



# UNIVERSIDAD DE LAS REGIONES AUTÓNOMAS DE LA COSTA CARIBE NICARAGÜENSE URACCAN

Monografía

## **Caracteres agronómicos y marcadores moleculares en una colección de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), Córdoba España, 2014- 2015**

Para optar al título de ingeniera agroforestal

Autora:

Ana Bel Bayer Centeno

Tutor:

Msc. Oscar Flores Pérez

Siuna, 2016

**UNIVERSIDAD DE LAS REGIONES AUTÓNOMAS DE  
LA COSTA CARIBE NICARAGÜENSE  
URACCAN**

Monografía

**Caracteres agronómicos y marcadores moleculares en una  
colección de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), Córdoba España, 2014-  
2015**

Para optar al título de ingeniera agroforestal

Autora:

Ana Bel Bayer Centeno

Tutor:

Msc. Oscar Flores Pérez

Siuna, 2016

A Dios por darme la vida y sabiduría para poder finalizar cada etapa de mis estudios.

A mi madre por ser mi fuente de inspiración, de fuerza y de afán de superación que siempre me ha acompañado a lo largo de mi carrera de ingeniería agroforestal y de mi vida en general.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dra. Teresa Millán Valenzuela y Josefa Rubio, por el apoyo brindado en este tiempo, más de diez meses de dedicación, experiencias compartidas en materiales, ensayos y procesamientos, en post de llegar a una meta soñada. Sin ellas no hubiese sido posible.

A mi tutor M.Sc. Oscar Flores Pérez, por su apoyo incondicional, en todo el proceso metodológico desde la distancia y que siguió apoyándome en el análisis y resultados de mi investigación.

Al Departamento de Genética de la Escuela Técnica superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes (ETSIAM) de la Universidad de Córdoba (UCO) y al Área de Mejora y Biotecnología del Instituto de investigación y formación agraria, pesquera, alimentaria y de la producción ecológica (IFAPA), ambas instituciones españolas que me han permitido realizar este trabajo monográfico.

A la Universidad de las Regiones Autónomas de la Costa Caribe Nicaragüense URACCAN, por darme la oportunidad de aplicar a mi beca en el extranjero.

Al Programa de becas Erasmus EULALinks, por permitir realizar mi estancia en la Universidad de Córdoba, España.

A los que me ayudaron de manera humanista en todo momento desde que inicié esta gratificante y hermosa experiencia.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Dedicatoria .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
ÍNDICE GENERAL .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS Y ANEXOS .....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS .....	2
2.1 Objetivo General .....	2
2.2 Objetivos Específicos.....	2
III. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1. Características Generales del Garbanzo.....	3
3.2. Variación alélica para marcadores moleculares asociados a <i>Ascochyta rabiei</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	4
3.3. Caracteres agronómicos del Garbanzo .....	11
3.4. Variabilidad alélica de marcadores asociados a caracteres agronómicos.....	20
IV. METODOLOGIA.....	24
4.1. Ubicación del estudio .....	24
4.2. Procedimiento de laboratorio .....	25
4.3. Procedimiento en Campo .....	26
4.4. Procesamiento y Análisis de la información .....	27
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1. Variación alélica para marcadores moleculares asociados a <i>Fusarium oxysporum</i> (GAGM7922) y <i>Ascochyta rabiei</i> (CY17).....	28
5.2. Caracteres agronómicos en garbanzos ( <i>Cicer arietinum</i> .L) cultivados. ....	34
5.3. Variación alélica para marcadores moleculares asociados a caracteres agronómicos (Periodo de Floración, color de flor y porte) en garbanzo. ....	36
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. RECOMENDACIONES .....	41
VIII. LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
IX. ANEXOS .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Resultados de amplificación y polimorfismo en el análisis de cola.
- Tabla 2. Descomposición ortogonal para hábito de crecimiento (achaparrado/erecto) de los efectos de genotipo e interacción GxE.
- Tabla 3. Hábito de crecimiento (achaparrado/erecto) de los efectos de genotipos e interacción GxE (genotipos y ambiente).
- Tabla 4. Fecha de floración (tardío/precoz) de los efectos de genotipo e interacción GxE (Genotipo y ambiente).
- Tabla 5. Simple/doble vaina de los efectos de genotipo e interacción GxE (Genotipo y ambiente).
- Tabla 6. Valores medios de caracteres cuantitativos de una población F6:7 de garbanzo según hábito de crecimiento, ciclo y tipo de vaina
- Tabla 7. Valores medios de caracteres cuantitativos F6:7 de garbanzo CA2990xWR315 según hábito de crecimiento y ciclo.
- Tabla 8. Resultados de evaluación fenotípica en periodo de floración en garbanzo.
- Tabla 9. Resultados generales de laboratorio con alelos resistentes y susceptibles de *Cicer arietinum* asociados a *Fusarium oxysporum* y *ascochyta rabiei*.
- Tabla 10. Resultados generales de variabilidad alélica de *cicer arietinum* asociado a *F. oxysporum* y *A. rabiei* en laboratorio y en campo.
- Tabla 11. Resultados de Porte de la planta en diferentes entradas de Garbanzos.
- Tabla 12. Resultados de Periodo de floración en diferentes entradas de Garbanzos.
- Tabla 13. Resultados de periodo de floración asociado a color de flor.
- Tabla 14. Resultados de Carácter agronómico (color de flor) en diferentes entradas de Garbanzos.
- Tabla 15. Resultados de marcador TA142 asociado a periodo de floración en garbanzo.
- Tabla 16. Resultados de marcador GAA47 asociado a color de flor en garbanzo.
- Tabla 17. Resultados de marcador FM5 asociado a Porte en garbanzo.

## ÍNDICE DE FIGURAS Y ANEXOS

### Índice de Figuras.

Figura 1. Lesiones de rabia en tallos, hojas y vainas. Ataque de rabia en un campo de garbanzo (derecha).

Figura 2. a. Material de garbanzo resistente a Fusarium (centro bandeja) y susceptible. b. Cultivo atacado por Fusarium oxysporum.

Figura 3. Flores y semillas tipo Desi (a) y Kabuli (b)

Figura 4. Mapas de España y Provincia de Córdoba, donde se realizó el estudio

Figura.5 Campus universitario de Rabanales de Universidad de Córdoba, España

Figura.6. Ubicación del Estudio en campo

Figura. 7. Marcador Hyperladder 50 pb y GAGM7922.

Figura 8: PCR 1 con marcador GAGM7922

Figura 9. PCR 2 con marcador GAGM7922

Figura 10. PCR 3 con marcador GAGM7922

Figura 11: PCR 4 con marcador CY1730

Figura 12. PCR 5 con marcador CY17

Figura 13: PCR 6 con marcador CY17

### Índice de anexos.

Anexo 1. Diseño de establecimiento en campo de una réplica<sup>46</sup>

Anexo 2: Resultado PCR: Marcador GAA47

Anexo 3. Fotos cámara de Cultivo

Anexo 4: Códigos de entradas y lugares de procedencias de las semillas.

Anexo 5. Formato para levantar datos en laboratorio

Anexo 6: Garbanzos Tipo Desi y tipo Kabulli encontrados en las entradas.

Anexo 7. Glosario de términos

## RESUMEN

Esta investigación tuvo como propósito comparar la variabilidad de caracteres agronómicos y marcadores moleculares asociados a *Ascochyta rabiei* y *Fusarium oxysporum* en una colección de garbanzo (*Cicer arietinum*) cultivados entre los años 2014 y 2015 en Córdoba, España.

La investigación de tipo experimental se desarrolló en fases, la primera, en el laboratorio de genética vegetal de la Universidad de Córdoba (UCO), por medio de extracción de ADN con el método DNAzol (ADN genómico) y el método CTAB+DTT (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio + Ditiotreitól ) y la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La variación alélica de las líneas (50) se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta con el programa Kodak 1D Image Análisis 3.6 software, posteriormente se compararon con el marcador hyperladder 50pb. La segunda, la fase en campo, un Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar los caracteres agronómicos.

Entre los resultados hallados, no hubo variación alélica respecto a los datos vistos en PCR y en campo, las líneas que presentaron alelos de resistencia (marcador CY17) resultaron ser resistentes en campo, tanto para *Ascochyta rabiei* (18 líneas) y (marcador GAM7922) *Fusarium oxysporum* (40), y las líneas susceptibles vistas en PCR mostraron coherencia en campo, destacándose 25 líneas con alelos susceptibles a *A. rabiei* y siete líneas con alelos susceptibles a *F. oxysporum* para un total de 32 líneas susceptibles en ambos marcadores.

Los caracteres agronómicos observados fueron dos líneas para carácter erecto y 46 con porte semi erecto, en el periodo de floración se encontraron dos líneas precoces, siete intermedias y 45 líneas tardías, de los garbanzos tipo Desi (Rosa) 7 líneas, tipos Kabulli (Blanco) 37 líneas, para el carácter doble vaina solo una entrada (ICCV926) portó este carácter y resultó ser la más precoz en floración, las demás fueron vainas simples.

En cuanto a caracteres agronómicos solo se observó variación asociado al periodo de floración (TA142).

En conclusión, la determinación de marcadores moleculares mediante la técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es importantísimo en la evaluación de caracteres agronómicos.

## ABSTRACT

This research aims to compare the variability of agronomic traits and molecular markers associated with *Ascochyta rabiei* and *Fusarium oxysporum* in a collection of chickpea (*Cicer arietinum*) grown between 2014 and 2015 in Córdoba, Spain.

The experimental research was developed in phases, the first in the laboratory of plant genetics at the University of Cordoba (UCO), through DNA extraction with DNAzol method (genomic DNA) and CTAB + DTT method (Bromide of hexadecyltrimethylammonium + Dithiothreitol) and PCR (Polymerase Chain Reaction). Allelic variation lines (50) were visualized by staining with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light with Kodak 1D Image program Analysis 3.6 software, then compared with the score Hyperladder 50bp. The second phase field, a completely randomized design (DCA) to evaluate the agronomic characters.

Among our findings, there was no allelic variation from the data seen in PCR and field lines showed resistance alleles (marker CY17) were resistant in the field, both *Ascochyta rabiei* (18 lines) and (marker GAM7922) *Fusarium oxysporum* (40) and susceptible lines showed consistent views PCR field, highlighting 25 with alleles lines susceptible to *A. rabiei* seven lines susceptible to *F. oxysporum* alleles for a total of 32 markers in both susceptible lines.

The observed agronomic characters were two lines to erect and 46 character semi erect bearing, in the flowering period two early lines, seven middle and 45 late lines of type chickpeas Desi (Rosa) 7 lines, types Kabulli found (White) 37 lines, double sheath character for only one entry (ICCV926) behaved this character and proved to be the earliest flowering, others were simple sheaths.

As agronomic traits associated single flowering period (TA142) variation was observed.

In conclusion, the determination of molecular markers by PCR (Polymerase Chain Reaction) technique is important in the evaluation of agronomic traits.

## I. INTRODUCCIÓN

El garbanzo *Cicer arietinum* L. ocupa el segundo lugar en el mundo en importancia como leguminosa grano, es la segunda leguminosa de grano que más se cultiva en el mundo. Además de ser empleado en la alimentación animal es la alimentación humana su principal utilización, considerada como la de mayor valor biológico entre las legumbres destinadas al consumo humano.

El garbanzo actualmente se cultiva en 50 países. En el año 2007 ocupó una superficie aproximada de 11.6 millones de hectáreas, obteniendo una producción de 9.3 millones de toneladas. El principal país productor es India, que contribuye con un 68% de la producción mundial, con un rendimiento medio de 780 kg/ ha. En España, en el 2007 se cosecharon 31200 hectáreas obteniendo una producción de 29900 toneladas, con un rendimiento medio de 958 Kg/ha.

Sin embargo, entre los factores bióticos que más limitan la producción de garbanzo están los hongos *Ascochyta rabiei* y *Fusarium oxysporum*, estas dos enfermedades pueden causar hasta 100% de pérdida de producción.

Por la variabilidad patogénica presente en *F. oxysporum* y *A.rabie* dificulta el control de la enfermedad, sin duda, el uso de cultivares con genes de resistencia específico frente a diferentes razas del patógeno, sería la estrategia más práctica, económica y efectiva de disminuir los efectos de la enfermedad en la producción. Con este fin, diversos autores han hecho estudios encaminados a identificar fuentes y genes de resistencia ( (Singh L, 1995) (Rubio, Flores, Moreno, Cubero, & Gil, 2004).

En investigaciones de mapeo en garbanzo se han utilizado diferentes marcadores de ADN tanto poblaciones inter específicas como intra específicas. (Winter, y otros, 2000). Los genes de resistencia a *Fusarium oxysporum* se han localizado en el grupo de ligamiento 2 (LG2) y 5 (LG5) de acuerdo con la nomenclatura de los grupos de ligamiento y la del mapa genético elaborado por (Winter, y otros, 2000), que se usa como referencia. En el LG2 han ubicado los genes *foc-1*, *foc-2*, *foc-3*, *foc-4* y *foc-5* de resistencia a las razas 1A, 2, 3, 4, y 5 respectivamente, y que corresponden al patotipo de marchitez. En el LG5 se ha ubicado el gen *foc-0<sub>1</sub>* que confiere resistencia a la raza 0 (Cobos *et al.*, 2005). Los genes de resistencia a raza 1B/C aún no se han mapeado.

Con fines de facilitar la selección de plantas portadoras de genes de resistencia a través de la Selección Asistida por Marcadores, es necesario contar con líneas resistentes mediante marcadores moleculares, ya que, la eficiencia en la selección depende de la disponibilidad de marcadores lo suficientemente cerca al gen o idealmente, que el marcador sea parte del gen. De ahí que, el objetivo principal de este estudio fue determinar la variabilidad de caracteres agronómicos y marcadores moleculares que permita orientar acerca de las entradas que presentan resistencia a *Ascochyta rabiei* y *Fusarium oxysporum* en una colección de garbanzo.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Comparar la variabilidad de caracteres agronómicos y marcadores moleculares en una colección de garbanzo (*Cicer arietinum*) cultivado.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Describir la variación alélica para marcadores moleculares que están asociados a Rabia (*Ascochyta rabiei*) y Fusarium (*Fusarium oxysporum*).
- ✓ Describir los caracteres agronómicos (inicio de floración, color de la flor y porte y tipo de vaina) en diferentes entradas de garbanzos (*Cicer arietinum* .L) cultivados.
- ✓ Determinar la variación alélica para marcadores moleculares asociados a caracteres agronómicos

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Características Generales del Garbanzo.

El garbanzo, *Cicer arietinum* L., es una leguminosa de grano y pertenece a la familia *Fabaceae*, cuya utilidad primaria reside en las semillas. Según Gil, (1996), es una planta anual, autógama y diploide ( $2n=2x=16$ ) y con un contenido de ADN de 738 Mb y unos 28269 genes (Vashney, 2013). Pertenece a la familia de las leguminosas (*Fabaceae*), subfamilia Papilionáceas, tribu *Cicerae* y género *Cicer*, que consta de 9 especies anuales y 35 perennes (Maesen, 1987, p. 11) de las que *C. arietinum* es la única especie cultivada.

