recientemente se ha comprobado que tiene un papel en el desarrollo de las plantas tras su unión a moléculas de calcio (Sinha *et al.* 2018).

Los resultados de Sinha *et al.* (2018) les ha llevado a proponer que los cambios de expresión en estos genes pueden utilizarse como indicadores del nivel de tolerancia a la sequía, de modo que proporcionarían una metodología sencilla para la identificación de genotipos de utilidad en los programas de mejora.

Como vemos, las plantas son capaces de realizar ajustes masivos de metabolitos, modificar sus estructuras y regular la expresión de diversas hormonas vegetales logrando adaptaciones fisiológicas y morfológicas para combatir el estrés, mientras que la respuesta a niveles bioquímicos está regulada por una compleja red de genes, por lo que se necesitara decodificar la conectividad funcional de los genes clave durante el estrés por sequía. (Sinha *et al.* 2018). El estudio de la regulación de la expresión génica juega un papel crucial en el conocimiento de las respuestas al estrés por las plantas, ya que implica tanto cambios generales en la mayoría de las plantas, como otros restringidos a las diferentes especies e incluso a genotipos concretos. Por otra parte, los cambios de expresión también presentan diferencias en función del tejido, y en concreto se ha demostrado que la raíz y las hojas no muestran el mismo tipo de modificaciones en respuesta a la sequía (Morgil *et al.*, 2019).

La técnica de la qRT-PCR (PCR cuantitativa o en tiempo real a partir de cDNA) es la técnica actual más eficiente para estudiar la expresión génica debido a su sensibilidad, especificidad y alta capacidad de rendimiento. Para obtener una determinación precisa de la expresión génica, debemos disponer de los correspondientes genes de referencia, en nuestro caso utilizamos como gen de referencia *RPL2*, gen que todos los estudios han identificado como el más estable en condiciones de estrés abiótico (Sinha *et al.*, 2019).

Como se puede deducir de lo expuesto, la información sobre los cambios en la expresión de los genes de lentejas involucrados en la respuesta al estrés por sequía es muy limitada, por lo que, para entender las vías involucradas, el estudio de la expresión de distintos genes en genotipos contrastantes es esencial.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, este trabajo ha tenido como objetivo el análisis de los cambios de expresión de genes previamente descritos como claves en la respuesta al estrés por sequía para comprobar si reflejan su tolerancia a dicho estrés. De este modo se aportarían nuevos datos sobre la validez de los resultados descritos previamente en nuevos genotipos y tejidos (hoja y raíz).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

En este estudio se utilizó un total de 120 semillas de *Lens culinaris* subsp. *culinaris* cv. Lupa repartidas en un total de 12 placas de Petri, tres de ellas se utilizaron como controles, tres se trataron con polietilenglicol 6000 (PEG) al 5 %, tres con PEG al 10 % y las últimas 3 se trataron con PEG al 20 %.

Trabajando en campana de flujo laminar, se desinfectaron las semillas introduciéndolas en tubos de ensayos donde serán tratadas con distintas soluciones y más tarde lavadas:

- Lavado con alcohol al 70 % durante unos segundos
- Lavado con agua estéril
- Lavado con hipoclorito sódico (lejía) : agua (3:1) durante 3 minutos
- Lavado con agua dos veces

Una vez esterilizado el material se procedió a su colocación en las placas Petri.

2.2. Determinación de concentraciones óptimas de polietilenglicol

Para simular los efectos de la sequía en las semillas se utilizó PEG 6000, este número hace referencia al tamaño del mismo, es decir 6000 Dalton (Da). Este polímero fue elegido por su capacidad de cambiar el potencial osmótico, causando estrés hídrico en las células, y no resultar tóxico para la planta (Morgil *et al.*, 2019).

Se trabajó con las concentraciones de 5 %, 10 % y 20 % de PEG. Puesto que las semillas tratadas con PEG al 20 % no germinaron, se obtuvieron tres tipos de material vegetal: control (C), tratamiento con PEG al 5 % (T5) y tratamiento con PEG al 10 % (T10).

2.3. Siembra de semillas de Lupa

Las semillas se germinaron en placas de Petri sobre 3 capas de papel de filtro recortado a la medida y autoclavado. Las semillas de Lupa, como se ha mencionado antes, se dividieron en 4 grupos; control, PEG 5%, PEG 10% y PEG al 20%. Además de cada grupo se realizaron 3 réplicas.

Durante la siembra se trabajó en campana de flujo laminar además de utilizar un mechero de alcohol para esterilizar el material según lo iba requiriendo el protocolo.

Empleando las pinzas se fueron colocando las semillas en las distintas placas con una separación suficiente. Para todos los ensayos se utilizó el mismo número de semillas, 10 por placa y se añadieron 5 mL de la solución correspondiente a cada grupo.

Las semillas se germinaron en una cámara de cultivo a 25° C con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Cada dos o tres días se comprobó el nivel de solución de las placas y se regaron con la solución correspondiente siempre que fue necesario. Durante las siguientes semanas se midieron los porcentajes de germinación utilizando el criterio de la exclusión radicular, contabilizando como plantas germinadas aquellas cuya raíz superó los 3 mm de longitud, además de apuntar cualquier otro suceso como posibles contaminaciones en las placas.

El material vegetal obtenido tras 14 días se recolectó y se separó por tallos y hojas por una parte y raíz por otra. Este material se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA.

2.4. Extracción de RNA

Una vez obtenido el material de tallos y hojas (al que nos referiremos como tallo en el resto del documento) tanto control como de ambos tratamientos, así como de la raíz, se procedió a la extracción del RNA.

En primer lugar se llevó a cabo una pulverización del material empleando nitrógeno líquido para facilitar la rotura y posterior extracción del ácido nucleico.

Debemos destacar que debido a la ubicuidad de las enzimas que degradan el RNA, todos los procedimientos relativos a esta parte se realizaron en campana de flujo laminar horizontal, el material fungible fue esterilizado adecuadamente y los tampones se realizaron en todos los casos con agua milli-Q tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) para inactivar cualquier RNasa contaminante que pudiera estar presente y con productos certificados como libres de RNasas.

Para la extracción se empleó el kit “NZY Total RNA isolation”, de la compañía NZYTech, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un protocolo fácil de seguir que emplea distintas soluciones y distintas columnas, cuyo uso en conjunto con varios pasos de centrifugado permiten la extracción del RNA de las muestras.

Por último, para asegurarnos de la presencia de material genético y descartar errores en la extracción, se utilizó un espectrofotómetro, NanoDropTM 100, que es capaz de detectar la

presencia de ácidos nucleicos, además de permitirnos calcular la concentración de RNA en la muestra.

2.5. Conversión a cDNA

A partir del RNA extraído antes y empleando el kit de Applied Biosystem “High Capacity RNA to cDNA” se obtuvo el DNA complementario (cDNA). Al igual que el kit para extraer RNA, este kit trae consigo las soluciones y enzimas necesarias para llevar a cabo esa conversión. Tras seguir el protocolo indicado por el fabricante, se empleó un termociclador para obtener como producto final ese cDNA y se almacenó a -20 °C.

