

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

M.V. Ruiz-Hernández^(1,2), J.Weiss^(2,3), C. Egea-Gilabert^(2,3), M. Egea-Cortines^(2,3), J.A. Fernández^(1,2), J. Esteva⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España. victoria.ruiz@upct.es

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

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

RESUMEN

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

Palabras clave: Leguminosas; SNPs; morfología; proteínas; expresión génica

1. Introducción

Un tercio de las proteínas consumidas en la dieta humana proceden de las leguminosas [1] y el papel que desempeñan tanto en la dieta humana como en la animal es cada vez más importante. Las legumbres contienen un alto nivel de proteínas y una proporción adecuada de carbohidratos y grasas, entre otros compuestos, que las hacen apropiadas para su uso en una alimentación equilibrada. El valor nutricional de los alimentos depende del genotipo y de las condiciones de crecimiento, por lo que estudios enfocados al conocimiento de las interacciones entre estos dos factores son importantes [2].

Por otro lado, la soja (*Glycine max*) es la leguminosa que tiene la producción más extendida en el mundo (262 Mt/año) y uno de los principales productos importados para consumo humano y animal en la Comunidad Europea [3], lo que supone una importante dependencia de esta especie vegetal. La sustitución de alimentos a base de soja por otros cultivados “localmente” con alto valor nutricional es un aspecto importante para la seguridad alimentaria en Europa.

Las leguminosas son conocidas por sus efectos ambientales beneficiosos, principalmente por las ventajas derivadas de su simbiosis con los rizobios fijadores de nitrógeno ya que, por ejemplo, se puede disminuir la contaminación por nitratos. El empleo de variedades adaptadas a los distintos climas, así como la rotación de cultivos y otras técnicas agronómicas, pueden proporcionar una fuente competitiva y sostenible de proteínas en Europa [4].

El cultivo histórico de las leguminosas (lentejas, guisante y distintas judías, incluyendo caupí) es muy largo, por lo que se ha generado un amplio rango de genotipos mejorados durante siglos. Las tradiciones nacionales y las condiciones climáticas influyen en el cultivo de legumbres y su consumo, por lo que la importancia de estos cultivos varía ampliamente a lo largo de Europa. En la Unión Europea (UE) hay numerosos bancos de germoplasma en centros de investigación que conservan parte de la diversidad genética, pero existe una cantidad importante de genotipos locales que no están incluidos en estas colecciones y que se conservan de manera particular. Estos genotipos están adaptados a los distintos climas de la UE, por lo que tienen un

gran valor que puede ser aplicado, por ejemplo para la obtención de legumbres resistentes al estrés hídrico producido por el cambio climático.

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

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

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

adaptación a estrés abiótico y desarrollo y composición de semillas.

2. Materiales y Métodos

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

2.1 Selección de accesiones adaptadas al clima mediterráneo

Mediante el uso de descriptores del “International Board for Plant Genetic Resources” (IBPGR), se caracterizará morfológicamente y se evaluará en campo el comportamiento de accesiones locales de caupí (Tabla 1), haba y guisante. Los descriptores a tener en cuenta serán: el tiempo desde la siembra hasta la floración y la maduración de vainas, la duración de la floración, el tipo de crecimiento (erecto, rastrero...), el peso de las semillas, la incidencia de enfermedades y plagas, la altura de las plantas, la altura hasta la primera vaina, el color de la flor y el número de vainas y semillas por planta.

2.2 Genotipado de accesiones adaptadas al clima mediterráneo

Dos consorcios han generado dos plataformas que permiten identificar las variaciones en la secuencia de genes de caupí (EEUU) y guisante (Francia), por lo que el genotipado de estas especies se realizará utilizando SNPs conocidos (13.000 en el caso del guisante). Además, debido a que el genoma de *Vicia faba* no está secuenciado, se hará una secuenciación de transcritos con el objetivo de desarrollar e identificar SNPs en esta especie. Para ello, se extraerá ARN, que retrotranscribirá a ADNc y se secuenciará mediante Next Generation Sequencing (IonTorrent™).

2.2 Análisis bioquímico y de desarrollo de semillas

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

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

Se realizarán una serie de ensayos en campo con las accesiones seleccionadas con alto contenido proteico. Para ello, se someterá a las plantas a

estrés hídrico y se hará un análisis transcriptómico de distintos tejidos.

3. Resultados y Discusión

Los resultados esperados de este proyecto de tesis incluyen la identificación de genotipos de caupí, haba y guisante con alto contenido en proteína, buena adaptación agronómica (principalmente a escasez de agua) y altas producciones. Este conocimiento facilitará el desarrollo de líneas mejoradas (a partir de las accesiones locales, adaptadas al clima mediterráneo), con buenas aptitudes en campo que sean una fuente sostenible y competitiva de proteína para consumo humano y animal.

4. Conclusiones

Este proyecto europeo proporcionará herramientas para un aumento de la producción sostenible de guisante, haba y caupí.

5. Agradecimientos

Al proyecto EUROLEGUME por financiar este proyecto de tesis doctoral.

6. Referencias bibliográficas

[1] P. H. Graham and C. P. Vance. 2003. "Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use," vol. 131, no. March, pp. 872–877.

[2] D. Levy. 1986. "Genotypic variation in the response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to high ambient temperatures and water deficit," *F. Crop. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 85–96, Oct.

[3] "FAOSTAT Gateway." [Online]. Available: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>. [Accessed: 29-Apr-2014].

[4] T. Nemecek, J.-S. von Richthofen, G. Dubois, P. Casta, R. Charles, and H. Pahl. 2008. "Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations," *Eur. J. Agron.*, vol. 28, no. 3, pp. 380–393, Apr.

[5] S. R. Eathington, T. M. Crosbie, M. D. Edwards, R. S. Reiter, and J. K. Bull. 2007. "Molecular Markers in a Commercial Breeding

Program," *Crop Sci.*, vol. 47, no. Supplement_3, p. S–154, Dec.

[6] P. Gepts, W. D. Beavis, E. C. Brummer, R. C. Shoemaker, H. T. Stalker, N. F. Weeden, and N. D. Young- 2005. "Legumes as a Model Plant Family . Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference 1," vol. 137, no. April, pp. 1228–1235.

[7] "Legume Information System." [Online]. Available: <http://comparative-legumes.org/>. [Accessed: 29-Apr-2014].

Tablas y Figuras

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

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



Figura 1. A: plantas de caupí en invernadero; B: floración de haba; C: floración en guisante; D: formación de vainas en guisante.