Este género ha sido tradicionalmente clasificado en cuatro secciones basándose en características morfológicas, ciclo de vida y en su distribución geográfica (*Monocicer*, *Chamaecicer*, *Polycicer* y *Acanthocicer*). (Maesen, 1987, p. 11)

La especie cultivada está distribuida por todo el mundo, sin embargo de las 8 especies anuales y silvestres, siete son endémicas de zonas que van desde Turquía a Asia Central y otra (*Cicer cuneatum*) de zonas de Egipto, Etiopía y Sudán. Las especies perennes del género *Cicer* se encuentran más distanciadas de la especie cultivada. (Robertson, 1997, p. 309).

Hay que considerar que las especies silvestres tienen un gran potencial y son portadoras de genes de interés relacionados con caracteres agrónomicamente favorables para la mejora de este cultivo (Muehlbauer & Singh, 1987, p. 99).

Las especies anuales silvestres se han clasificado en diferentes complejos génicos según su capacidad de cruzamiento con el garbanzo cultivado, lo que refleja su distancia genética respecto a la especie cultivada. (Maesen, 1987, p. 11) y (Ladizinsky, 1996, p. 211) adoptaron la clasificación de complejos génicos primario, secundario y terciario. De acuerdo con esta definición el complejo génico primario incluye todas las especies que producen híbridos viables con la especie cultivada, incluyendo por tanto *C. arietinum*, el progenitor silvestre *C. reticulatum*, y la especie más cercana *Cicer echinospermum*. *Cicer bijugum*, *Cicer pinnatifidum* y *Cicer judaicum* Boiss constituyen el complejo génico secundario observándose problemas de esterilidad de los híbridos obtenidos con las especies debido a barreras genéticas o alteraciones cromosómicas. (Verma & Sandhu, 1990, p. 179).

La semilla de garbanzo presenta un contenido medio de proteína (desde un 20.3% a 28.2%) algo más bajo que el de otras leguminosas de grano, sin embargo, su proteína es de las más digestibles. Esto, unido a su aceptable contenido en hidratos de carbono (desde 35 a 43%), con un contenido en grasa más alto de lo habitual que en otras leguminosas (de un 3 a un 6%) y rica en ácidos grasos insaturados (ácido oleico y linoléico) (Gil, 1996, pág. 179) y a la baja presencia de factores antinutritivos, la convierten en una semilla muy interesante desde el punto de vista del consumo humano y la alimentación animal. (Gil, 1996, p. 179)

### **3.2. Variación alélica para marcadores moleculares asociados a *Ascochyta rabiei* y *Fusarium oxysporum*.**

En investigaciones tratadas al desarrollo de Líneas Casi-Isogénicas de Garbanzo para resistencia a *Ascochyta rabiei* y *Fusarium oxysporum*, se desarrollaron dos pares de líneas de garbanzo casi-isogénicas para la raza 5 de *Fusarium* utilizando como material de partida tres poblaciones F6:8 de líneas recombinantes. El marcador TA59, estrechamente ligado a la resistencia a Foc raza 5, se empleó para seleccionar genotipos resistentes y susceptibles y facilitar el desarrollo de estas líneas. (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 143)

La Fusariosis vascular, causada *Fusarium oxysporum f. sp.*, es una de las enfermedades más importantes del garbanzo (*Cicer arietinum L.*) originando graves pérdidas en la producción. Genes que regulan la resistencia a diferentes razas de Foc (foc-02, foc-1, foc-2, foc-3, foc-4 and foc-5) se han localizado agrupados en el grupo de ligamiento 2 (LG2) del mapa del garbanzo (Muehlbauer & Singh, 1987, p. 99). Desarrollar NILs que difieran para estos genes facilitaría el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia a Foc (Fusariosis). Por lo tanto el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar líneas casi-isogénicas de garbanzo para la raza 5 de *Fusarium* (Foc-5) utilizando marcadores microsatélites. (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 143)

De las seis RILs (líneas casi-isogénica) seleccionadas que mostraron una reacción intermedia a Foc-5, una de ellas fue monomórfica para el marcador TA59. En las cinco restantes se detectaron plantas homocigóticas para el alelo asociado con la resistencia (aa) y con la susceptibilidad (bb), así como plantas heterocigóticas (ab), confirmando la segregación dentro de estas líneas. En base a ello, de cada RIL, se seleccionaron dos plantas homocigóticas para el alelo asociado con la resistencia (aa) y dos plantas para el alelo asociado con la susceptibilidad (bb). (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 144).

Las descendencias de todas las plantas que fueron bb para el TA59 presentaron una respuesta susceptible y las de las plantas aa, tres de ellas se evaluaron como resistentes, dos como susceptibles y cinco presentaron una reacción intermedia. En base a estos resultados se proponen como pares de líneas casi-isogénicas aquellas que mostraron una respuesta clara para resistencia y susceptibilidad y difieren para el marcador TA59. Este material nos permitirá en el futuro localizar la posición exacta del gen que controla la resistencia a Foc-5 permitiéndonos una selección más fiable y eficaz en el programa de mejora de este cultivo (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 144).

#### **Control de Fusariosis Vascular del Garbanzo mediante cultivares resistentes.**

La Ecología del patógeno y la Epidemiología de la enfermedad indican que las epidemias de fusariosis vascular del garbanzo son de naturaleza monocíclica. En consecuencia, las estrategias más adecuadas para su control son aquellas que contribuyen a reducir la cantidad del inoculo inicial en el suelo, a reducir su eficacia o a ambas.

La rotación de garbanzo con cultivos no huéspedes puede contribuir a reducir el inoculo de sus patógenos que residen en el suelo. Sin embargo, el control de la Fusariosis vascular mediante la rotación no es efectivo debido a la capacidad del patógeno de sobrevivir prolongadamente en el suelo mediante clamidosporas. (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 144).

En colaboración con el programa de mejora genética del garbanzo de ICARDA. Durante los años 1987-1990 se evaluó la resistencia a Fusariosis Vascular del garbanzo de 2, 702 líneas Kabulli (el más frecuente en la cuenca mediterránea y oriente próximo) en una parcela naturalmente infestada por las razas 0, 1A y 5 de *F.oxysporum* (Córdoba). (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 145).

Las líneas consideradas más prometedoras un año fueron reevaluadas en los años sucesivos y las finalmente seleccionadas fueron inoculadas las razas 0, 1A y 5 del patógeno en condiciones controladas para confirmar la naturaleza de la reacción. Un total de 14 líneas fueron seleccionadas por su resistencia en campo y 35 líneas adicionales se inocularon artificialmente con cada una de las tres razas del patógeno, ocho de ellas fueron resistentes a las tres razas, 10 fueron resistentes a las razas 0 y 1A, y 16 líneas fueron resistentes a la raza 5. (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 145).

Excepto en contados casos, las líneas de garbanzo Kabulli con resistencia a la Fusariosis Vascular del garbanzo generalmente son susceptibles a la Rabia causada por *Ascochyta rabiei* lo cual limita considerablemente su utilidad en áreas geográficas donde ambas enfermedades son prevalentes. (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 145).

Por ello, se desarrolló un programa de mejora vegetal de la ETSIAM de la Universidad de Córdoba, que incluyó entre sus principales objetivos desarrollar germoplasma de garbanzo Kabulli con resistencia combinada a las dos enfermedades de dicho programa ha resultado la identificación de cuatro líneas con semillas de interés comercial resistentes a la raza 5 de *F. oxysporum* y moderadamente resistentes a un aislado altamente virulento de *A.rabiei* cuatro líneas resistentes tanto a la raza 5 de *F. oxysporum* como de *A. rabiei*. (Castro, Rubio, & Millán, 2000, p. 145).

En otra investigación de Marcadores moleculares STMS en los grupos de ligamiento 2, 3 y 4 en el cruzamiento intra específico ILC3279 x WR315 donde se localizan genes de resistencia a *Fusarium oxysporum* y QTL relacionados a *Ascochyta rabiei* y fecha de floración; respectivamente se utilizaron ciento nueve líneas recombinantes provenientes del cruce intra específico de garbanzo ILC3279xWR315 se genotiparon con treinta y tres marcadores STMS (Sequence Tagged Microsatellite Sites) para saturar el mapa genético con respecto a los grupos de ligamiento (LG) 2, 3 y 4 que poseen características deseables en cuanto a la resistencia a *Ascochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum* y fecha de floración, respectivamente. (Santander, 2014, p. 17). Se obtuvieron 10 grupos de ligamiento con los programas JoinMap 4.0 y MapMaker 3.0b. (Santander, 2014, p. 17)

El marcador STMS H2B061 se colocó muy cercanamente a los STMS TA200 y al TA59 en el LG 2. En el LG 4 se ubicó el marcador NCPGR91 a una distancia de 26.2 cM

del carácter color de flor. Los marcadores NCPGR10 y H2I01 se ubicaron en el LG 3, a 43.8 y 64.5 del STMS TA64. El marcador TA142 se ubicó en este mismo grupo, a una distancia de 17.5 cM del STMS TA64. (Santander, 2014, p. 17).

Como resultado, de los 34 marcadores STMS utilizados en la población ILC3279 x WR315, 22 mostraron buena amplificación y polimorfismo en el análisis de colas realizado. De ellos 13 mostraron asociación con los grupos de ligamiento de interés. (Santander, 2014, p. 3-17)

ILC3279 = a = 0

WR315 = b = 1

**Tabla 1: Resultados de amplificación y polimorfismo en el análisis de cola.**

<b>Grupo de ligamiento</b>	<b>Marcador/Proporción 0:1 (Análisis de colas)</b>
LG 2	CaSSR2-NED / 3:10
	NCPGR93-HEX / 5:12
	NCPGR67-PET / 5:12
	H2B061-HEX / 0:12
	H3A052-HEX / 3:10
	H2L102-NED / 1:6
LG3	TA142
	NCPGR-10-NED / 2:7
	H2I01-PET / 1:7
LG4	NCPGR34-PET / 3:11
	NCPGR98-NED / 3:11
	NCPGR91-HEX / 1:12
	NCPGR67-PET / 6:11
LG5	TA42
LG7	TA18
	TA140

De los 12 marcadores STMS escogidos para realizar el análisis de ligamiento por presentar asociación con algún grupo de interés, 4 se resolvieron en geles de acrilamida obteniendo bandas entre 150 y 316 bp. El TA142 y el TA42 se resolvieron en gel de agarosa MetaPhor al 3%, con un tamaño de banda de 129 bp para el parental femenino (alelo a) y de 123 para el parental masculino (alelo b) para el primero y de para el segundo. (Santander, 2014, p. 18)

Los 8 marcadores restantes se resolvieron por análisis de fragmentos, obteniendo bandas entre los 140 y 316 bp. (Santander, 2014, p. 3)

Los primers utilizados en este estudio no se sabe su localización en el mapa ya que es la primera vez que se los incluye en un análisis de ligamiento excepto por los marcadores TA142, asociado al grupo de ligamiento 3 (Cobos, y otros, 2007, p. 33),

TA42, asociado al grupo de ligamiento 5 () y TA18 y TA140 asociados al grupo de ligamiento 7 (). (Santander, 2014, p. 18)

Todos los primers se ajustaron a la segregación esperada para una población de líneas recombinantes. (Santander, 2014, p. 18)

Se obtuvieron 10 grupos de ligamiento tanto con el programa JoinMap 4.0 como con MapMaker 3.0b. (Santander, 2014, p. 3)

El marcador STMS GAA47 asociado a la característica de color de flor, está ubicado en el grupo de ligamiento 4. Ambos programas ubicaron en este grupo al STMS NCPGR91 a cM del marcador. (Santander, 2014, p. 17)

Los marcadores STMS TA59 y TA200 asociados a la resistencia a Fusariosis, están en el grupo de ligamiento 2, en donde tanto JoinMap 4.0 como MapMaker ubicaron a los marcadores NCPGR67 y H2B061, con cM de distancia entre ellos. (Santander, 2014, p.17)

La característica de fecha de floración está asociada a los marcadores TA64 y TA142 y se encuentra ubicada en el grupo de ligamiento 3. En él, se han ubicado los STMS NCPGR10 y H2I01, que se encuentran a cM del TA142 y a cM del TA64. Las distancias en cM con los dos algoritmos utilizados por JoinMap y aquellas calculadas con el MapMaker presentan diferencias, no solo entre programas sino entre los algoritmos. Pero cabe destacar que se encuentra mayor similitud entre el algoritmo de recombinación (JoinMap) y el programa MapMaker. (Santander, 2014, p. 17).

En otra, investigación sobre Saturación y localización de marcadores moleculares del grupo de ligamiento 2, de un total de 12 marcadores RAPDs que se probaron en los parentales de la población WR315 x ILC3279, sólo 11 mostraron buena amplificación, obteniendo entre 2 y 15 bandas. De estos, seis de los RAPDs resultaron ser monomórficos y 5 polimórficos. Y dentro de los polimórficos, uno (CS27<sub>700</sub>) ya se sabía que estaba asociado a la resistencia a fusariosis y se analizó en toda la población para incluirlo en el mapa de ligamiento, mientras que el resto de los RAPDs solo se amplificaron en 10 RILs resistentes y 10 RILs susceptibles (análisis de colas), resultando no estar asociados a la resistencia a fusariosis, por lo que no se analizaron en el resto de la población. (Salmerón, 2014, p. 28)

De los 20 marcadores STMS analizados, 12 se resolvieron por análisis de fragmentos variando en peso molecular entre 236 y 290 pb. Los 8 restantes se visualizaron en gel de agarosa y su peso osciló entre 100 y 280 pb. En todos los casos se obtuvo buena amplificación. En los STMS resueltos por análisis de fragmentos se obtuvieron patrones que permitieron diferenciar claramente el alelo del parental femenino (alelo a) y el masculino (alelo b) y en algunos casos individuos heterocigotos. (Salmerón, 2014, p. 28)

Al realizar el análisis de colas con los STMS de la serie NCPGR de los que no se conocía su situación en el mapa de garbanzo, no se obtuvo asociación a la resistencia

a fusariosis al no coincidir el patrón de alelos con el carácter resistente/susceptible, por tanto estos marcadores no se incluyeron en el análisis de ligamiento. (Salmerón, 2014, p. 28)

Todos los STMS localizados en trabajos previos en el grupo de ligamiento 2 se estudiaron en toda la población para realizar el análisis de ligamiento. Todos se ajustaron a la segregación 1:1 esperada para una población de líneas recombinantes, excepto el marcador TR58 con  $X^2 = 17.78$  ( $p < 0.01$ ). Este marcador TR58 no se incluyó en el análisis de ligamiento. (Salmerón, 2014, p. 28).

Por otra parte, se incluyó en el estudio el carácter cualitativo resistencia/susceptibilidad a fusariosis raza 5, considerando resistentes a las RILs con 0-30% de plantas muertas a las 5 semanas después de la inoculación. La proporción de RILs resistentes frente a susceptibles se ajustó a la segregación esperada 1:1 para ambas razas, y se incluyeron en el análisis de ligamiento. (Salmerón, 2014, p. 28)

Finalmente, se obtuvo un grupo de ligamiento formado por los 10 marcadores STMS, un marcador RAPD (CS27<sub>700</sub>) y el carácter de resistencia a raza 5 (*Foc 5*) de *Fusarium oxysporum sp ciceris*. El marcador TS82, aunque se ajustó a la segregación esperada, no resultó ligado a ninguno de los marcadores del LG2. Este grupo comprende una distancia de 162,1 cM, con una distancia máxima entre marcadores de 32.1 cM, mínima de 3.0 cM. (Salmerón, 2014, p. 28)

### **Marcadores moleculares de ADN**

Los marcadores moleculares son trozos de ADN que se pueden identificar bien (no tienen por qué ser genes). Su polimorfismo es elevado (se pueden conseguir hasta miles de marcadores), pueden detectarse en cualquier estadio del desarrollo y se distribuyen a lo largo del genoma. (M & Cubero, 1978, p. 465).