2.6. PCR cuantitativa (qPCR)

El último paso de esta parte del estudio fue la realización de una serie de PCR cuantitativas o PCR a tiempo real. En nuestro estudio se emplearon 9 parejas de cebadores específicos para los distintos genes de los cuales se quiere saber cómo afecta a su expresión el estrés a la sequía. A continuación (Tabla 1) se indica el código de los cebadores empleados, sus secuencias y el gen que amplifican así como una breve descripción de su función en el gen de la lenteja.

Tabla 1: cebadores empleados en las qPCR y genes amplificados.

Nombre del gen (Sinha <i>et al.</i> , 2019)	Código del gen en el genoma de lenteja	Secuencia de los cebadores F: cebador “forward” R: Cebador “reverse”	Breve descripción de producto génico
<i>RPL2</i>	Lc23579	F: ATTGAGCTGAACCCAGGACAA R: GACGTGGGCTCCTTCAAGATC	Proteína ribosomal L2
<i>DREB1A</i>	Lc08352	F: ATGGCATTGAGAGGCCGATAC R: GTATCCGAGGTTGCAGGAATAGG	Proteína de unión a elementos de respuesta a la deshidratación
<i>DREB2A</i>	Lc23131	FP: GCGAAGTGGAGGGAATACAATG RP: CCTTTCGCAGGTGCTTTACG	Proteína de unión a elementos sensibles a la deshidratación
<i>DREB1C</i>	Lc07446	FP: ACTCGCCATCCGGTGTATAGG RP: TTCTTGAACGGCTCCCTCAT	Factor de unión a elementos responsables de la deshidratación
<i>RD22</i>	Lc20433	FP: GCATCCTTAACAAGTTCTCCATCA RP: TTCTTCGCACTCGCTTATCGT	Proteína sensible a la deshidratación
<i>RD29</i>	Lc13670	FP:TATTTAATGGTGGTATGCGAGGAA RP:TATCATTCTTCTCTGCCTCCTCTCA	Factor de unión a elementos de respuesta a ABA
<i>RDA</i> (ERD)	Lc14365	FP: CACCTCAATGGTGGGAGCTT RP: AAAATCTTCCCCCTCGTTCTG	Proteína glicosiltransferasa
<i>RD1</i> (ERD1)	Lc12695	FP: TGAGTGAATATATGGAACGCCATT RP: GCCGCCTTCTCCATAACCA	Proteasa de cloroplasto dependiente de ATP
<i>Caleosina</i>	Lc00769	FP: TTCATCAAACATGCACATACACATC RP: GGCTCTCTGTTTGCCTTTATCAA	Caleosin

En nuestro estudio utilizaremos la pareja de cebadores *RPL2* como control endógeno, ya que en varios estudios se ha demostrado su estabilidad de expresión en distintos tipos de estrés relacionados con sequía y deshidratación (Sinha *et al.* 2017, 2019).

Para realizar la qPCR se partió de una dilución 1:10 del cDNA obtenido en el paso anterior. Cada reacción constaba de la siguiente mezcla:

- 7,5 µl NYZ qPCR Green MasterMix (2x) ROX Plus (NYZTech)
- 2 µl de cDNA diluido 1:10
- 1,2 µl de la mezcla de cebadores F+R (5 µM de cada uno)
- Agua milli-Q (hasta un volumen final de 15 µL)

Con el fin de aumentar la homogeneidad entre pocillos, todo aquello que el experimento nos permitió fue mezclado de manera previa a su uso. Por ello, antes de empezar a cargar los pocillos, se mezclaron el MasterMix, el cDNA diluido y el agua milli-Q, habiendo calculado previamente los volúmenes necesarios para todos los pocillos.

Para realizar las reacciones, primero se añadieron 1,2 µL de los cebadores F+R a cada pocillo y a continuación se añadió a mezcla de MasterMix, cDNA y agua. Una vez se tuvieron preparadas las reacciones, la placa se introdujo en la máquina que llevará a cabo la qPCR (StepOnePlus Real-Time PCR, Applied Biosystem™). Debemos mencionar, que la enzima Taq DNA polimerasa incluida en el MasterMix es incapaz de comenzar la reacción hasta que no es sometida a 90 °C, debido a que se encuentra conjugada con un anticuerpo.

El equipo trabaja de forma automática llevando a cabo los siguientes ciclos de PCR: 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60 °C durante un minuto hasta llegar a la fase de desnaturalización desde 60 °C a 95 °C con incrementos graduales de 0,3 °C.

Una vez finalizada la qPCR, el equipo proporciona directamente los resultados que más tarde serán analizados con el objetivo de analizar los cambios en la expresión de los genes estudiados. Se estimó la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores utilizando el programa LinRegPCR en su versión más actualizada (v 2020.0) (Ruijter *et al.*, 2009). Este método se basa en representar de forma logarítmica la fluorescencia frente a los ciclos de la PCR. El programa identifica la fase exponencial de cada una de las fases de amplificación y traza una línea de regresión sobre los puntos de dicha fase. De esta recta se obtiene la pendiente y por tanto el valor de la eficiencia.

El análisis de los cambios de expresión de los genes se realizó mediante el método de C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$), incluido en el programa StepOne™ v 2.3 (Life Technologies). Este método compara el valor de C_T del gen que es objeto de estudio con el valor de C_T de nuestro gen de referencia (*RPL2*) mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Germinación de *L.culinaris*. Análisis estadístico

Como se comentó anteriormente, existen varios métodos para estudiar la tolerancia al estrés hídrico en plantas, que van desde estudios en campo (los más interesantes pero más difíciles de controlar), en invernaderos e incluso mediante análisis de imágenes térmicas en el infrarrojo (Biju *et al.*, 2018), pero se optó por utilizar el descrito en el trabajo de Foti *et al.* (2018) debido a su sencillez y eficacia en la identificación de genotipos interesantes para su utilización en mejora. Durante la puesta a punto del protocolo, se ensayaron distintas concentraciones de PEG para simular los distintos grados de sequía. Tras la primera prueba, empleando concentraciones de PEG 10 % y 20 %, los resultados obtenidos no revelaron información suficiente, ya que únicamente se observó germinación en el grupo de PEG 10 %. Suponiendo que esto se debía a concentraciones demasiado altas, se decidió volver a sembrar usando concentraciones de PEG 5 % y 10 % además de volver a sembrar con PEG al 20 %. De esta forma se logró obtener los datos de germinación de *L. culinaris* (Lupa) para las semillas tratadas con PEG al 5 % y al 10 %, pero al igual que en la prueba anterior no se consiguió que germinaran las semillas tratadas con PEG al 20 %. Tras la obtención de los datos de germinación para PEG al 5 % y al 10 % estos serían sometidos a un análisis estadístico.