### **Marcadores de ADN basados en la PCR**

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que permite multiplicar ADN *in vitro* (artificialmente). Básicamente es una máquina con un termóstato que baja y sube la temperatura varias veces (termociclador) donde se cargan las muestras de ADN. Para multiplicar el ADN se siguen los siguientes pasos: Calentamiento de la muestra a unos 90-95°C que provoca la desnaturalización del ADN (se abren las cadenas), se baja la temperatura, se añade la ADN polimerasa y nucleótidos y se produce la duplicación de las cadenas. (Moreno & Solís, 2010, p. 75)

El principal problema de esta técnica era que la ADN polimerasa se degradaba a esa temperatura tan alta. La solución llegó de una polimerasa procedentes de bacterias termófilas (TAQ polimerasa) (Manchada G, 2008, p. 595). Esta enzima es termo resistente. Como en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN total, al cabo de n ciclos la cantidad de ADN será  $2^n$  la inicial (en 21 ciclos un millón de copias). Como el grado de multiplicación es tan alto, a veces hasta se puede empezar con una sola molécula de ADN. (Moreno & Solís, 2010, p. 75).

## **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Polimorfismo de ADN basado en una amplificación aleatoria. Se necesitan cebadores para iniciar la duplicación. Los cebadores (o *primers*) son secuencias cortas de nucleótidos (de unos 10 nucleótidos) que se unen en diversos puntos del genoma (secuencias complementarias). Ahí se enganchan la ADN polimerasa y comienza la extensión de la cadena de ADN (Mandel, 1971). Las diferencias entre individuos y entre alelos son debidas al anclaje o no del cebador en un determinado punto. (Moreno & Solís, 2010, p. 75).

Los RAPDs no suelen ser codominantes y la técnica no es fácilmente repetible. Sin embargo, el proceso es fácil y de bajo coste. (Millán, y otros, 2006, p. 81).

## **Microsatélites**

Las secuencias repetidas de nucleótidos son muy comunes en el genoma de cualquier especie. El número de repeticiones varía entre individuos (Millán, y otros, 2006, p. 81). Estas secuencias suelen tener bordes muy parecidos (zonas flanqueantes). Utilizando estas zonas flanqueantes como cebadores podemos amplificar con la PCR la secuencia repetida. Las diferencias entre individuos (entre alelos) son debidas al distinto tamaño de la secuencia repetida. Son marcadores codominantes. (Moreno & Solís, 2010, p. 76).

## **Genotipar y Fenotipar.**

Con la llegada de los marcadores moleculares podemos detectar los alelos y genes, y por ello se habla, de Genotipar una planta o una población (Muehlbauer & Singh, 1987, p. 99). Este nuevo verbo se utiliza en contraste con fenotipar, que consiste en evaluar un fenotipo (medir el rendimiento, ver el color, la resistencia a enfermedades, etc.). Que ha sido el proceso habitual para evaluar un carácter. (Moreno & Solís, 2010, p. 76).

Al igual que para el resto de las leguminosas, los dos objetivos tradicionales en la mejora de la especie son el incremento y la estabilidad de los rendimientos; además de la mejora de la calidad de los granos. (Cobos, y otros, 2007, p. 33).

Aunque se han dedicado esfuerzos para mejorar las producciones del cultivo, la falta de estabilidad sigue siendo su principal problema. Los principales inconvenientes para aumentar la producción radican en la mejora de características agronómicas relacionadas con la adaptación a sistemas de cultivo (Moreno & Solís, 2010, p. 69).

El garbanzo es un cultivo que tradicionalmente se siembran en primavera y la planta desarrolla poca biomasa en corto periodo de tiempo de su crecimiento, reflejándose en la producción final de semillas del cultivo. (Moreno & Solís, 2010, p. 69)

Sería bueno sembrar en invierno y alargar el ciclo permitiéndonos aumentar las producciones. Sin embargo, las siembras invernales están muy limitadas por la

susceptibilidad del garbanzo a la Rabia (enfermedad causada por el hongo aéreo *Ascochyta rabiei*), ya que, es la época que el hongo encuentra las condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de la enfermedad ( $T^a$  aprox. 5-15 °C y humedad alta). (Cobos, y otros, 2007, p. 33).

El desarrollo de líneas resistentes a rabia ha permitido la introducción de las siembras de invierno llegando a duplicar o triplicar las producciones (Moreno & Solís, 2010, p. 100). La mejora para resistencia a rabia ha llegado a ser uno de los objetivos principales de los programas de mejora de garbanzo (Cobos, y otros, 2004, p. 263).

## **Enfermedades causadas por hongos en el garbanzo**

### **Rabia del garbanzo (*Ascochyta rabiei*)**

Es una de las enfermedades más peligrosa en el mundo pudiendo causar pérdidas de casi el 100% de la producción, cuando la enfermedad se manifiesta intensamente, se seca por completo el cultivo en poco tiempo, reduciendo los rendimientos en valores por encima del 80% (Chongo G, 2002, p. 85).

El patógeno ataca todas las partes aéreas de la planta causando necrosis y colapso tisular (Figura 1). Los síntomas aparecen en forma de manchas redondeadas en hojas y vainas, alargadas en los tallos, estando bordeadas por un anillo oscuro. Estas manchas son de color ocre y en ellas aparecen numerosos puntos negros, perceptibles a simple vista, que son los picnidios productores de las conidias que propagan la enfermedad. (Moyano N. , 2004, p.40).



**Figura 1.** Lesiones de rabia en tallos, hojas y vainas. Ataque de rabia en un campo de garbanzo (derecha).

Las manchas de los tallos son el resultado de una atrofia vascular, impidiendo la circulación de la savia, pudiendo romperse por dichas lesiones, produciendo la muerte de la planta sobre la zona afectada. La enfermedad se desarrolla en periodo húmedo y con temperaturas entre 5-30 °C. Por ello, el principal limitante del cultivo de invierno es poseer cultivares resistentes a rabia (Moyano N. , 2004, p. 40).

Sembrar garbanzo de primavera en otoño es exponerse, con facilidad, a un desastre seguro, a menos que sea resistente a la enfermedad (Moyano N. , 2004, p. 40).

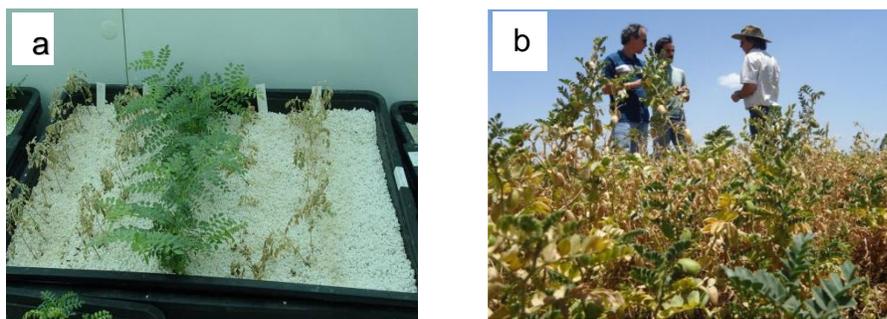
### **Fusariosis (*Fusarium oxysporum*)**

Este hongo, ataca principalmente, en el sistema vascular de la planta y es uno de los

principales causantes en garbanzos de la marchitez de la planta (Figura.2), constituyendo también uno de los factores limitantes importantes del cultivo. (Moyano N. , 2004, p. 40)

Los cultivares de invierno sufren menor ataque de Fusarium debido que al llegar la primavera las plantas han desarrollado un sistema radicular más fuerte y lignificado y, por lo tanto, opone más resistencia a la entrada del hongo; en un año normal en cuanto a humedad, y aun húmedo si las temperaturas son bajas, hay resistencia por escape, pero con humedad y temperaturas suaves en invierno, el cultivo puede verse atacado. (Moyano N. , 2004, p. 41).

La inestabilidad del cultivo es causada por el hongo del suelo Fusarium, que junto con la rabia son las dos enfermedades más importantes del garbanzo (Figura 2 b). Hasta la fecha se han descrito ocho razas distribuidas en India, España y Estados Unidos. La permanencia del hongo en el suelo y la capacidad de sobrevivir durante años hace complicado su control (Haware, Nene, & Natarajan, 1996, p.12)



**Figura 2. a.** Material de garbanzo resistente a Fusarium (centro bandeja) y susceptible. **b.** Cultivo atacado por Fusarium oxysporum.

Por lo tanto el uso de cultivares resistentes es la mejor forma de controlar esta enfermedad. Se dispone de fuentes de resistencia a fusarium entre los garbanzos cultivados siendo la piramidación de genes (asociados a las diferentes razas) en los nuevos cultivares desarrollados la estrategia más adecuada para proporcionar resistencia durable a esta enfermedad. (Moyano N. , 2004, p. 42)

### **3.3. Caracteres agronómicos del Garbanzo**

#### **Origen de caracteres de interés agronómico.**

Probablemente mutaciones, como vaina indehiscente, hábito más erecto y semillas sin dormancia hayan jugado un papel importante en el proceso de su domesticación (Moreno & Solís, 2010, p. 50). Se dispersó desde su centro de origen hacia el Este hasta la India, hacia el Sur llegó a Etiopía a través del valle del Nilo y hacia el Oeste por la cuenca Mediterránea (Maesen, 1987, p. 11). En su camino evolutivo el garbanzo ha ido acumulando numerosas mutaciones, como: la flor blanca, insensibilidad al fotoperiodo, tegumento o cubierta de la semilla más delgada, porte erecto, etc. generando una alta diversidad fenotípica para diferentes caracteres

morfológicos y agronómicos (Moreno & Solís, 2010, p. 43). Sin embargo se ha descrito que tiene una base genética muy estrecha desde el punto de vista molecular, hecho que unido a la zona limitada donde se distribuye su ancestro silvestre sugieren un origen monofilético de esta especie cultivada (Moreno & Solís, 2010, p. 50).

Así pues el paso de silvestre a cultivado ha supuesto una ganancia de caracteres deseables agronómicamente y pérdida de los indeseables. Se han encontrado grandes diferencias entre la especie silvestre y la cultivada, especialmente en el área foliar, hábito de crecimiento, altura de la planta, dehiscencia de la vaina y peso de 100 semillas, lo que sugiere que son estos los caracteres que han sufrido mayores cambios durante la domesticación (Robertson, 1997, p. 309).

Durante el proceso de dispersión y selección, el germoplasma de *C. arietinum* parece haberse diferenciado en dos acervos genéticos diferentes que según (Moyano N. , 2004, p. 44), tras analizar tanto caracteres cuantitativos como cualitativos, propusieron como razas microsperma y macrosperma. Los mejoradores, dentro de la especie cultivada, distinguen dos tipos morfológicamente diferentes: “Desi” y “Kabuli” (Figura 3).



**Figura 3.** Flores y semillas tipo Desi (a) y Kabuli (b)

Flores rosas, semillas pequeñas, angulares y coloreadas y con una cubierta gruesa y algo rugosa suelen ser de los tipos Desi (similar a microsperma) cultivados actualmente en India, Pakistan, África y más recientemente en Australia. Los tipos Kabulli (similar a macrosperma) poseen flores blancas y semillas grandes, redondeadas y de color claro, la cubierta es fina y lisa, se encuentran fundamentalmente en la cuenca mediterránea, el cercano oriente, México y los estados unidos y Canadá. Estos tipos también difieren en una serie de características agronómicas, tolerancia al frío, resistencia a rabia (enfermedad de gran importancia en el cultivo) y hábito de crecimiento erecto son más frecuentes en los garbanzos tipo Kabulli. (Moyano N. , 2004, p. 46).

Los tipos Desi suelen presentar tolerancia a altas temperaturas y a la sequía, resistencia a fusarium y precocidad. Parece ser de los tipos Kabulli, con menos variabilidad, evolucionaron a partir de los Desi y caracteres oligogénico como la flor, grosor de la cutícula y tamaño de la semilla han jugado un papel muy importante en su evolución (Moyano N. , 2004, p. 46).

### **Descripción Morfológica del Garbanzo *C. arietinum***

*C. arietinum* es prácticamente un arbusto, es una especie dicotiledónea, anual y

herbácea que alcanza aproximadamente una altura de 40- 60cm con tallos ramificados y pelosos, sistema radicular profundo que compone de una raíz pivotante, que normalmente alcanza entre 40 y 50 cm de profundidad, pudiendo llegar incluso hasta 1 metro. El tallo puede ser erecto, semierecto (frecuente en las variedades cultivadas) o rastrero (en las silvestres). Éste tiene tres ramificaciones principales, y en términos de producción la segunda, es la más importante (Cubero, 1987, p. 35)

Una ramificación primaria, que comienza a la altura del suelo, con ramas gruesas, fuertes y lignificadas; una ramificación secundaria, que se desarrolla en nudos de las ramas primarias, y una ramificación terciaria, desarrollada sobre la secundaria. La ramificación secundaria es la que más contribuye a la producción de la planta. (Moyano N. , 2004, p. 56).

Las hojas se disponen alternas a lo largo del tallo, son pseudo- imparipinnadas con número variable de folíolos por hoja (6-7 a 16-18) que son sub elípticos y dentados. Las flores son axilares solitarias y una por nudo, aunque en ocasiones (por mutaciones espontáneas) pueden aparecer dos flores por nudo. Son de color blanco o púrpura y presentan las características típicas de una flor papilionácea. Son flores hermafroditas y autógamas (Cubero, 1987, p. 35).

El fruto es una vaina bivalva con una o dos semillas en su interior, aunque existen genotipos que pueden presentar tres semillas por vaina. Son globosas, vellosas y de pequeño tamaño (2,5-3cm.), confiriéndole un aspecto característico. Las semillas, de forma globosa o bilobular, son en general puntiagudas y muestran un pico característico (recto o curvado) en la zona donde aparecerá la radícula. La superficie de la semilla puede ser lisa o rugosa y presenta una amplia gama de colores entre el blanco, crema, amarillento, anaranjado, marrón, rojizo o negro (Moreno & Solís, 2010, p. 68)

### **Adaptación del cultivo y caracteres implicados**

La arquitectura de los cultivos puede ser modificada para su adaptación a diferentes ambientes y para aumentar de producción y estabilidad, optimizando así los programas de mejora, siendo esta la principal razón de mejoradores y genéticos. Puede verse afectada por condiciones ambientales, principalmente la temperatura e intensidad de radiación. Varios caracteres influyen en esta adaptación, entre ellos destacamos los patrones de ramificación, el tamaño de hoja y la fecha de floración, siendo éste último el de mayor importancia (Huyghe, 1998, p. 383).

### **Fecha de floración del Garbanzo**

La fecha de floración es un componente esencial en la adaptación del cultivo, particularmente en regiones semiáridas donde el crecimiento está limitado por la disponibilidad de agua y por las temperaturas al final del periodo de crecimiento (Subbarao GV, 1995, p. 469). Así pues, materiales precoces (asociados con maduración precoz) son los adecuados para escapar de sequías terminales y altas temperaturas al final del ciclo (Gaur, y otros, 2007, p. 391), siendo la precocidad un

factor clave en la formación y maduración de las vainas ante la presencia de estrés abiótico (Moreno & Solís, 2010, p. 50).

En ambientes mediterráneos, floración precoz está positivamente asociada con producción (Siddique KHM, 2003, p. 151).

Utilizando poblaciones de líneas recombinates (RILs) y poblaciones derivadas de retrocruzamientos, (Sabaghpour SH, 2003, p. 542) observaron una alta asociación con el vigor de la planta. También se ha observado una moderada y positiva correlación con el peso de la semilla (Hovav, Upadhyaya, Beharav, & Abbo, 2003, p. 539), sugiriendo que es difícil mejorar para precocidad sin comprometer el peso de la semilla, siendo este último un carácter de gran interés para el mercado. No obstante, estos resultados contrastan con la información del ICRISAT donde se han empleado materiales de origen Mexicano con semilla grande y muy precoces (Gaur, y otros, 2007, p. 391).

La floración es un carácter muy variable depende de la estación, de la fecha de siembra y de la altitud y latitud (Summerfield & Roberts, 1988, p. 329). Los genotipos de garbanzo muestran una respuesta diferencial al fotoperiodo y a la temperatura (Robertson, 1997, p. 309), encontrándose genotipos en los que la fecha de floración está influenciada por la respuesta al fotoperiodo y por la temperatura, sin embargo, en otros está determinada únicamente por el fotoperiodo (Cubero, 1987, p. 35-66).

La insensibilidad al fotoperiodo ha jugado un gran papel en la adaptación a ambientes de latitudes bajas. En la Cuenca Mediterránea, la insensibilidad al fotoperiodo podría ser un carácter interesante para evitar los estreses de humedad los cuales ocurren fundamentalmente en la época de verano (Cobos, y otros, 2007, p. 33-42).

La información disponible de la herencia de la fecha de floración difiere dependiendo de los genotipos usados como parentales y del ambiente. (Gumber & Sarvjeet, 1996, p. 295), estudiaron su genética utilizando tres cruzamientos de garbanzo en el norte de la India (ambiente subtropical).

### **Porte del garbanzo**

El porte es otro carácter de adaptación del cultivo y relacionado con la arquitectura de la planta. Está controlado por un gen (*Hg/hg*), siendo erecto dominante y rastrero recesivo (Patil, 1959), (Argikar & D'Cruz, 1959, págs. 402-405)) y localizado en el GL3 del mapa genético de garbanzo (Winter, y otros, 2000, p.1163).

Los tipos erectos son generalmente más altos, con tallos más compactos y mejor adaptados a la mecanización que los tipos achaparrados. Debido a que las líneas erectas tienen menos ramificaciones primarias y secundarias y por lo tanto menos vainas que las achaparradas, es necesario mayor número de plantas por unidad de área para conseguir una mayor producción (Muehlbauer & Singh, 1987, p.125). observaron que bajo condiciones mediterráneas, el porte semierecto o achaparrado influye positivamente en la estabilidad de la producción y en el rendimiento (Singh L,

1995, p. 191-197) definieron una serie de categorías basándose en el ángulo que forman las ramificaciones secundarias con el tallo principal: (1): erecto, formando un ángulo entre 0-15°; (2): semi erecto, entre 15-25°; (3): semi-rastrero, entre 25-60°; (4): rastrero, entre 60-80° y (5): ramas caídas en el suelo. (Cobos, y otros, 2007, p. 34).

### **Efecto de caracteres de herencia simple sobre los caracteres agronómicos y componentes del rendimiento evaluados en garbanzos.**

Dos poblaciones estudiadas segregan para caracteres que pueden tener valor adaptativo y que están controlados por uno o pocos genes. Esto nos ha permitido agrupar los genotipos estudiados en clases basándonos en cada uno de estos caracteres cualitativos y se han realizado descomposiciones ortogonales del efecto genotipo y de la interacción GxE para cada uno de ellos en el análisis de la varianza. De esta manera se ha analizado el efecto que puedan tener estos caracteres sobre los caracteres cuantitativos evaluados. De estos caracteres adaptativos, hábito de crecimiento y fecha de floración segregan en ambas poblaciones, número de vainas por nudo (simple o doble vaina) en JG62xILC72 y tipo de hoja (normal/unifoliada) y tamaño (grande/pequeña) en CA2990xWR315. (Carreras, Rubio, Gil, & Millán, 2013, p. 149).

### **Hábito de crecimiento (achaparrado/erecto) en garbanzo.**

Este carácter tuvo una gran influencia sobre altura de planta y altura de inserción de la primera vaina en JG62xILC72, explicando la diferencia entre porte achaparrado y erecto un alto porcentaje de la variación de estos caracteres en dicha población (58 y 56% respectivamente) (Tabla 5). En éste caso, hábito erecto estuvo asociado a una mayor altura de planta (56.25 vs 48.55cm). Se observaron diferencias significativas en las interacciones GxE dentro de cada grupo y entre grupos. Las interacciones dentro del grupo achaparrado explicaron un mayor porcentaje de la variación de la interacción GxE total para altura de planta y altura 1ª vaina ( $R^2 = 44$  y 52% respectivamente). Este alto porcentaje puede ser debido a su mayor número de grados de libertad ( $gl=84$  y 24 para altura de planta y altura 1ª vaina respectivamente). Respecto a las interacciones que presentan las diferencias entre grupos, estas explicaron un moderado porcentaje de la interacción GxE total en ambas alturas (27 y 32% respectivamente), lo que indica que las diferencias en altura entre achaparrado y erecto no fueron iguales en todos los ambientes ensayados. En la población CA2990xWR315 no se observaron diferencias entre los dos hábitos de crecimiento y su contribución a la interacción GxE total tampoco fue importante (Tabla 2). En esta población en conjunto se observa una arquitectura más baja en todos los ensayos. (Carreras, Rubio, Gil, & Millán, 2013, p. 149)

**Tabla 2:** Descomposición ortogonal para hábito de crecimiento (achaparrado/erecto) de los efectos de genotipo e interacción GxE.

Cuadrados medios						
	Genotipo (g/=<9)		Interacción GxE (g/=<114)			
Caract.	Achaparrado (g/<14)	Erecto (g/<4)	Ach.vs.Erecto ((g/<1)	Achaparrado (g/<84)	Erecto (g/<24)	Ach.vs.Erecto ((g/<6)
AP	340.31*** (30%)	482.24* (12%)	9165.99** (58%)	59.43*** (44%)	137.51*** (29%)	511.72*** (27%)
A1A V	231.02*** (30%)	368.77*** (14%)	6018.09** (56%)	34.09*** (52%)	38.08*** (17%)	290.15*** (32%)
S/P	8341.52*** (74%)	368.83 (1%)	40498.75** (26%)	2563.89*** (84%)	1119.65*** (10%)	2588.29*** (6%)
P/P	85.11 (62%)	68.19 (14%)	463.91* (24%)	78.49*** (83%)	40.57*** (12%)	56.22 (49%)
P100	253.26*** (69%)	153.96** (12%)	981.94** (19%)	21.08*** (67%)	28.68*** (26%)	31.70 (7%)

**Tabla 3.** Hábito de crecimiento (achaparrado/erecto) de los efectos de genotipos e interacción GxE (genotipos y ambiente).

Cuadrados medios						
	Genotipo (g/=<19)		Interacción GxE (g/=<133)			
Caract.	Achaparrado (g/<11)	Erecto (g/<7)	Ach.vs.Erecto ((g/<1)	Achaparrado (g/<77)	Erecto (g/<49)	Ach.vs.Erecto ((g/<7)
AP	33.80*** (77%)	153.11* (22%)	46.41 (1%)	72.88*** (60%)	67.26*** (35%)	73.77* (5%)
A1A V	119.78*** (39%)	297.00*** (60%)	3.69 (1%)	26.87*** (54%)	32.99*** (42%)	23.27 (4%)
S/P	4076.32** (74%)	2550.42 (13%)	76021.73*** (55%)	1452.31*** (73%)	530.33 (17%)	2072.09*** (10%)
P/P	96.23 (34%)	227.03 (50%)	492.52* (16%)	53.18*** (59%)	48.63*** (34%)	67.77*** (7%)
P100	597.39 (50%)	171.06*** (9%)	5445.37*** (41%)	31.77*** (62%)	25.57*** (31%)	41.67*** (7%)

AP: altura de planta, A1<sup>a</sup>V: altura de inserción 1<sup>a</sup> vaina, S/P: semillas/planta, P/P: producción/planta y P100: peso de 100 semillas. \*, \*\* y \*\*\* nivel de significación para  $P<0.05$ ,  $P<0.01$  y  $P<0.001$

Para los componentes del rendimiento semillas/ planta, producción/planta y peso de 100 semillas, se obtuvieron diferencias significativas entre hábito achaparrado y erecto en ambas poblaciones (tablas 5 y 6) hábito achaparrado parece contribuir a un mayor número de granos y producciones por planta y a un menor tamaño de semilla en las dos poblaciones. Estas diferencias fueron importantes en CA2990XWR315 para semillas/ planta y tamaño de semilla (P100) explicando un 55 y 41% respectivamente de la variación total del genotipo (tabla 3).

En general la interacción GxE fue significativa dentro de los grupos de genotipos de hábito achaparrado, erecto y entre grupos. La interacción GxE que mostró el grupo con hábito achaparrado fue la más importante respecto a la interacción total en ambas poblaciones para los tres componentes del rendimiento, no obstante esto puede ser debido al mayor número de grados de libertad y por los genotipos que muestran este

carácter. Respecto a las interacciones GxE detectadas entre grupos, aunque fueron la mayoría significativas, su peso en la interacción total fue poco importante (<10%). (Carreras, Rubio, Gil, & Millán, 2013, p. 145-149)

### Fecha de floración (precoz/tardía) en garbanzos

Se observaron diferencias significativas entre fecha de floración precoz y tardía para altura de planta y altura de inserción de la 1ª vaina en la población JG62xILC72. La precocidad estuvo asociada a menor altura de planta y viceversa para ciclo tardío. La mayor parte de la interacción GxE (genotipo y ambiente) de estos dos caracteres fue explicada por la interacción presente en cada grupo siendo ligeramente superior en el grupo de genotipos precoces lo que puede estar relacionado con el ligero aumento de sus grados de libertad. Aunque la interacción GxE detectada por las diferencias entre grupos fue significativa esta fue poco importante ( $\leq 10\%$ ). En CA2990xWR315 no se observaron diferencias entre los dos grupos (precoz y tardío) y su contribución a la interacción GxE total tampoco fue importante. (Carreras, Rubio, Gil, & Millán, 2013, p. 145-149)

**Tabla 4.** Fecha de floración (tardío/precoz) de los efectos de genotipo e interacción GxE (Genotipo y ambiente).

Cuadrados medios						
Caract.	Genotipo (gl=19)		Interacción GxE (gl=114)			
	Tardío (gl<8)	Precoz (gl<10)	Tardío.vs. Prec (g/<1)	Tardío (gl<48)	Precoz (gl<60)	Tardío.vs. Prec (g/<6)
AP	592.89*** (30%)	761.15*** (48%)	3504.50** (22%)	95.36*** (40%)	100.40*** (53%)	126.88** (7%)
A1A V	350.47*** (26%)	563.17*** (52%)	2291.92 (22%)	41.38*** (36%)	49.75*** (54%)	91.05*** (10%)
S/P	6404.48** (32%)	9452.82*** (60%)	12991.30 (8%)	2154.03*** (40%)	2295.09*** (54%)	2778.13*** (6%)
P/P	49.35 (20%)	147.85* (77%)	54.90 (3%)	74.80*** (45%)	66.08*** (51%)	50.05** (4%)
P100	336.34*** (52%)	94.26*** (18%)	1510.04** (30%)	27.34*** (50%)	15.32*** (35%)	69.58*** (15%)

AP: altura de planta, A1<sup>a</sup>V: altura de inserción 1ª vaina, S/P: semillas/planta, P/P: producción/planta y P100: peso de 100 semillas. \*, \*\* y \*\*\* nivel de significación para  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$

El comportamiento de las dos poblaciones fue también diferente para los componentes del rendimiento. En CA2990xWR315 se observaron diferencias altamente significativas e importantes ( $R^2 = 45\%$ ) entre precoz y tardío para el carácter semillas/planta, mientras que, en JG62xILC72 no se observaron diferencias significativas (Tabla 4). Para tamaño de semilla (peso de 100 semillas) aunque hubo diferencias significativas e importantes entre ciclo precoz y tardío en las dos poblaciones sin embargo en CA2990xWR315 precocidad estuvo asociado a mayor tamaño de grano y viceversa en JG62xILC72

Respecto a la interacción GxE debida a las diferencias entre ciclo precoz y tardío fue significativa para todos los componentes del rendimiento en las dos poblaciones

aunque su contribución a la interacción total no fue muy importante, del 4 al 15% en JG62xILC72 y del 6 al 10% en CA2990xWR315 (Tablas 7). La interacción fue también altamente significativa dentro de cada grupo para los tres componentes del rendimiento en ambas poblaciones. En JG62xILC72 para tamaño de semilla el grupo de plantas precoces explicaron un porcentaje más bajo de la interacción ( $R^2 = 35\%$ ) que el de las tardías ( $R^2 = 50\%$ ) a pesar de que los grados de libertad del primero fueron mayores. Estos resultados sugieren que el carácter precocidad confiere una mayor estabilidad al tamaño de la semilla. Sin embargo, en CA2990xWR315 es el ciclo tardío el que parece conferir mayor estabilidad al tamaño de semilla. En esta misma población las plantas que poseen ciclo precoz parecen ser también más estables que las de ciclo tardío para semillas/planta. (Carreras, Rubio, Gil, & Millán, 2013, p. 149).