A continuación (Figura 3), se muestran imágenes del material vegetal obtenido de *L. culinaris* cultivar Lupa.

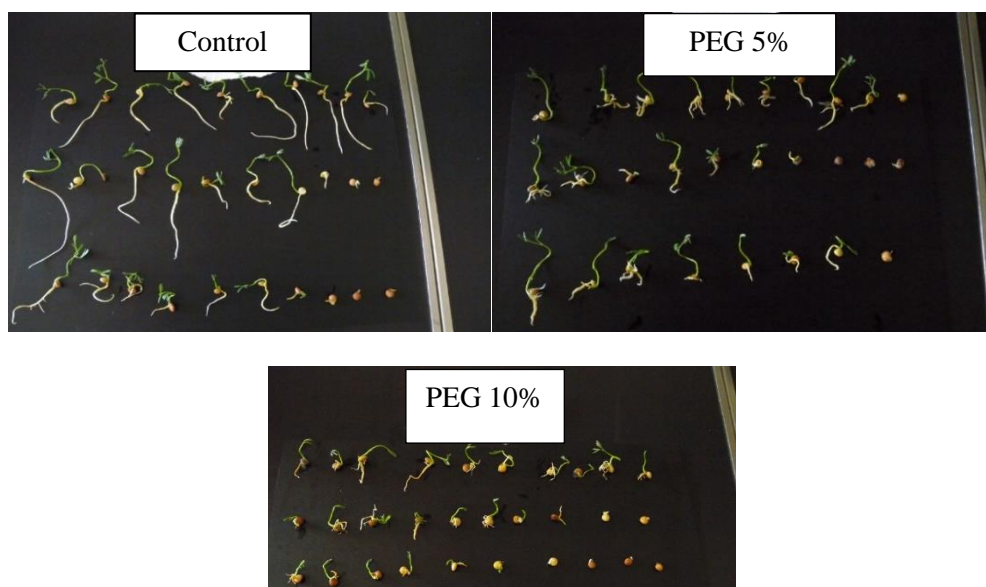


Figura 3: Material vegetal obtenido de las 3 réplicas de cada tratamiento, control, PEG 5 % y PEG 10 %.

En todas las pruebas realizadas se supuso como hipótesis nula (H_0) que no existen diferencias entre los grupos comparados. Para obtener los resultados de los análisis estadísticos, se realizaron las pruebas exactas de Fisher, en las cuales no se obtuvieron diferencias significativas entre las réplicas de cada grupo. Gracias a esto se realizó el sumatorio de réplicas y más tarde se compararon los grupos 2 a 2 obteniendo los siguientes resultados que también se muestran gráficamente en la Figura 4:

- Control-PEG 5 %: se realizó la prueba exacta de Fisher cuyo resultado fue $p = 0.256$. Con esto se pudo concluir que las diferencias ente el grupo control y el PEG 5% no son significativas.
- Control-PEG 10 %: en esta ocasión también se realizó la prueba exacta de Fisher, la cual nos dio un resultado de $p = 0.210$, por lo que como en el caso anterior no parece haber diferencias significativas entre ambos grupos.
- PEG 5 %-PEG 10 %: entre estos dos grupos también se realizó la prueba exacta de Fisher, y al igual que en los casos anteriores no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos tratamientos, ya que el valor de $p = 0.986$.

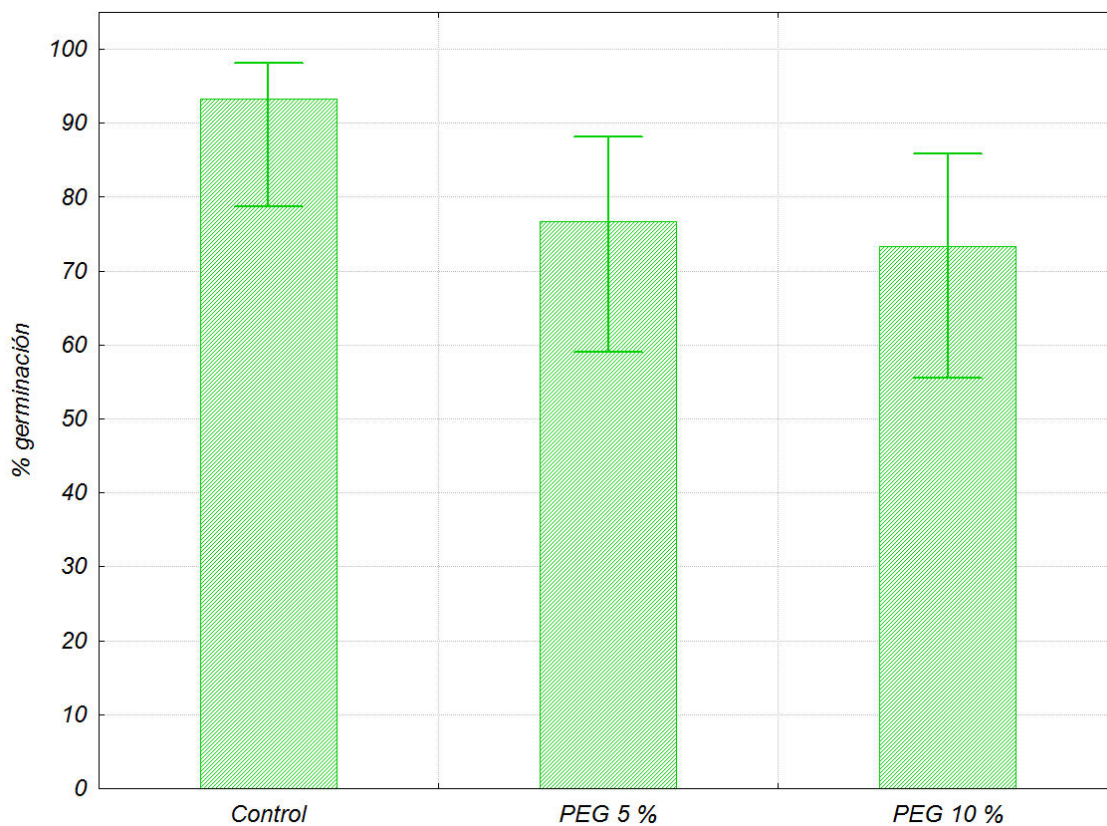


Figura 4: porcentajes de germinación (control, PEG 5% y PEG 10%). Las barras representan los niveles de confianza al 95%

Los resultados obtenidos coinciden con lo descrito por otros autores, ya que hasta que no se provoca un estrés alto utilizando porcentajes de PEG superiores al 10 %, no se produce una disminución significativa en el proceso de germinación, si bien es clara la reducción en el crecimiento de tallos y raíces y la decoloración de los tejidos (Sadeghi *et al.*, 2011; Foti *et al.*, 2018). Las fotos de la Figura 3 muestran claras diferencias en las plantas tratadas con PEG y el control, e incluso observamos diferencias entre los dos tratamientos.