### Número de vainas por nudo (simple o doble vaina) en garbanzos

Este carácter solamente se evaluó en la población JG62xILC72, donde el parental JG62 es el portador del carácter doble vaina por nudo. No se observaron diferencias entre doble y simple vaina para todos los caracteres evaluados y la contribución de estas diferencias a la interacción GxE total, aunque significativas en la mayoría de los casos, no fueron muy importantes (Tabla 5). Por los valores de  $R^2$  correspondientes a la interacción GxE parece ser que los genotipos de vaina doble conceden una mayor estabilidad a la producción por planta ya que el porcentaje que explican de la interacción GxE total es más bajo. De igual manera los genotipos con Vainas simples serían más estables para tamaño de semillas. (Carreras, Rubio, Gil, & Millán, 2013, p. 149)

**Tabla 5.** Simple/doble vaina de los efectos de genotipo e interacción GxE (Genotipo y ambiente).

Cuadrados medios						
Caract.	Genotipo (gl=19)		Interacción GxE (gl=114)			
	Doble (gl<9)	Simple (gl<9)	Dobl.vs. Simp (gl<1)	Doble (gl<54)	Simple (gl<54)	Dobl.vs. Simp (gl<6)
AP	1088.78*** (62%)	575.04*** (32%)	884.73 (6%)	116.64*** (52%)	76.27*** (39%)	157.56** (8%)
A1A V	701.21** (52%)	467.42** (39%)	209.71* (2%)	53.43*** (52%)	45.29*** (45%)	31.11 (3%)
S/P	9104.76** (52%)	7255.57** (41%)	11512.35 (7%)	2231.34*** (47%)	2246.42*** (47%)	2661.54*** (6%)
P/P	106.08 (50%)	103.25 (48%)	44.1 (2%)	57.02*** (39%)	76.87*** (52%)	112.22** (9%)
P100	176.66*** (%)	353.20*** (62%)	374.60 (7%)	23.83*** (49%)	16.78*** (34%)	76.03*** (17%)

**Tabla 6.** Valores medios de caracteres cuantitativos de una población F6:7 de garbanzo según hábito de crecimiento, ciclo y tipo de vaina

Hábito de crecimiento	Porte		Ciclo		Tipo de vaina	
	Achaparrado	Erecto	Tardío	Precoz	Doble	Simple
Caracteres						
Altura planta	48.55	56.25	55.06	48.81	49.97	53.28
Altura 1ª Vaina	23.63	28.65	28.42	23.33	24.84	26.40
Semillas/ plantas	85.49	74.50	73.56	87.32	85.47	76.61
Producción /planta	15.30	14.29	14.29	14.85	14.81	14.97
Peso 100 semillas	19.00	20.52	21.77	17.88	18.63	20.58

Valores medios de caracteres cuantitativos de interés agronómico a lo largo de diferentes ambientes de una población F6:7 de garbanzo procedentes del cruzamiento JG62xILC72 según hábito de crecimiento, ciclo y tipo de vaina

**Tabla 7.** Valores medios de caracteres cuantitativos F6:7 de garbanzo CA2990xWR315 según hábito de crecimiento y ciclo.

Hábito de crecimiento	Porte		Ciclo	
	Achaparrado	Erecto	Tardío	Precoz
Caracteres				
Altura planta	41.58	40.70	41.3	41.15
Altura 1ª Vaina	17.80	18.10	18.74	17.08
Semillas/ plantas	73.01	43.20	73.16	48.60
Producción /planta	14.87	12.61	15.18	12.76
Peso de 100 semillas	21.80	29.36	22.00	27.46

### Caracteres agronómicos importancia en la producción en el garbanzo

La producción es un carácter complejo ya que es el resultado del desarrollo completo de la planta y presenta una heredabilidad baja. En garbanzo, existen correlaciones entre producción y sus componentes (semillas por vaina, vainas por planta, semillas por planta, producción por planta, tamaño de semilla, etc.)

Muehlbauer & Singh, (1987); Singh L, (1995); Kumar L, (1991). En una colección de garbanzo tipo kabuli de 3267 entradas, encontraron una significativa y positiva correlación entre producción y tamaño de la semilla pero no entre producción y semillas por vaina o vainas por planta. Sin embargo, vainas por planta ha sido frecuentemente descrito como uno de los caracteres que más fuertemente contribuye a la producción en garbanzo. Ocasionalmente se han publicado correlaciones negativas entre tamaño de semilla y producción (Muehlbauer & Singh, 1987, p. 125).

Los componentes de la producción como semillas por planta o vainas por planta son difíciles de manejar en los programas de mejora. Son caracteres complejos que

pueden estar influenciados por otros caracteres cualitativos como doble vaina (dos vainas por nudo), el porte y la fecha de floración. De hecho, el carácter doble vaina parece tener un efecto positivo en la estabilidad de la producción (Rubio J, 1998, p. 585-587) y (Rubio, Flores, Moreno, Cubero, & Gil, 2004, p. 255) en otros ensayos agronómicos se ha observado que las líneas con doble vaina producen más que las de vaina simple (Kumar L, 1991, p. 15).

Así pues para desarrollar cultivares bajo condiciones mediterráneas, habría que considerar en los programas de mejora las siguientes cuestiones: a) para siembras de primavera: precocidad y hábito de crecimiento semierecto son los caracteres con mayor influencia en la producción y en la estabilidad de la producción respectivamente y b) para siembras de invierno: el hábito de crecimiento semierecto, doble vaina y precocidad son los caracteres que más influyen en la estabilidad de la producción (Rubio, Flores, Moreno, Cubero, & Gil, 2004, p. 262).

### **3.4. Variabilidad alélica de marcadores asociados a caracteres agronómicos.**

#### **Variabilidad genética de Marcador asociado a floración**

El control genético de la fecha de floración es bastante discutido, ya que difiere de los genotipos usados como parentales y del ambiente. (Gumber & Sarvjeet, 1996, p. 295) en ambientes de ciclo largo y en ambientes de ciclo corto, concluyeron que el control era digénico, siendo precocidad recesivo. (Kumar L, 1991, p. 14-15) Utilizando genotipos precoces, observaron que dicho carácter estaba controlado por un gen mayor. Se han identificado QTLs (quantitative traits loci) asociados a este carácter indicándonos que puede haber varios genes que controlan la fecha de floración. Estos se han localizado en los GL4 (QTLDF1) y GL3 (QTLDF2) del mapa genético del garbanzo. El marcador más estrechamente ligado al QTLLG3 fue el microsatélite TA142 mientras que el GAA47 se encuentra en el “pico” del QTLLG4 (Cobos, y otros, 2007, p. 42).

En garbanzo, no se han hecho estudios a nivel funcional y lo que se ha publicado respecto al control de la floración son experimentos de genética clásica. Se han descrito cuatro genes no alélicos (Efl-1, Efl-2, Efl-3 y Efl4) que controlan la fecha de floración en diferentes genotipos de garbanzo, siendo los alelos tardíos los dominantes sobre los precoces (Gaur, y otros, 2007, p. 420).

#### **Desarrollo de líneas casi isogénicas para fecha de floración en garbanzo y búsqueda de genes candidatos**

Resultados de evaluación fenotípica de dos RILs segregantes junto con sus parentales creciendo en condiciones de día corto (cámara e invernadero) y patrones de amplificación con los marcadores STMS TA142 y GAA47 que son indicadores de los QTLDF2 (GL3) y QTLDF1 (GL4), respectivamente. (Ali L. , 2014, p. 64).

**Tabla 8.** Resultados de evaluación fenotípica en periodo de floración en garbanzo.

<b>Evaluación fenotípica (días de floración) media:</b>					
Marcadores	2012	2014	2015	TA142 (QTL <sub>DF2</sub> )	GAA47 (QTL <sub>DF1</sub> )
ICL3279	nf	-----	140	A	A
WR315	36	-----	133	B	B
RIP8/RIL74-75	55	104	133	B	B
RIP8/RIL74-32	72	105	140	A	B
	2013				
JG62	57	-----	103	A	A
ILC72	117	-----	130	B	B
RIP10/RIL82-3	59	96	120	A	A
RIP10/RIL82-4	71	106	132	A	B

nf: no floreció

A y B: Alelos presentes en uno y otro padre

En el análisis de QTLs con los datos de campo permitió determinar el marcador GAA47 como el más asociado al QTL<sub>DF1</sub> en los años 2003 y 2004 con un LOD máximo de 2.7 y 4.69 explicando 14.8 y 24.7%, respectivamente. En el caso de los datos invernadero, los marcadores CaGM14822 y SNPFT1 (situados en el mismo punto del grupo de ligamiento) tuvieron el LOD más alto (5,27) explicando el 27.1% de la variación fenotípica (Ali L. , 2014, p. 64).

En el QTL detectado, se encontraron ocho genes anotados que podrían estar asociados con fecha de floración en garbanzo. De estos ocho genes hay tres represores de la inducción de floración. Entre ellos, el gen anotado *TEMPRANILLO* (9,5 Mb) está en el intervalo del QTL entre los marcadores CaGM14822/SNPFT1 y GAA47 (el máximo LOD) y tienen el rango (8,3 – 9.6 Mb). Además, la precocidad en el genotipo JG62 (mutación natural) debe ser resultado de fallo de represor que daría lugar a floración temprana. Por eso, el gen *TEM* puede ser un gen candidato para la precocidad en JG62 y por lo tanto en RIP-1. (Ali L. , 2014, p. 64)

### **Objetivos de mejora**

Los dos objetivos tradicionales en la mejora de la especie son el incremento y la estabilidad de los rendimientos; a estos dos objetivos se le tiene que incorporar un tercero que cada día va cobrando mayor importancia: La mejora de la calidad de los granos. (Moyano S. N., 2004, p. 32).

Si se añade la escasa mejora genética que el cultivo ha tenido a lo largo de su historia en comparación con trigos, cebada, maíz, etc. El hecho que es un cultivo que tradicionalmente se ha sembrado en primavera en tierras marginales y secas (Rabiosos), se entenderán los bajos rendimientos que la especie ha sufrido, con

valores comprendidos entre los 500 y 1,000 kg/ha. A este bajo rendimiento se le tiene que añadir la falta de estabilidad, principalmente ocasionada por tratarse de un típico cultivo secano, de países con clima mediterráneo, con grandes oscilaciones climatológicas, cayendo los rendimientos por debajo de los valores citados, ya que al tratarse de un cultivo de primavera, en años secos, en los que se agotan las reservas de agua del suelo, el estrés hídrico en la planta se produce en momentos críticos de la formación y llenado del grano, por lo que los descensos en la producción son manifiestos. (Moyano S. N., 2004, p. 34).

La siembra en invierno posibilita un mejor aprovechamiento de las aguas de lluvia, ya que, en nuestras condiciones, es en invierno cuando las precipitaciones son más frecuentes y numerosas, alcanzando la planta un mayor desarrollo y una mayor producción de biomasa, (Moyano S. N., 2004, p. 40)

El gran problema es que el garbanzo es por naturaleza muy sensible a Rabia, producida por *Ascochyta rabiei*, que se desarrolla en ambientes húmedos produciendo graves daños que pueden llegar a la destrucción total del cultivo. Por tanto, para que se puedan sembrar cultivares en invierno, estos tienen que ser, en primer lugar, resistentes a dicha enfermedad. En segundo lugar los cultivares de siembra otoñal tienen que ser tolerantes a las bajas temperaturas de invierno. (Moyano S. N., 2004, p. 34)

Se han obtenido cultivares de invierno (siembra otoñal) cruzando con líneas de garbanzo tradicionales organolépticas y planamente adaptadas a condiciones de cultivo. (Moyano S. N., 2004, p. 30)

Siendo el objetivo principal, aumentar los rendimientos y la estabilidad de éstos, se han realizados estudios comparando el efecto del carácter doble vaina con el carácter vaina simple (carácter normal), obteniéndose una mayor estabilidad en las producciones de líneas que eran portadoras del carácter doble vaina, sin alterarse el tamaño de la semilla (Rubio J, 1998, p. 585).

El tamaño de la semilla y su uniformidad son factores de gran importancia, sobre todo en lo referente a la aceptabilidad por parte del consumidor al igual que acuerdos de importación-exportación. Para la exportación se requieren tamaños de semilla superiores a 8 mm (34-35 g/100 semillas), así como uniformidad en el tamaño y color del grano (Moyano N. , 2004, p.40).

### **Métodos de mejora con caracteres agronómicos de interés.**

Al tratarse de una especie autógama, se pueden utilizar los métodos típicos de autógamas: selección simple sin cruzamiento o bien métodos de selección con cruzamiento cuando las razas locales no den por simple selección la línea con los caracteres deseados (Salmeron, 2005, p. 46). Selección masal, genealógico (con variantes) o retrocruzamiento. (Moyano S. N., 2004, p. 45).

Los caracteres de herencia simple como el carácter doble vaina se introducen fácilmente por retrocruzamiento. (Salmeron, 2005, p. 60)

El color de la flor ha sido utilizado como marcador morfológico, al igual que el color del grano, de calidad culinaria según Moreno & Solís, (2010). La selección asistida por marcadores moleculares no se aplica todavía en la práctica de mejora, pero los resultados obtenidos indican su posibilidad de uso para gran número de caracteres RAPD, microsatélites e isoenzimas se utilizan para construir mapas genéticos. (Salmeron, 2005, p.46)

### **Caracterización del genotipo**

Normalmente los marcadores se basan en la presencia de dos alelos diferentes (A y a). Estas diferencias, también llamados polimorfismos, nos señalan el marcador. Los primeros marcadores utilizados fueron los caracteres morfológicos diferenciales (semilla lisa y rugosa, colores, etc), pero son poco abundantes. Luego vinieron los marcadores bioquímicos, como las isoenzimas. La llegada de los marcadores de ADN, con cientos para cada especie y que cubren muy bien el genoma, ha revolucionado el campo de la genética y también el de la mejora vegetal. (Moreno & Solís, 2010, p. 54)

Lo más interesante en agronomía es conseguir marcadores que estén ligados a caracteres de interés por ejemplo, resistencia a enfermedades, para seleccionar éstos mediante los marcadores. (Moreno & Solís, 2010, p. 50)

### **Marcadores Genéticos.**

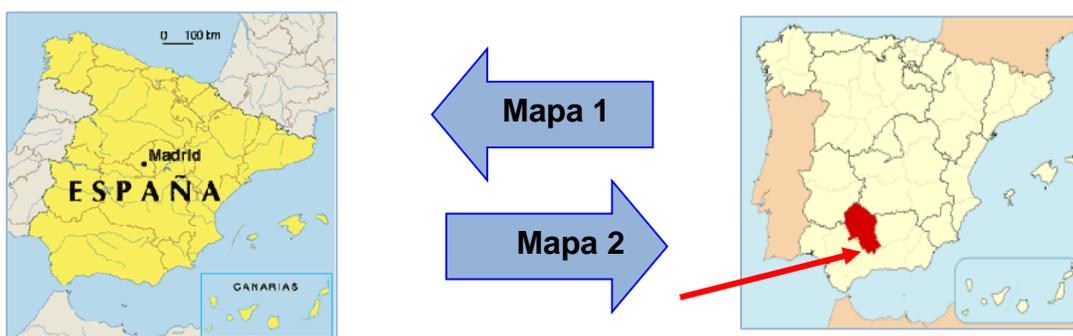
Característica de un marcador ideal.

- ✓ Expresión fenotípica de identificación fácil (un color, una banda).
- ✓ Expresión codominante, o sea, que se pueda distinguir el heterocigoto del homocigoto dominante (Aa del AA): Permite distinguir estos genotipos al mismo tiempo. Si hay dominancia no se puede distinguir AA y Aa más que autofecundando o haciendo el cruzamiento prueba y viendo la descendencia, lo que hace que se tarde una generación más (a veces un año más)
- ✓ Ausencia de efectos del desarrollo que alteren la expresión del carácter principal (un carácter puede cambiar a lo largo del desarrollo, por ejemplo, una hoja joven puede no presentar espinas pero la adulta sí, el color de un órgano puede cambiar con el desarrollo).
- ✓ Expresión temprana en el desarrollo (mejor si se puede detectar en semilla o en plántula como los marcadores de ADN): Permite ganar tiempo.
- ✓ Distribución homogénea a lo largo del genoma (que cubra todos los cromosomas y se distribuya homogéneamente a lo largo de los cromosomas), para poder tener marcadores de todos los genes de interés.
- ✓ Gran número de marcadores (alto nivel de polimorfismo).
- ✓ Bajo precio y baja peligrosidad en la tecnología necesaria. (Moreno & Solís, 2010, p. 50).

## IV. METODOLOGIA

### 4.1. Ubicación del estudio

Este estudio se realizó en España, situado en sur-oeste de Europa, en la península Ibérica y en el norte de África (Mapa 1), en la comunidad autónoma de Andalucía, en la provincia de Córdoba (Mapa 2). **(Figura 4)**



**Figura 4.** Mapas de España y Provincia de Córdoba, donde se realizó el estudio

El universo del estudio fueron las líneas de garbanzos del continente Europeo y México cada una procedentes de diferentes Regiones y Países. A partir de ahí, se definió el marco muestral conformado por 50 entradas o líneas de garbanzo, obtenidas en el banco de germoplasma.

Se trata de una investigación experimental con 50 líneas de *Cicer arietinum* L dividida en dos fases: La primera que correspondió a la fase en laboratorio y la segunda a la fase en campo, donde se sembraron las 50 líneas, siguiendo un diseño completamente al azar (DCA).

La unidad experimental estuvo constituida por plantas de garbanzos, las cuales estuvieron ubicadas en 2 surcos de 2 metros de largo en esa distancia se pusieron entre 20 a 25 semillas de garbanzos por surco, obteniendo un total de 40 a 50 semillas en los 4 metros con una distancia de 20 cm entre plantas, la separación entre cada surco fue de 0.70 metros.

La parcela estuvo constituida por diez réplicas con 25 plantas de garbanzo cada unidad experimental, para un total de 250 líneas de garbanzo.

El área total para la evaluación en campo fue de 20 metros cuadrados.

#### **Tratamientos Evaluados:**

Marcadores asociados a resistencia a enfermedades *Fusarium oxysporum* y *Ascochyta rabiei*: CAGM7922 (A) y CY17 (B) y marcadores asociados a caracteres

agronómicos: TA142 (C) Marcador de Floración, GAA47 (D) marcador de color de flor y FM5 (E) Marcador de Porte en la planta.

Las muestras se cargaron en geles de acrilamida no desnaturalizada al 10% (C= 2.67) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio

### **Variables evaluadas**

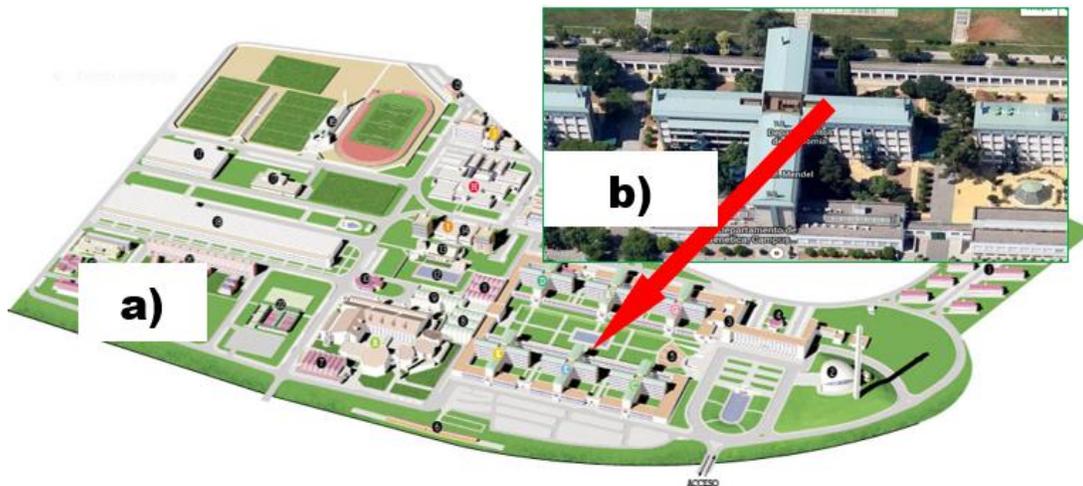
Fueron evaluadas las variables para caracteres agronómicos. Para ello, se tomaron diez plantas elegidas al azar por cada repetición.

Caracteres cualitativos relacionados con la estructura de la planta

- Días de floración: Datos tomados desde la fecha de siembra
- Color de la flor: Datos tomados cuando más del 50% del cultivo estaba florecido (datos color rosado y color blanco).
- Tipo de porte: confirmación del carácter (erecto y semi erecto).
- Tipo de vaina: confirmación del carácter (vainas simple y doble vaina).

### **4.2. Procedimiento de laboratorio**

Para evaluar la variabilidad de marcadores moleculares de garbanzo asociados a caracteres de interés agronómico, se realizó en el Campus universitario de Rabanales de la Universidad de Córdoba (a), en el edificio 7 (C5) Gregol Méndez segunda planta en el departamento de genética, Córdoba España. (b). El cual se localiza con las siguientes coordenadas geográficas. 37° 54' 48.64" N, 4° 43'17.68" O. (Figura.5).



**Figura.5** Campus universitario de Rabanales de la Universidad de Córdoba, España

### **Entradas utilizadas**

Las entradas utilizadas fueron 50 líneas de *C. arietinum* L, se obtuvieron en el banco de germoplasma del instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera,

Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), procedentes de diferentes países y regiones: México (6 entradas), Kanpur India (1), Hyderabad India (8), Marrueco (2), Uganda (1), Jordania (1), Peal de Becerro Jaén (1), Yunquera Málaga (1), Cañete la Real Málaga (1), Padul Granada (1), Ardales Málaga (1), Arahál Sevilla (1), Santisteban del Puerto Jaén (1), Villacarillo Jaén (1), Valverde del camino Huelva (1), Beas Huelva (1), Salamanca (1), URSS (2), Tarazona de la mancha Albacete (1), Afganistán (1), Fuente sauco Zamora (1), IFAPA Córdoba (2), para un total de 50 entradas.

### **Siembra de Garbanzo en cámara de cultivo**

La siembra de las semillas, se realizó en cámara, el día 20 de Enero del año 2015, bajo sustrato perlitas haciendo uso de masetas de tamaño mediano, colocando 2 semillas por masetas, etiquetadas especificando el número de entrada y fecha de siembra, para su posterior identificación, colocadas en cámara de cultivo, en laboratorio de manera controlada.

### **Extracción de ADN en plantas de Garbanzos.**

Para la extracción de ADN (Ácido desoxirribonucleico) en las plantas de garbanzos, se realizó siguiendo los protocolos: Método DNAzol (ADN genómico) y el método CTAB+DTT (Bromuro de hexadeciltrimetilamoni + Ditiotreitol); utilizando geles de agarosa al 2.5% y geles de Acrilamida al 2%.

Las muestras se cargaron en geles de acrilamida no desnaturalizada al 10% (C= 2.67) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

### **4.3. Procedimiento en Campo**

El estudio en campo para la descripción de caracteres agronómicos (inicio de floración, color de la flor y porte) de las distintas entradas de garbanzos cultivados, se realizó en el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) (a), ubicado en Avda. Menéndez Pidal s/n, coordenadas geográficas 37° 51' 20.72" N, 4° 48' 03.17" O. (b)



**Figura.6.** Ubicación del Estudio en campo

#### **4.4. Procesamiento y Análisis de la información**

Para el análisis de variación alélica en los marcadores:

Los productos de amplificación de los marcadores GAMG7922, CY17, TAI42, GAA47 y FM5 se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa MetaPhor® (Cambrex Bio Science, Rockland,) al 2.5% en TBE 1x (7.5 g de agarosa en 250 ml de tampón). Los productos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta con el programa Kodak 1D Image Análisis 3.6 software.

En el caso de los marcadores CY17 Y GAM7922 se comparó la altura de banda o presencia o ausencia de una o dos bandas entre los parentales femenino (alelo a) y masculino (alelo b), utilizando el programa Kodak 1D Image Analysis Software 3.6. La presencia del peso molecular de cada banda hizo ver las líneas que poseen el alelo de resistencia o susceptibilidad de cada uno, observando para el marcador CY17 bandas con un peso molecular de 170 (Resistentes) y bandas de 180 (susceptibles).

Para el marcador GAM7229 se observó bandas con peso molecular de 290 y 300. En los RAPDs se consideró la presencia (1) o ausencia (0) de banda utilizando también el programa Kodak 1D Image Analysis Software 3.6.

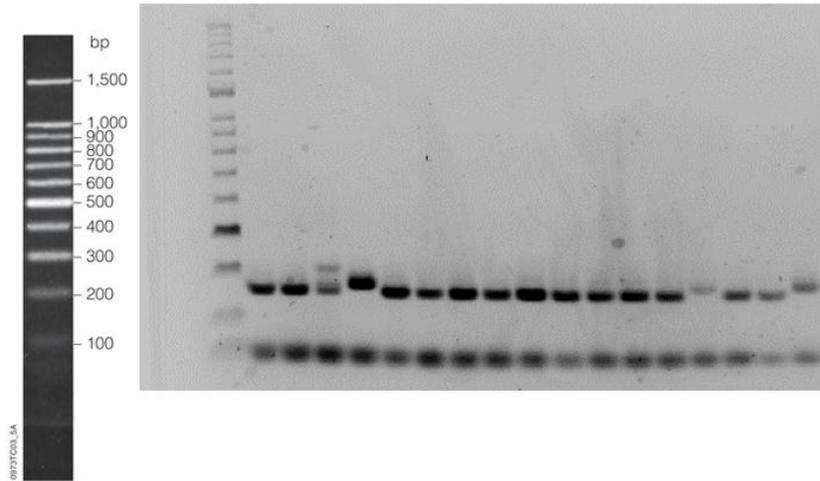
Para el análisis de variación alélica asociada a caracteres de interés se utilizó el programa estadístico NTSYS agrupando los datos en un dedrograma.

En los datos cualitativos (color de flor, tipo de vaina, floración y porte), para la prueba estadística se utilizó el programa estadístico SPSS versión 23, mediante tablas de contingencia basada en Chi-cuadrado.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Dado el procedimiento protocolario, tanto de laboratorio como de campo en la Universidad de Córdoba (UCO) y acorde con los objetivos previamente fijados en esta investigación, se obtuvieron los siguientes resultados:

### 5.1. Variación alélica para marcadores moleculares asociados a *Fusarium oxysporum* (GAGM7922) y *Ascochyta rabiei* (CY17).



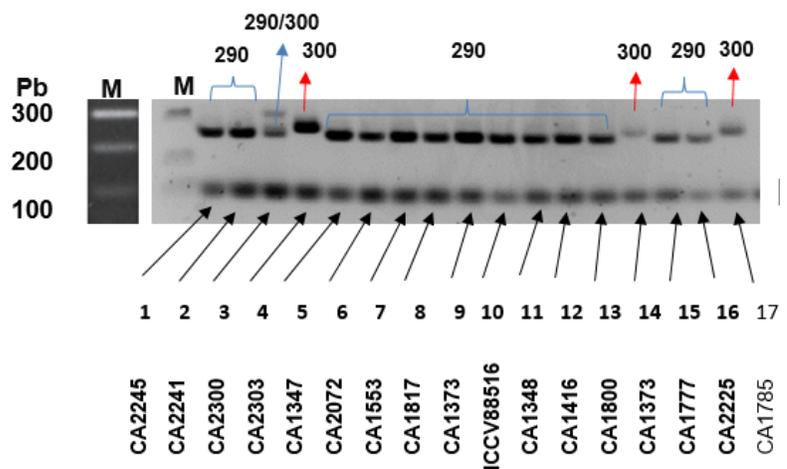
**Figura. 7.** Marcador Hyperladder 50 pb y GAGM7922.

### Marcador molecular GAGM7922 asociado a *Fusarium oxysporum*

Resultado de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Marcador GAGM7922

PCR número 1:

**Pb:** Pares de base, **M:** Marcador molecular, Bandas con peso molecular de 290 pares de bases son líneas resistentes a *F. oxysporum*. Bandas con peso molecular de 300 pares de bases son susceptibles a *F. oxysporum*. Teniendo como resultado en la PCR número uno 14 líneas de alelos resistentes, tres líneas susceptibles y una línea presentó ambos alelos.



**Figura 8:** PCR 1 con marcador GAGM7922

## PCR número 2:

**Pb:** Pares de base, **M:** Marcador molecular, Bandas con peso molecular de 290 pares de bases son líneas resistentes a *F. oxysporum*. Bandas con peso molecular de 300 pares de bases son susceptibles a *F. oxysporum*. Teniendo como resultado en la PCR número dos, 19 líneas resistentes y tres líneas susceptibles.

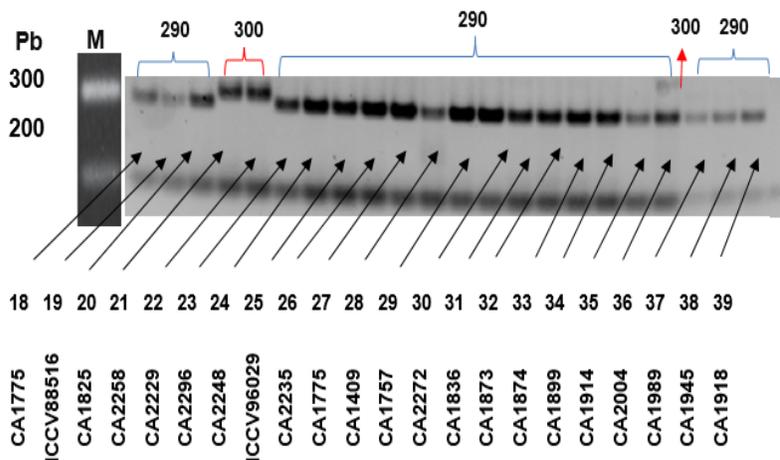


Figura 9. PCR 2 con marcador GAGM7922

## PCR número 3:

Gel de agarosa representativos donde muestra los productos de amplificación de reacciones en la cadena de polimerasa (PCR), con marcador de peso molecular Hyperlader 50 Pb (pares de base). Teniendo como resultado en PCR número tres. 4 líneas resistentes (pb 290) y 3 líneas susceptibles (300) de peso molecular.

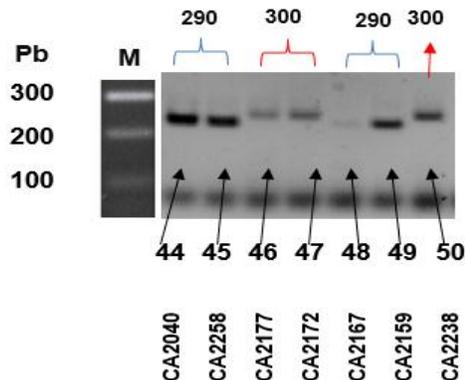


Figura 10. PCR 3 con marcador GAGM7922

**Datos no vistos en el perfil de amplificación:** 3 que corresponden a las líneas 2149, 2064, 2055.

## Resultados generales de variación alélica para marcador CAMG7922.

De las 50 líneas evaluadas para ver la resistencia o susceptibilidad de *Fusarium Oxysporum* tanto en laboratorio como en campo obtenidos en las prospecciones fitopatológicas realizadas en cada unidad experimental de garbanzo situadas en el centro de investigación Alimentaria y de la producción ecológica (IFAPA), Córdoba España, (Denominadas CA2245, CA2241, CA2300, CA1347, CA2072, CA1553, CA1817, CA1375, CA1443, CA1348, CA1416, CA1800, CA1373, CA1777, CA2225, CA1785, CA2201, ICCV88516, CA825, CA2258, CA2229, CA2296, CA2248,

ICCV96029, CA2235, CA1775, CA1409, CA1757, CA2272, CA1836, CA1873, CA1874, CA1899, CA1914, CA1914, CA2004, CA1989, CA1945, CA1918, CA2154, CA2153, CA2149, CA2064, CA2040, CA2194, CA2177, CA2172, CA2167, CA2159 y CA2238).