Basándose exclusivamente en los datos de germinación, y comparando con los publicados para otros genotipos analizados mediante una metodología similar, el cultivar Lupa se consideraría como "sensible al estrés por sequía" (Muscolo *et al.*, 2014).

3.2. Extracción de RNA. Detección de RNA extraído

Una vez extraído el RNA mediante el procedimiento indicado en el apartado de material y métodos, para asegurar la presencia de RNA antes de su conversión a cDNA, se utilizó el equipo NanoDrop™, capaz de medir la absorbancia de los ácidos nucleicos presente en nuestra muestra, y según los resultados, devolvernos la concentración estimada del mismo. El RNA presenta un máximo de absorbancia a 260 nm. El equipo realiza una medición de la absorbancia de nuestra muestra en un rango comprendido entre 220-350 nm. Además de conocer la concentración de nuestra muestra, es importante también conocer la pureza de la misma, ya que puede haber distintos contaminantes en nuestra muestra como proteínas o agentes caotrópicos que pueden afectar negativamente en etapas posteriores del estudio.

La extracción y detección de RNA se realizó para todos los grupos, control, PEG 5 % y PEG 10 %, tanto para los tejidos aéreos como para la raíz.

Tabla 2: concentraciones medias de RNA (ng/μL) de las réplicas de los grupos control, PEG 5% y PEG 10%.

<i>Lens culinaris</i>						
control		PEG 5%		PEG 10%		
	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz
(ng/μL)	79.8	169.5	189.6	210.4	155.5	149.5

A continuación se muestra una de las gráficas de absorbancia obtenidas a partir de una de las muestras.

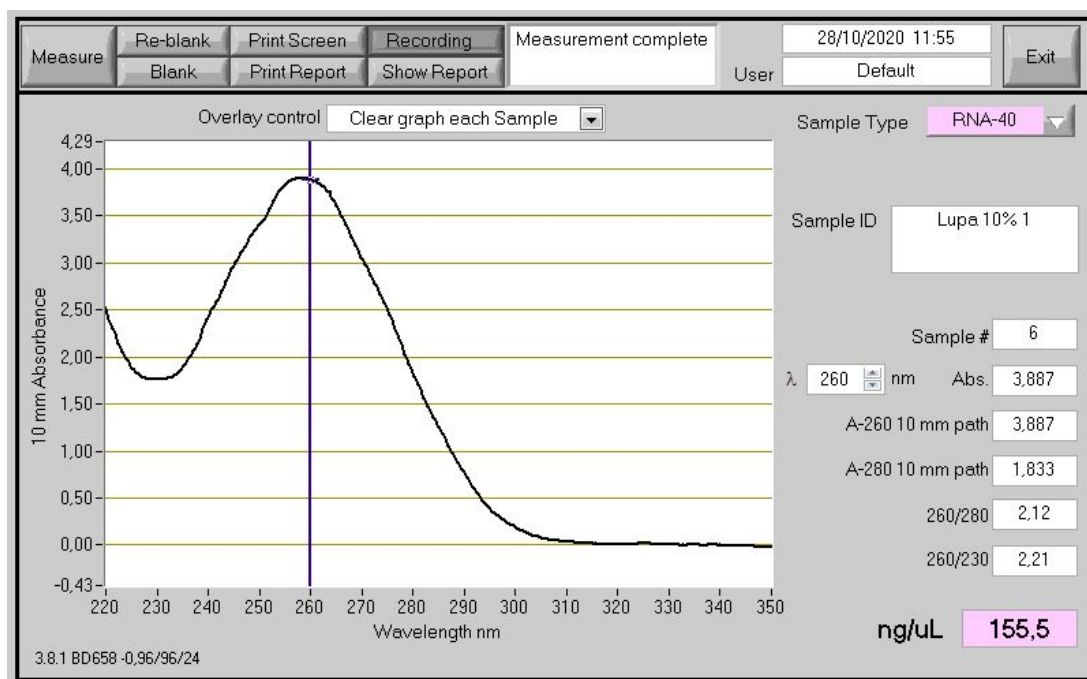


Figura 5: Gráfica de absorbancia obtenida de las muestras tratadas con PEG 10% de las partes aéreas de la planta.

Utilizaremos las relaciones 260/280 y 260/230 como indicadores de pureza basándonos en el Programa de control de calidad de ácidos nucleicos de la Universidad de Salamanca (www.bancoadn.org). Una vez hechas las gráficas nos fijamos en los valores de las relaciones antes mencionadas, para el control tenemos valores de 2.08 para la relación 260/280, lo que nos indica que es un RNA de pureza óptima, para la relación 260/230 obtuvimos un valor de 1.96 lo que nos confirma que es RNA de pureza óptima. En el caso del tratamiento con PEG al 5 % obtuvimos resultados de 1.98 y 2.07 para las relaciones 260/280 y 260/230 respectivamente, ambos valores son valores de RNA de pureza óptima. Por último, para el tratamiento con PEG al 10 % obtuvimos resultados de 2.12 y 2.21 para las relaciones 260/280 y 260/230 respectivamente, como muestra la imagen de arriba, lo que nos indica que el RNA también es de pureza óptima.

3.3. Análisis de la expresión génica (qPCR)

Como se mencionó con anterioridad, se llevaron a cabo una serie de qPCR de las distintas muestras de cDNA con el objetivo de analizar los cambios de expresión en un conjunto de genes cuando las plantas son sometidas a estrés por sequía. Estos genes fueron descritos por Singh *et al.* (2017) como posibles indicadores del tipo de respuesta de las plantas a este estrés (tolerancia/susceptibilidad), y con este estudio se pretendía analizar la validez de estos marcadores. Se emplearon placas de 96 pocillos para así aumentar al máximo el número de réplicas y con ello asegurarnos mayor fiabilidad de los resultados obtenidos.

Una vez realizadas las qPCR, los datos obtenidos se analizaron gracias al propio software de StepOne™ (Life Technologies Corporation). Este software es realmente útil para llevar a cabo este trabajo, ya que no solo muestra numerosos parámetros como las curvas de desnaturalización, el nivel de fluorescencia de los fluorocromos o distintos datos en bruto, sino que nos analiza y marca de manera automática los posibles errores que contiene cada pocillo.

Entre los errores más recurrentes que aparecieron se encontraban aquellos referentes a la existencia de grandes valores de desviación estándar entre réplicas y la aparición de múltiples picos de temperaturas de desnaturalización, como los mostrados en la Figura 6.

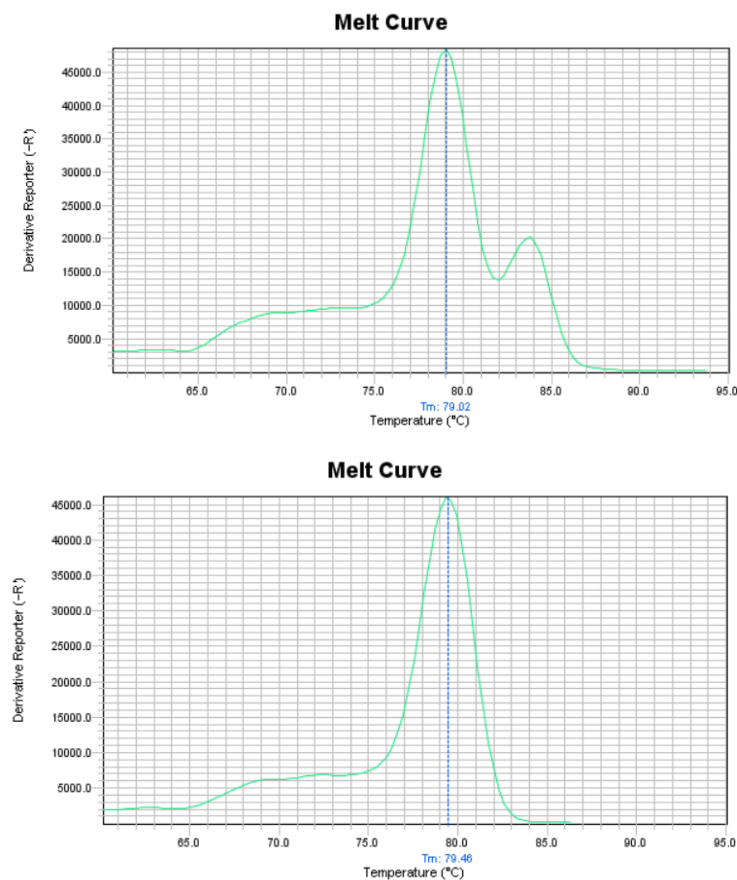


Figura 6: Ejemplos de las curvas de desnaturalización obtenidas en la qPCR. En la gráfica superior se observa una curva de desnaturalización con uno de los errores, múltiples picos de desnaturalización. La grafica inferior se corresponde con una curva de desnaturalización correcta.

Estos errores anteriormente mencionados requirieron de una corrección manual para comprobar si podrían afectar de manera negativa a posteriores análisis y tratamiento de datos. Para tener mayor seguridad a la hora de tomar las decisiones correspondientes a estos errores, se empleó de forma paralela el programa LinRegPCR v2020.2 (Ruijter *et al.*, 2009). Aquellos pocillos que mostraban curvas de desnaturalización con varios picos, o aquellos que se desviaban en gran medida del resto de sus réplicas técnicas, fueron omitidos para facilitar el posterior análisis. Una vez se terminó de corregir y omitir esos errores, se analizaron los genes

amplificados para comprobar si su expresión aumentaba o disminuía, y en caso de hacerlo si era de manera significativa. Gracias al propio software de StepOne™ (Life Technologies Corporation) se obtuvieron las gráficas para cada marcador, comparando los controles con ambos tratamientos. En nuestro caso se utilizó de control endógeno el resultado del gen *RPL2*. A la hora de interpretar las gráficas obtenidas mediante StepOne™, en el eje de abscisas aparece el grupo control comparado con ambos tratamientos para cada gen o marcador, y en el de las ordenadas aparece la cuantificación relativa, logaritmo en base 2, ya que su interpretación sencilla facilita el trabajo. Por ejemplo, si el marcador, en el grupo de un tratamiento, incrementa su valor hasta 1, significaría que el gen ha doblado su expresión, si lo hace hasta 2, su expresión será 4 veces mayor que en el grupo control, por otra parte si obtuviésemos datos negativos significaría que su expresión se ha reducido de igual manera que aumentaba en los anteriores ejemplos, es decir, un valor de -1 significaría que el gen ha reducido su expresión a la mitad, un valor de -2 significaría que su expresión es 4 veces menor. También es importante tener en cuenta los intervalos de confianza. Para poder confirmar que la expresión de los marcadores ha aumentado o disminuido de manera significativa, los valores de los intervalos de confianza del grupo control y del tratamiento en cuestión no deben solaparse. Los resultados de las eficiencias de amplificación así como sus desviaciones estándar se muestran en la siguiente tabla (Tabla 3) donde interpretamos un valor de 1 como un 0% de eficiencia y un 2 como un 100% de eficiencia.

Tabla 3: resultados de eficiencia de la amplificación de los genes en las qPCR realizadas para el material vegetal obtenido de la raíz y de tallo de *L. culinaris*.

Raíz			Tallo		
Gen	Eficiencia media	Desviación estándar	Gen	Eficiencia media	Desviación estándar
<i>RPL2</i>	1.964	0.028	<i>RPL2</i>	1.962	0.015
<i>CALEOSIN</i>	1.953	0.025	<i>CALEOSIN</i>	1.975	0.011
<i>DREB1A</i>	1.981	0.024	<i>DREB1A</i>	1.955	0.016
<i>DREB1C</i>	1.952	0.023	<i>DREB1C</i>	1.944	0.007
<i>DREB2A</i>	2.046	0.009	<i>DREB2A</i>	1.934	0.011
<i>RD22</i>	1.947	0.009	<i>RD22</i>	1.932	0.006
<i>RD29</i>	1.965	0.017	<i>RD29</i>	1.817	0.026
<i>RDA</i>	1.957	0.019	<i>RDA</i>	1.919	0.009

A continuación (Figura 7), se muestran los resultados de las qPCR realizadas a *L. culinaris* tanto para las partes aéreas como para la raíz.