Se determinó que no hubo variabilidad alélica, ya que se observó en campo que 42 líneas fueron resistentes a *F. oxysporum*, solo siete líneas resultaron susceptibles a dicha enfermedad y una línea no se logró obtener datos por muerte de la planta, para un total de 50 líneas; donde la mayoría de estas fueron resistentes a una de las enfermedades más importantes en el garbanzo como es Fusariosis.

Mediante el empleo de los protocolos FOC-PCR (Gasgo & Jiménez, 2003), respectivamente, 41 líneas presentaron el alelo de resistencia, dichas líneas tuvieron un peso molecular de (290) pares de bases (pb). Adicionalmente, se confirmó por medio del protocolo de PCR específicamente de (FR-PCR) desarrollado por (Bogale, 2007) siete líneas son susceptible a *F.oxysporum* con un peso molecular de (300pb) pares de base, las líneas fueron: (CA2303, CA1373, CA1785, CA2258, CA2177, CA2172 y CA2238).

De todas las líneas estudiadas, solo una línea presentó ambos alelos tanto de resistencia y susceptibilidad con dos pesos moleculares de 290 y 300 pares de bases (pb), la cual fue la línea CA2300, resultando está en campo resistente a Fusariosis vascular, por tanto se confirma que no hubo variabilidad alélica con respecto a los datos levantados en campo con los analizados en laboratorio.

Resultado de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Marcador CY17 asociado a *Ascochyta rabiei*

#### PCR número 4:

Los productos de amplificación de reacciones en la cadena de polimerasa (PCR), con marcador de peso molecular Hyperlader 50 Pb (pares de base). El resultado en PCR número 4 utilizando marcador CY17, 6 líneas resistentes a *Ascochyta rabiei*, con un peso molecular de (300) pares de base y diez líneas susceptibles a esta misma enfermedad con peso molecular de (310) pb, solo una línea presentó dos alelos de (300 y 310) pb alelos tanto de resistencia y susceptibilidad.

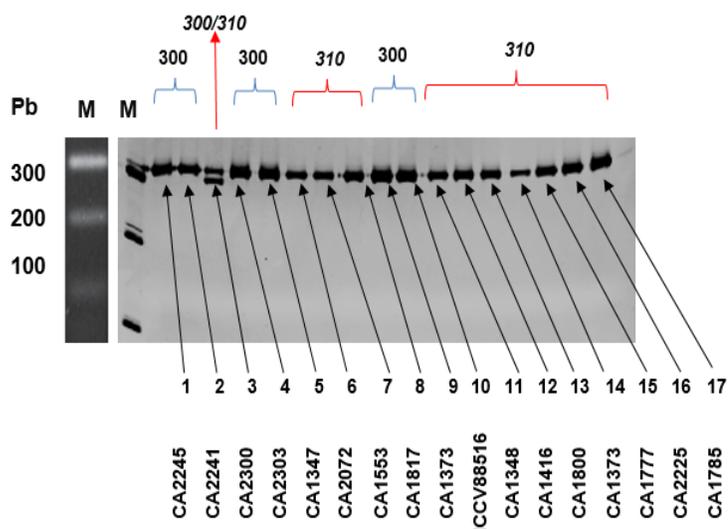


Figura 11: PCR 4 con marcador CY17

### PCR número 5:

**M:** Marcador molecular, Bandas con peso molecular de 300 pares de bases son líneas resistentes a *A. rabiei*. Bandas con peso molecular de 310 pares de bases son susceptibles a *A. rabiei*. Teniendo como resultado en la PCR número 5, catorce líneas resistentes, y tres líneas susceptibles a *A. rabiei*.

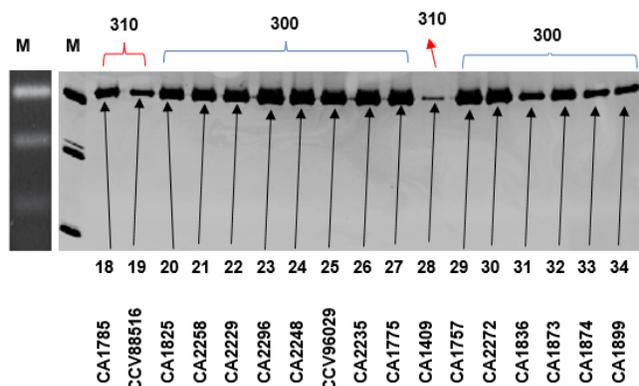


Figura 12. PCR 5 con marcador CY17

### PCR número 6

Resultado de los productos de amplificación de reacciones en la cadena de polimerasa (PCR), con marcador de peso molecular Hyperlader 50 Pb (pares de base). Teniendo como resultado en PCR número 6, utilizando marcador CY17, seis líneas resistentes a *Ascochyta rabiei*, con un peso molecular de (300) pares de base y siete líneas susceptibles a esta misma enfermedad con peso molecular de (310) pb

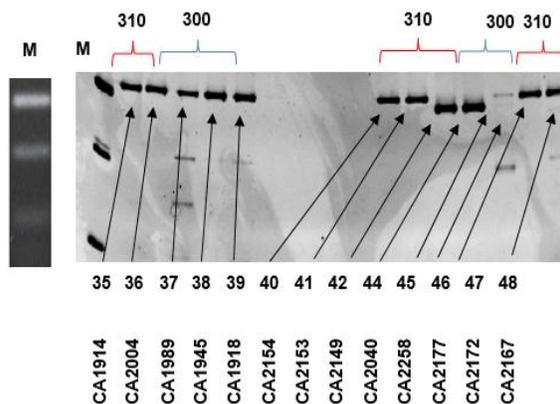


Figura 13: PCR 6 con marcador CY17

**Datos no vistos en la PCR:** 2 entradas no vistas que corresponden a CA2064 y 2159.

En el análisis de los productos de amplificación de la cadena de polimerasa, permitió con los datos de campo, determinar la variabilidad alélica presente en los marcadores GAMG7922 y CY17 asociados a Fusariosis y Rabia, obteniendo 40 líneas resistentes a Fusariosis, 18 líneas resistentes a Rabia, para un total de 58 líneas resistentes en los marcadores asociados a dos enfermedades con mayor importancia en el Garbanzo. Ver tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados generales de laboratorio con alelos resistentes y susceptibles de *Cicer arietinum* asociados a *Fusarium oxysporum* y *ascochyta rabiei*.

Marcadores	Número de entradas	Importancia	Enfermedad	Peso molecular	Alelo
GAM7922	40	0.7061*	<i>F. oxysporum</i>	(290)	Resistente
GAM7922	7	0.8168	<i>F. oxysporum</i>	(300)	Susceptible
GAM7922	1		<i>F. oxysporum</i>	(290/300)	Resistente/ susceptible
GAM7922	2	Datos no vistos en PCR	<i>F. oxysporum</i>	No vistos en PCR	No vistos en PCR
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>				
CY17	18	0.9910*	<i>A. rabiei</i>	(300)	Resistentes
CY17	25	1	<i>A. rabiei</i>	(310)	susceptibles
CY17	1		<i>A. rabiei</i>	(300/ 310)	Resistente/ susceptible
CY17	3		<i>A. rabiei</i>	(300/610)	Resistente/ susceptible
CY17	3	Datos no vistos en PCR	<i>A. rabiei</i>	No vistos en PCR	No vistos en PCR
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>				

Sin dejar de mencionar que las entradas CA2300, 2235, 1775, y 1757 presentaron niveles de polimorfismo alto, siendo su amplificación en la PCR, de dos alelos en cada línea, es decir, que pueden ser líneas resistentes y susceptibles a la vez, ya que poseen dos pesos moleculares diferentes.

Aquellas líneas que presentaron alelos susceptibles respecto al marcador de *F. oxysporum* fueron 7 líneas: CA2303, CA1373, CA1785, CA2258, CA2177, CA2172 y CA 2238. Para el marcador de *A. rabiei* las líneas susceptibles fueron 25 que corresponden a las líneas: CA2245, 2241, 2072, 1553, 1817, 1348, 1416, 1800, 1373, 1777, 2225, 1785, 2201, ICCV88516, 1409, 1872, 1874, 1899, 1914, 2004, 2154, 2153, 2149, 2172 y 2167. Para un total de 32 líneas susceptibles en ambos marcadores.

**Tabla 10.** Resultados generales de variabilidad alélica de *cicer arietinum* asociado a *F. oxysporum* y *A. rabiei* en laboratorio y en campo.

Carácter	Resultados en laboratorio			Resultados en campo	
	N° líneas	Carácter concreto	Peso molecular	Dominante-Resistente A	Recesivo-susceptible a
Enfermedad	40	<i>Fusariosis</i>	290	-----	
Enfermedad	7	<i>Fusariosis</i>	300		-----
Enfermedad	1	<i>Fusariosis</i>	290/300	-----	
Enfermedad	2	<i>Fusariosis</i>	No vistos en PCR	No vistos en PCR	No vistos en PCR
Enfermedad	18	<i>Rabia</i>	300	-----	
Enfermedad	25	<i>Rabia</i>	310		-----
Enfermedad	1	<i>Rabia</i>	300/ 310	-----	
Enfermedad	3	<i>Rabia</i>	300/610	-----	
Enfermedad	3	<i>Rabia</i>	No vistos en PCR	No vistos en PCR	No vistos en PCR

**Carácter visto:** Enfermedad (*Fusariosis* Vascular y *Rabia* del Garbanzo). RAPD: Polimorfismo de ADN basado en una amplificación aleatoria. (A) dominante que corresponde a Peso molecular 290 pb para marcador GAGM7922 y 300 para CY17, (a) alelos recesivos que corresponden a pesos moleculares de 300 para GAGM7922, 310 y 610 para Marcador CY17

Con Respecto a los datos vistos en campo y los datos vistos en el perfil de amplificación de las PCR, se da respuesta al primer objetivo planteado en esta investigación que no hubo variabilidad alélica, puesto que, las líneas que presentaron alelos de resistencia obtenidas por su peso molecular resultaron ser resistentes en campo tanto para *Rabia* y *Fusariosis* vascular, y aquellas líneas susceptibles vistas en la PCR resultaron ser afectadas (susceptibles) también en campo.

Con respecto a aquellas entradas que presentaron ambos alelos de resistencia y susceptibilidad con pesos moleculares de 290 y 300 pares de base, resultaron también ser resistentes en campo, por tanto, se puede decir con certeza que no hubo variabilidad alélica en las 50 entradas estudiadas con respecto a *Rabia* y *Fusariosis*.

## 5.2. Caracteres agronómicos en diferentes entradas de garbanzos (*Cicer arietinum* .L) cultivados.

La respuesta de 51 Líneas de fenotipos diferentes de garbanzos de lugares distintos, los caracteres agronómicos analizados en campo fueron: Porte, Floración, color de flor y tipo de vaina.

**Tabla 11.** Resultados de Porte de la planta en diferentes entradas de Garbanzos.

Carácter	Frecuencia de Líneas	Porcentaje %	Porcentaje válido
Datos no Vistos	3	5.9	5.9
Erecto	2	3.9	3.9
Semi erecto	46	90.2	90.2
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

El carácter semi erecto tuvo gran influencia en las unidades experimentales, explicando la diferencia entre porte semi erecto y erecto un alto porcentaje de la variación de estos caracteres en dicha población (90.2 y 3.9% respectivamente). Que corresponden a porte semi erecto 46 líneas y porte erecto solamente 2 líneas. Estos resultados se confirma que el porte semi erecto tiene mayor influencia que los de porte erecto, coincidiendo con los resultados evaluados por (Carreras, Rubio, Gil, & Millán, 2013, págs. 145-149) explicando la diferencia entre porte semi erecto y erecto obteniendo alto porcentaje de la variación de estos caracteres en dicha población evaluada con (58 % para porte semi erecto y 56% para porte erecto), siendo el porte semi erecto más influyente.

El porte semi erecto se obtuvo mayor número de líneas que el porte erecto, posiblemente el mayor número de ramificaciones del porte semi erecto puede explicar su efecto positivo sobre ellos, ya que los de porte erecto son más altos y con menor número de ramificaciones, estos resultados coinciden con los obtenidos por (Rubio, Flores, Moreno, Cubero, & Gil, 2004) en condiciones mediterráneas.

**Tabla 12.** Resultados de Periodo de floración en diferentes entradas de Garbanzos.

Periodo	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Precoz	2	3.9	4.4
Intermedio	7	13.7	15.6
Tardío	36	70.6	80.0
Total	45	88.2	100.0
Perdidos	6	11.8	
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100.0</b>	

Con respecto al periodo de floración se observaron diferencias entre fecha de floración tardía y precoz explicando estas diferencias en un moderado porcentaje de

la variación de estos caracteres en las distintas entradas (70.6% para tardías, 13.7% para aquellos garbanzos intermedios y 3.9% para las líneas precoces) (Tabla 13).

Las dos especies precoces fueron de 54 y 56 días que corresponden a las líneas CA1914 y ICCV96029 donde esta última porta el carácter doble vaina. La especie más tardía tuvo un máximo de 77 días correspondiente a la línea CA2194.

**Tabla 13.** Resultados de periodo de floración asociado a color de flor.

Color de la flor	Periodo de Floración			Total
	Precoz	Intermedio	Tardío	
		4.4%		<b>4.4%</b>
Rosada (Desi)	No presentaron	2.2%	24.4%	<b>26.7%</b>
Blanca (Kabulli)	4.4%	8.9%	55.6%	<b>68.9%</b>
	4.4%	15.6%	80.0%	<b>100.0%</b>

Estos resultados evidenciaron que los cultivares de garbanzo tipo Kabulli con el carácter flor blanca son más tardíos que los del tipo Desi (Tabla 16) con una diferencia de 55.6 %, y tipos desi con solo 24.4 %, esto lo afirma (Moyano S. N., 2004) que según estudios realizados en ambientes mediterráneos la floración precoz está asociada con producción, en este caso al final del ciclo de cultivo coincide con un largo periodo de sequía (Siddique KHM, 2003); (Rubio, Flores, Moreno, Cubero, & Gil, 2004).

A diferencia de la entrada CA2194, se confirma que fue uno de los cultivares más tardíos con 77 días y por su carácter flor blanca, pertenece a los garbanzos tipo Kabulli que por lo general son especies más tardías esto también lo confirma (Cobos, y otros, 2004).

**Tabla 14.** Resultados de Carácter agronómico (color de flor) en diferentes entradas de Garbanzos.

Carácter	Frecuencia	Porcentaje %	Porcentaje % válido
Datos no vistos	7	13.7	13.7
Rosado	7	13.7	13.7
Blanco	37	72.5	72.5
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Para el carácter color de flor se obtuvo diferencia entre los dos tipos de garbanzos 72.5% de las líneas evaluadas presentaron color blanco, un 13.7%, color rosado (tabla 17).

Teniendo en total de las 51 líneas evaluadas, 7 líneas con color rosa que pertenecen al tipo desi, y 37 líneas tipo Kabulli con el carácter flor blanca, y 7 datos no obtenidos por muerte de la planta (tabla 14).