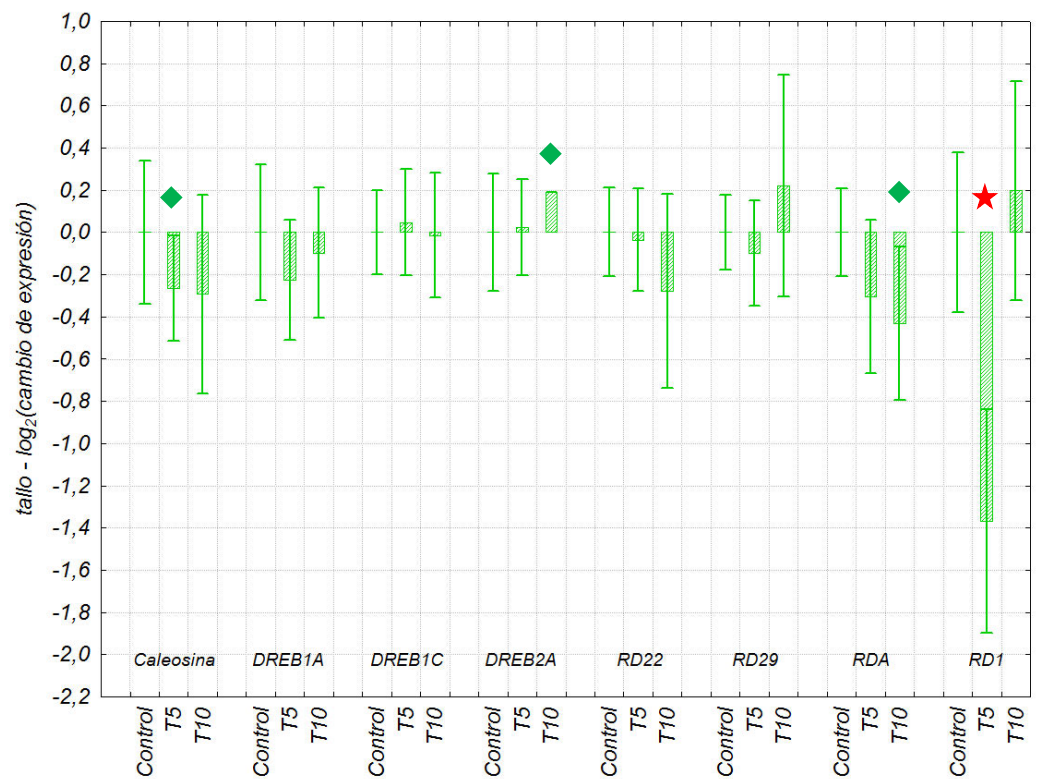
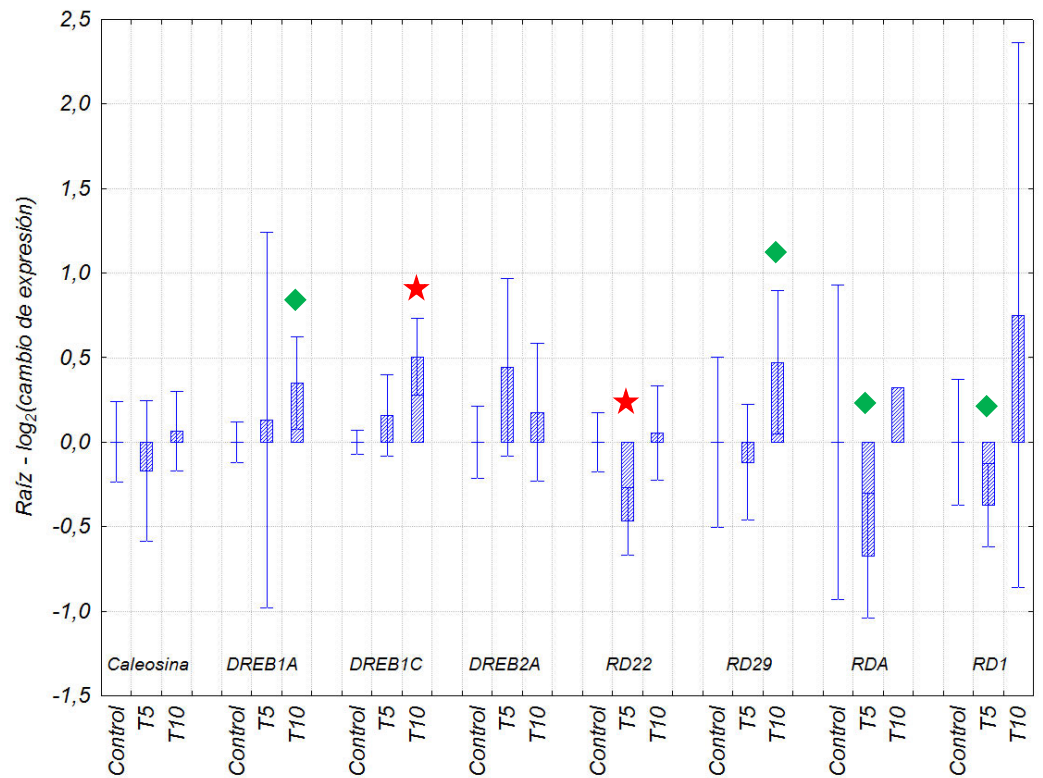


Figura 7: resultados de la qPCR para las raíces (superior) y los tallos (inferior) donde las estrellas rojas muestran cambios significativos en la expresión de esos genes y los rombos verdes sugieren cambios en la expresión, si bien estos no llegan a ser significativos.

El primero de los genes amplificados es el correspondiente al gen que codifica para la proteína caleosina, la cual está involucrada en varios aspectos del desarrollo de las plantas tras

su unión con moléculas de calcio. A pesar de ser un gen importante en el desarrollo de las plantas, no se ha revelado suficiente información sobre su funcionamiento, aunque parece participar en el control de la apertura de los estomas (Aubert *et al.*, 2010), por lo que es necesario llevar a cabo más estudios (Shen *et al.*, 2014).

En diversos estudios se ha comprobado que este gen tiende a reducir su expresión al ser sometido a estrés por sequía en plantas susceptibles a dicho estrés, y aumentar su expresión cuando se trabaja con plantas tolerantes al mismo (Sinha *et al.*, 2018). En nuestro estudio se vio como, para las partes correspondientes a la raíz, el gen de la caleosina reducía su expresión de forma no significativa al ser tratado con PEG al 5 %, mientras que al ser tratadas con PEG al 10 %, su expresión aumentaba también de forma no significativa. Las qPCR realizadas a las partes aéreas de las plantas mostraron una reducción en la expresión de la caleosina para ambos tratamientos, pero al igual que en la raíz no son resultados significativos.

Los siguientes genes amplificados fueron los pertenecientes a la familia *DREB*, una de las principales subfamilias de factores de transcripción que regulan la expresión de muchos genes inducibles por estrés abiótico (Sazegari *et al.*, 2015). Estos genes, *DREB1A*, *DREB1C* y *DREB2A*, codifican factores de unión a elementos de respuesta a la deshidratación, un tipo de factor de transcripción que puede unirse específicamente a elementos DRE/CRT como respuesta a tensiones abióticas como la sequía o las bajas temperaturas. Se ha demostrado que son factores de transcripción importantes para la planta que responden ante el estrés abiótico regulando genes posteriores que contienen una secuencia DRE en sus promotores. Una inducción de estos genes nos indicaría que la planta es tolerante al estrés por sequía, mientras que una represión supondría que la planta es susceptible a este tipo de estrés (Sinha *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en nuestro estudio correspondientes al material extraído de la raíz muestran una regulación al alza de todos los genes de la familia *DREB* (*DREB1A*, *DREB1C* y *DREB2A*) tanto para las plantas tratadas con PEG 5% como con PEG 10 %, mostrando solo un cambio significativo *DREB1C* en el caso del tratamiento con PEG al 10 %. En cuanto a las partes aéreas vemos como varían los resultados entre genes, para el gen *DREB1A* vemos como su expresión se reduce para ambos tratamientos, pero al igual que antes estos resultados no son significativos. El gen *DREB1C* muestra un incremento de expresión en ambos tratamientos, aunque tampoco resulte significativa, y por último el gen *DREB2A* muestra un pequeño aumento de expresión para el tratamiento con PEG 5 %, y un aumento algo mayor para el tratamiento con PEG 10 %, aunque estos resultados tampoco resultaron significativos.

Los últimos genes amplificados forman parte de la familia de genes *RD*, genes que codifican proteínas de tipo LEA (del inglés *Late Embryogenesis Abundant*). Estos genes son inducidos como respuesta a diversos tipos de estrés, como puede ser la sequía o el frío (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1993). Al igual que en los anteriores genes una reducción en la expresión indicaría que las plantas son sensibles al estrés por sequía, mientras que una expresión al alza supondría que las plantas son tolerantes a este estrés (Sinha *et al.*, 2018). Nuestros resultados para la raíz mostraron una reducción de la expresión en todos los genes de la familia *RD* (*RD22*, *RD29*, *RDA* y *RDI*) cuando las plantas son tratadas con PEG 5 %, mientras que al ser tratadas con PEG 10 % mostraron todos una regulación al alza. En gen *RD22* es el único de esta familia que presentó un cambio significativo en su expresión al ser tratado con PEG 5%. La inducción de este gen, *RD22*, está regulado por ácido abscísico (ABA) y requiere de biosíntesis de proteínas para la expresión génica dependiente de ABA. Estudios previos establecieron que un fragmento de DNA de 67 pb del promotor de *RD22* es suficiente para la expresión génica inducida por deshidratación (Abe *et al.*, 1997). Los resultados correspondientes a las partes aéreas mostraron diferencias entre genes de esta familia. Los genes *RD22* y *RDA* mostraron una reducción de la expresión para ambos tratamientos, siendo estos resultados no significativos. Para el gen *RD29* se observa una reducción de su expresión de forma no significativa para el tratamiento con PEG 5 % y un aumento de la expresión para el tratamiento con PEG 10 %, también de forma no significativa. El gen *RDI* mostró un aumento de expresión para las plantas tratadas con PEG 10 % pero de forma no significativa, mientras que para las plantas tratadas con PEG 5 % se observó una reducción significativa de la expresión lo que nos indicaría que Lupa se comporta como sensible al estrés por sequía.

En el trabajo de Sinha *et al.* (2018) se propone que aquellos genotipos que en condiciones de estrés hídrico muestren un incremento de expresión consistente en todos los genes anteriormente mencionados pueden considerarse como tolerantes a sequía. Por otro lado si los genotipos muestran una reducción significativa en ellos, se podrían calificar como sensibles. Basándonos en nuestros datos, Lupa no se puede calificar como claramente sensible a la sequía, puesto que en la mayoría de los genes los cambios no resultaron significativos, aunque los datos apuntan en esa dirección al haber una pequeña superioridad en genes que disminuyen la expresión, tanto de manera estadísticamente significativa como de aquellos que no llegan a alcanzarla, en raíz y en tallo. Este resultado también concuerda con la clasificación realizada mediante el análisis de germinación.

4. CONCLUSIONES

Una vez se analizaron los datos obtenidos podemos afirmar que los procesos de respuesta a los distintos estreses, entre ellos el estrés por sequía, son muy complejos. Como se comentó al principio del estudio existen numerosos mecanismos de tolerancia, algunos compartidos por la mayoría de plantas y otros más específicos que incluso pueden variar entre distintos genotipos de la misma especie.

A la hora de estudiar las distintas respuestas a estrés cualquier variación en la metodología utilizada, por pequeña que sea, puede afectar en gran medida a los resultados debido a la compleja naturaleza de la respuesta como hemos mencionado antes. Un ejemplo claro lo vemos a la hora de simular el estrés por sequía, ya que hay diversos métodos para ello además del que se realiza en este trabajo. Dentro de los métodos usados, los más informativos y útiles para el desarrollo de cultivares tolerantes son los basados en ensayos de campo, pero la dificultad de su realización, en especial cuando se tiene que evaluar un número muy alto de genotipos ha conducido al desarrollo de metodologías sencillas que permitan un primer cribado de un modo rápido y económico.

Del presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- La simulación de sequía mediante PEG 6000 durante el proceso de germinación de las plantas permite determinar el grado de tolerancia al estrés de un modo sencillo, lo que apoya su utilización en los diversos programas de mejora para la selección preliminar de genotipos prometedores.
- Se ha visto una relación entre la clasificación de tolerancia/sensibilidad a sequía mediante el análisis de germinación y el análisis de cambios de expresión génica para el conjunto de genes propuesto en trabajos previos.
- Los cambios de expresión observados dependen del tejido utilizado (tallo-raíz), por lo que habría que analizar nuevos genotipos para comprobar si la relación es consistente, si alguno de ellos proporciona una mejor información o depende de los genotipos.
- Las diferencias en la expresión de los distintos genes en los diferentes tejidos y en ambos tratamientos sugiere que la tolerancia puede estar determinada por una temprana y correcta detección del estrés desencadenante de los mecanismos necesarios para superarlo.

En definitiva, este estudio refleja la importancia de la investigación en el campo de los distintos estreses que afectan a las plantas, y en especial el estrés a la sequía. La complejidad

que se ha visto de los mecanismos de tolerancia a este estrés, junto con las previsiones, cada vez más pesimistas, sobre la escasez de agua, establecen una cuenta atrás para encontrar variantes resistentes a la sequía, y no solo de la lenteja, sino de cualquier cultivo destinado al consumo humano. La inversión y el trabajo serán indispensables para evitar una escasez alimentaria y todos los problemas que derivarían de esta.

5. REFERENCIAS

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., y Shinozaki, K. (1997) "Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression", *The Plant Cell*, 9(10), pp. 1859-1868.
- Aubert, Y., Vile, D., Pervent, M., Aldon, D., Ranty, B., Simonneau, T., Vavasseur, A. y Galaud, J. P. (2010) "RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*" *Plant and Cell Physiology*, 51(12), pp. 1975-1987.
- Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca) (sin fecha) Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Disponible en: www.bancoadn.org (Accedido: 25 de junio de 2021)
- Bauchet, G.J., Bett, K.E., Cameron, C.T., Campbell, J. D., Cannon, E. K., Cannon, S. B., Carlson, J. W., Chan, A., Cleary, A., Close, T. J., Cook, D. R., Cooksey, A. M., Coyne, C., Dash, S., Dickstein, R., Farmer, A.D., Fernández-Baca, D., Hokin, S., Jones, E. S., Kang, Y., Monteros, M. J., Muñoz-Amatriaín, M., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Richards, C., Shi, A., Town, C. D., Udvardi, M., Wettberg, E. B., Young, N. D. y Zhao, P. X. (2019) "The future of legume genetic data resources: Challenges, opportunities, and priorities", *Legume Science*, 1 p. e16.
- Biju, S., Fuentes, S., y Gupta, D. (2018) "The use of infrared thermal imaging as a non-destructive screening tool for identifying drought-tolerant lentil genotypes", *Plant physiology and biochemistry*, 127, pp. 11-24.
- Choukri, H., Hejjaoui, K., El-Baouchi, A., El Haddad, N., Smouni, A., Maalouf, F., Thavarajah, D., y Kumar, S. (2020) "Heat and drought stress impact on phenology, grain yield, and nutritional quality of lentil (*Lens culinaris* Medikus)" *Frontiers in nutrition*, 7, p. 596307. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.596307>
- Das, A., Basu, P. S., Kumar, M., Ansari, J., Shukla, A., Thakur, S., Singh, P., Datta, S., Chaturvedi, S.K., Sheshshayee, M. S., Bansal, K.C. y Singh, N. P. (2021) "Transgenic chickpea (*Cicer arietinum* L.) harbouring AtDREB1a are physiologically better adapted to water déficit", *BMC Plant Biology*, 21(1), pp. 1-17.
- FAOSTAT (2020) [Página web corporativa] Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Foti, C., Khah, E., y Pavli, O. (2018) "Response of lentil genotypes under PEG-induced drought stress: Effect on germination and growth", *Plant*, 6(4), pp. 75-83.
- Hosseini, S. Z., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Fallahi, H., Nejad, A. R., y Sohrabi, S. S. (2021) "Dissecting the molecular responses of lentil to individual and combined drought and heat stresses by comparative transcriptomic analysis", *Genomics*, 113(2), pp. 693-705.
- Huang, GT., Ma, SL., Bai, LP. Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Liu, J., Zhong, M. y Guo, Z. F. (2012) "Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants", *Molecular Biology Reports* 39, pp. 969–987. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0823-1>
- Idrissi O, Udupa SM, De Keyser E, McGee RJ, Coyne CJ, Saha GC, Muehlbauer FJ, Van Damme P y De Riek J. (2016) "Identification of quantitative trait loci controlling root and shoot traits associated with drought tolerance in a lentil (*Lens culinaris* Medik.) recombinant inbred line population. *Frontier in plants science*";7, p.1174. doi: 10.3389/fpls.2016.01174.
- Kumar, J., Sen Gupta, D., Djalovic, I., Kumar, S. y Siddique, K. H. (2021) "Root-omics for drought tolerance in cool-season grain legumes" *Physiologia Plantarum*, 172(2), pp. 629-644.
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., y Bekkaoui, F. (2018) "Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation", *Frontiers in chemistry*, pp. 6-26.
- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., y Kimura, K. (2005) "Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress", *Environmental and experimental botany*, 53(2), pp. 205-214.
- MITECO, https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/desertificacion-restauracion/1_Aridez_red1_tcm30-152810.jpg
- Morgil, H., Tardu, M., Cevahir, G. y Kavakli, İ. H. (2019) "Comparative RNA-seq analysis of the drought-sensitive lentil (*Lens culinaris*) root and leaf under short-and long-term water déficits", *Functional & integrative genomics*, 19(5), pp. 715-727.

- Muscolo, A., Sidari, M., Anastasi, U., Santonoceto, C., y Maggio, A. (2014) "Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes", *Journal of Plant Interactions*, 9(1), pp.354-363.
- Nadeem, M., Li, J., Yahya, M., Sher, A., Ma, C., Wang, X. y Qiu, L. (2019) "Research progress and perspective on drought stress in legumes: A review", *International journal of molecular sciences*, 20(10), p. 2541.
- Pérez de la Vega, M., Torres, A., Cubero, J. I. y Kole, C. (2011) *Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes*. Nueva York: CRC Press.
- Polanco, C., Sáenz de Miera, L. E., Bett, K. y Pérez de la Vega, M. (2018) "A genome-wide identification and comparative analysis of the lentil MLO genes", *PLoS one*, 13(3), p. e0194945.
- Reda, A. (2015) "Lentil (*Lens Culinaris* Medikus) current status and future prospect of production in Ethiopia", *Advances in plants & agriculture research*, 2(2), pp. 45–53.
- 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. e45-e45.
- Sadeghi, H., Khazaei, F., Yari, L. y Sheidaei, S. (2011) "Effect of seed osmopriming on seed germination behavior and vigor of soybean (*Glycine max* L.)", *ARP Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(1), pp. 39-43.
- Salas, J. D. (2000) "Hidrología de zonas áridas y semiáridas", *Ingeniería del agua*, 7(4), pp. 409-429.
- Sazegari, S., Niazi, A. y Ahmadi, F. S. (2015) "A study on the regulatory network with promoter analysis for Arabidopsis DREB-genes", *Bioinformation*, 11(2), p. 101.
- Sehgal, A., Sita, K., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K., y Nayyar, H. (2017) "Effects of drought, heat and their interaction on the growth, yield and photosynthetic function of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes varying in heat and drought sensitivity", *Frontiers in plant science*, 8, p.1776. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01776>
- Shen, Y., Xie, J., Liu, R. D., Ni, X. F., Wang, X. H., Li, Z. X. y Zhang, M. (2014) "Genomic analysis and expression investigation of caleosin gene family in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications*", 448(4), pp. 365-371.
- Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., de Groot, S., Soole, K. y Langridge, P. (2017) "Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production?", *Frontiers in plant science*, 8, p. 1950.
- Singh, D., Singh, C. K., Taunk, J., Tomar, R. S., Chaturvedi, A. K., Gaikwad, K. y Pal, M. (2017) "Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress", *BMC genomics*, 18(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3596-7>
- Singh, D., Singh, C. K., Tomar, R. S., Taunk, J., Singh, R., Maurya, S., Chaturvedi, A. K., Pal, M., Singh, R., & Dubey, S. K. (2016) "Molecular assortment of lens species with different adaptations to drought conditions using SSR markers" *PLoS one*, 11(1), p. e0147213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147213>
- Sinha, R., Pal, A. K. y Singh, A. K. (2018) "Physiological, biochemical and molecular responses of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under drought stress", *Indian Journal of Plant Physiology*, 23(4), 772-784.
- 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, pp. 123–134. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0609-1>
- Soria, H. (1995) "Legumbres: la proteína más barata", *Vida rural*, vol 17, pp 44-47.
- Stolf-Moreira R, Lemos E, Carareto-Alves L, Marcondes J, Pereira S, Rolla A, Pereira R, Neumaier N, Binneck E, Abdelnoor R, Oliveira, M. C., Marcelino, F. C., Farias, J. R. y Nepomuceo, L. (2011) "Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress", *Plant Molecular Biology Reporter* 29: pp.19-34.
- Wang, S. G., Jia, S. S., Sun, D. Z., Wang, H. Y., Dong, F. F., Ma, H. X., Jing, R. L. y Ma, G. (2015) "Genetic basis of traits related to stomatal conductance in wheat cultivars in response to drought stress", *Photosynthetica*, 53(2), pp. 299-305.

Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (1993) “The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*”, *Molecular and General Genetics*, 238(1), pp. 17-25.