Estas 37 entradas de tipo Kabulli también difieren en una serie de características agronómicas, como tolerancia al frío, resistencia a rabia (enfermedad de gran importancia en el cultivo) y hábito de crecimiento erecto son más frecuentes en los garbanzos tipo Kabull esto lo confirma (Moyano S. N., 2004).

### Tipo de Vaina.

Este carácter se evaluó también en las 51 líneas, donde solo la entrada ICCV96029 es portadora del carácter doble vaina. No se observaron diferencias entre doble y simple vaina en todos los caracteres evaluados.

Los genotipos de doble vaina conceden una mayor estabilidad en la producción por planta ya que el porcentaje en plantas con vaina simple es más bajo. De igual manera los genotipos con vainas simples serían más estables por tamaño de semilla esto lo afirma (Siddique KHM, 2003).

El carácter doble vaina, presente en la población ICCV96029, no mostró diferencias en producción respecto a vaina simple, coincidiendo con los resultados de Rubio, Flores, Moreno, Cubero, & Gil, (2004) bajo condiciones mediterráneas.

### 5.3. Variación alélica para marcadores moleculares asociados a caracteres agronómicos (Periodo de Floración, color de flor y porte) en garbanzo.

**Tabla 15.** Resultados de marcador TA142 asociado a periodo de floración en garbanzo.

Resultados en laboratorio			Resultados en campo		
			Dominante A		Recesivo a
Floración	Nº líneas	Peso molecular	Nº líneas	tardío	precoz
Precoz	18	140	2		-----
Intermedio	26	140 / 210	7	-----	
Tardío	5	170 / 230	36	-----	
Datos no vistos	1	No vistos en PCR	6		
<b>Total</b>	<b>50</b>		<b>51</b>		

Tabla de resultados de la variación alélica, marcador TA142 asociado a periodo de floración. (A) alelos dominantes 210 y 230 pb (tardío), (a) alelos recesivos 140 pb (precoz).

En el análisis de QTLs (Loci de rasgos cuantitativos) del perfil de amplificación en PCR con los datos de campo permitió determinar que el marcador TA142 presenta variabilidad alélica siendo este asociado al periodo de floración explicando 44 líneas

precoces y 5 líneas tardías según sus pesos moleculares dominantes y recesivos respectivamente. (Tabla 15).

El periodo de floración determinado por el peso molecular es importante en la predicción de los días que tardará en florar una determinada línea de Garbanzo. El peso molecular 230 y 210 presentó (57.1%) y el peso molecular 140 (56.2%) respectivamente.

En el caso de los datos de campo, utilizando las mismas líneas se obtuvo para líneas precoces solo 2 líneas (CA1914 y ICCV96029), y 43 líneas tardías, explicando de esta manera la variación fenotípica recordando que el fenotipo de un carácter es igual al genotipo más el ambiente, donde el genotipo son los genes o alelos encontrados que pasan de generación en generación, y no el ambiente, explicando que hubo variabilidad en las entradas evaluadas posiblemente debidas al ambiente donde se encontraban, estos resultados lo afirma (Moreno & Solís, 2010, pág. 100) donde dice que la heredabilidad de un carácter depende de la población de partida y del ambiente donde es diferente para cada carácter, para cada especie y para cada población.

Siendo el control genético de fecha de floración bastante discutido, ya que difiere de los genotipos usados como parentales y del ambiente. (Gumber & Sarvjeet, 1996, pág. 295) en ambientes de ciclo largo y en ambientes de ciclo corto, concluyeron que el control era digénico, siendo precocidad recesivo. (Kumar L, 1991, págs. 14-15) Utilizando genotipos precoces, observaron que dicho carácter estaba controlado por un gen mayor.

Se han identificado QTLs (quantitative traits loci) asociados a este carácter indicándonos que puede haber varios genes que controlan la fecha de floración. Estos se han localizado en los GL4 (QTLDF1) y GL3 (QTLDF2) del mapa genético del garbanzo. Mediante esta investigación se confirma también que el marcador más estrechamente ligado al QTLLG3 fue el microsatélite TA142 mientras que el GAA47 se encuentra en el "pico" del QTLLG4 (Cobos, y otros, 2007, págs. 33-42).

Esta misma variabilidad alélica presente lo afirma (Summerfield & Roberts, 1988, pág. 329) donde dice que floración es un carácter muy variable depende de la estación, de la fecha de siembra y de la altitud y latitud. E igual lo confirma (Robertson, 1997, págs. 309-319) donde escribió que los genotipos de garbanzo muestran una respuesta diferencial al fotoperiodo y a la temperatura, encontrándose genotipos en los que la fecha de floración está influenciada por la respuesta al fotoperiodo y por la temperatura, sin embargo, en otros está determinada únicamente por el fotoperiodo (Cubero, 1987, págs. 35-66).

En general, de 50 líneas evaluadas con marcador TA142 asociado al periodo de floración en garbanzo, respectivamente se observó variabilidad alélica para fecha de floración con respecto a los datos levantados en campo.

**Tabla 16.** Resultados de marcador GAA47 asociado a color de flor en garbanzo.

Resultados en laboratorio			Resultados en campo		
Marcador	N° líneas	Peso molecular	N° líneas	Dominante A	Recesivo a
				Blanco	Rosado
GAA47	35	170	<b>36</b>	-----	
GAA47	7	180	7		-----
GAA47	2	170 /180	1	-----	
GAA47	6	No vistos en PCR	7		
<b>Total</b>	<b>50</b>		<b>51</b>		

En las 50 líneas evaluadas de garbanzo, los productos de amplificación de reacciones en la cadena de polimerasa (PCR) fueron: pesos moleculares 170 pb (A) dominante y peso molecular de 180 pb (b) recesivo.

De acuerdo a los resultados en campo y en laboratorio, se confirma que no hubo variabilidad para marcador GAA47 asociado a carácter agronómico color de flor, donde se obtuvo un resultado de 37 líneas con peso molecular de (170) pares de base que representa el color blanco (garbanzo tipo Desi) de los cuales estas mismas líneas portaron el carácter blanco en campo, 7 líneas con peso molecular de (180) pb color rosa que representa los garbanzos tipo Kabulli tampoco presentaron variabilidad en campo obteniendo estas el mismo carácter.

Dos líneas presentaron ambos alelos dominante (color blanco) y recesivo (color rosa) con peso molecular (170 y 180) corresponden a las entradas CA2300 y CA1409. Donde estas resultaron ser garbanzos tipo Desi. Para un total de 37 líneas con carácter blanco y solo 7 con el carácter flor rosada.

**Tabla 17.** Resultados de marcador FM5 asociado a Porte en garbanzo.

Resultados en laboratorio			Resultados en campo		
Marcador	N° líneas	Peso molecular	N° líneas	Dominante A	Recesivo a
				Semi erecto	Erecto
FM5	8	No vistos en PCR	3		
FM5	2	300	2		-----
FM5	40	<b>320</b>	46	-----	
<b>Total</b>	<b>50</b>		<b>51</b>		

Utilizando el marcador FM5 asociado a porte en las plantas de garbanzos se determinó que no hubo variabilidad con respecto a los datos levantados en campo, siendo para peso molecular 300 pb (recesivo) dos líneas con porte erecto las cuales portaron este carácter también en campo.

Con peso molecular de 320 pb (Dominante) 40 líneas resultaron ser semi erectos, de donde estas líneas se observó que el carácter en campo de 40 garbanzos portó este mismo carácter de las mismas líneas evaluadas, coincidiendo con el perfil de amplificación en la PCR, estos resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los resultados evaluados en el año 2015 por (Ali L. , 2015, pág. 43). Detectando un nuevo QTL/gen para hábito de crecimiento en el CaLG1 de garbanzo donde se evaluó para porte la población de líneas recombinantes de garbanzo (RIP-9) que difieren para porte (erecto vs semi erecto), presentando polimorfismo iguales los marcadores situados en GL1 y 3 y se confirmó la asociación entre los marcadores y el porte en campo mediante análisis de regresión simple.

De esta manera se confirma que no hubo variabilidad alélica en las líneas evaluadas con respecto al marcador asociado a porte en el garbanzo.

Con respecto a los datos perdidos tanto en campo y en laboratorio se descartaron estas líneas por que no se confirmó el carácter.

## VI. CONCLUSIONES

De manera general, y acorde a los resultados obtenidos, se confirma que no hubo variabilidad alélica comparando datos en campo y en laboratorio, en las 50 líneas evaluadas, para los marcadores GAGM7922 y CY17, asociados a *Fusarium oxysporum* y *Ascochyta rabiei*.

Al considerar la resistencia de las líneas a *Fusarium* y *Ascochyta Rabiei* como un carácter cuantitativo y realizar análisis por medio de PCR se confirma que el marcador (GAM7922) más estrechamente ligado a la resistencia a fusariosis presentó 40 líneas resistentes, 7 líneas susceptibles. Para el marcador CY17 asociado a Rabia del garbanzo 18 líneas resistentes y 25 líneas susceptibles, para un total de 58 líneas resistentes y 32 susceptibles en ambos marcadores.

En los caracteres agronómicos (porte, periodo de floración, color de flor y tipo de vaina), se obtuvo 2 líneas con el carácter porte erecto, y 46 líneas con carácter semi erecto, siendo el carácter semi erecto el que más pre dominó. Para el periodo de floración solo se obtuvieron 2 líneas precoces (50 a 59 días), 7 líneas en rango intermedios (60 a 70 días), y 45 líneas tardías (Rangos de 70 días a más). Obteniendo en campo más líneas tardías que precoces.

De los garbanzos tipo Kabulli (Carácter flor blanco), 37 líneas presentaron este carácter, y para garbanzos tipo Desi solo 7 líneas presentaron el color rosa, siendo tipo Desi los que más pre dominaron en la población evaluada.

Para el carácter vaina simple se observaron 50 líneas y solo una línea presentó el carácter doble vaina.

Con respecto a la variabilidad alélica asociada a los caracteres agronómicos, se confirma que hubo variabilidad alélica solo para el marcador FM5 asociado a los días de floración con datos obtenidos en campo asociados a los datos obtenidos en el perfil de amplificación en las PCR realizadas.

Para los marcadores asociados a color de flor y porte en el garbanzo no hubo variabilidad alélica en las líneas estudiadas en campo y en laboratorio cuyos datos coincidieron con los vistos en la PCR.

## **VII. RECOMENDACIONES**

A universidad URACCAN (Laboratorio de Suelo y agua):

- ✓ Probar el protocolo aplicado en el cultivo de garbanzo, en especies cultivadas en Nicaragua: Frijol, maíz y arroz.
- ✓ Asociar características agronómicas de especies de interés en Nicaragua con la resistencia al cambio climático.
- ✓ Determinar marcadores moleculares asociados con la mejora genética de las especies de interés en Nicaragua.

## VIII. LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agricultura, O. d. (2011). [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*/S](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/S). Obtenido de [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*/S](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/S).
- Ali L, R. J. (2002). A new QTL controlling growth habit in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Vlth International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG)*. Hyderabad (India).
- Ali, L. (2014). Desarrollo de líneas casi isogénicas para fecha de floración en garbanzo y búsqueda de genes candidatos . *Búsqueda de genes asociados a caracteres de interés agronómico del garbanzo (Cicer arietinum L.)*, 64.
- Ali, L. (Mayo de 2015). Tesis Doctoral. *Búsqueda de genes candidatos asociados a caracteres de interés agronómico en garbanzo (Cicer arietinum L.)*, 43. Córdoba, Andalucía, España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- Argikar, G., & D'Cruz, R. (1959). *Genetic studies in gram. J. Indian Bot. Soc.*
- Aryamanesh N, N. M. (2010). *Mapping a major gene for growth habit and QTLs for ascochyta blight resistance and flowering time in a population between chickpea and Cicer reticulatum. Euphytica.*
- Bogale, M. W. (2007). Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. Sevilla: Secretaría de publicaciones universidad de Córdoba.
- Candolle, D. (1883). Origine des plantes Cultivees. *Origen de las Leguminosas*, 258.
- Carreras, J., Rubio, J., Gil, J., & Millán, T. (2013). Short communication. Genotype x environment interaction analysis in two chickpea RIL population. *Establecimiento de bases genéticas para la mejora del garbanzo (Cicer arietinum L.) en Argentina*, 145-149.
- Castro, P., Rubio, J., & Millán, T. y. (2000). DESARROLLO DE LÍNEAS CASI-ISOGÉNICAS DE GARBANZO PARA RESISTENCIA A *Fusarium oxysporum* sp. *cicerisRAZA. Actas de horticultura*, 144.
- Chongo G, B. S. (2002). *Occurrence of Ascochyta blight and other diseases in Saskatchewan in the 2001 drought year. Can. Plant Dis Surv.*
- Cobos, M., Iruela, M., Rubio, J., Millán, T., Cubero, J., & Gil, J. (2004). Genetic analysis of flowering time in a chickpea Inter.-specific cross (*Cicer arietinum* L. x *C. reticulatum* Lad.). *5th European Conference on Grain Legumes, AEP*, (pág. 263). Dijon France.

- Cobos, M., Rubio, J., Fernández-Romero, M., Garza, R., Moreno, M., & Millán, T. G. (2007). Genetic analysis of seed size, yield and days to flowering in a chickpea recombinant inbred line population derived from a Kabuli x Desi cross. 33-42.
- Cubero, J. (1987). Morphology of chickpea. En: MC Saxena, KB Singh (eds). 35-66.
- Gasgo, J., & Jiménez, L. (2003). Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. 46.
- Gaur PM, G. C. (2007). *Breeding achievements. Chickpea breeding and management*. Publicaciones UCO. Córdoba.
- Gaur, P., Gowda, C., Knights, E., Warketin, T., Acikgöz, N., Yadav, S., & Kumar, J. (2007). Breeding achievements. En: SS Yadav, R Reeden, W Chen, B Sharma (eds) *Chickpea breeding and management*. 391-410.
- Geervani, P. (1987). *Utilization of chickpea. En: MC Saxena y. KB Singh (eds) The chickpea CABI, UK*. Madrid, Sevilla.
- Gil, J. (1996). *Variability of some physico-chemical characters in Desi and Kabuli chickpea types. Journal Science Agriculture*. Madrid: secretariado de publicaciones UNIVERSIDAD DE SEVILLA.
- Gumber, R., & Sarvjeet, S. (1996). *Genetics of flowering time in chickpea: a preliminary report*.
- Haware, M., Nene, & Natarajan, M. (1996). *Survival of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris in the soil in the absence of chickpea Phytopathol Mediterr*.
- Hovav, R., Upadhyaya, K., Beharav, A., & Abbo, S. (2003). *Major flowering time gene and polygene effects on chickpea seed weight. Plant Breeding*.
- Huyghe, C. (1998). *Genetics and genetic modifications of plant architecture in grain legumes: a review. Agronomie*.
- Iruela M, R. J. (2007). Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. . *Theor Appl Genet.* , (págs. 104:643-651).
- Jensen, H. (2003). *How can increased use of biological N2 fixation in agriculture benefit the environment? Plant and Soil*. Madrid.
- Kumar L, A. P. (1991). *Basis of selection in chickpea. International Chickpea*.
- Ladizinsky, A. (1796). The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica*. 211.
- M, M., & Cubero, J. (1978). *Variation in Cicer arietinum L. Euphytica*. Sevilla.

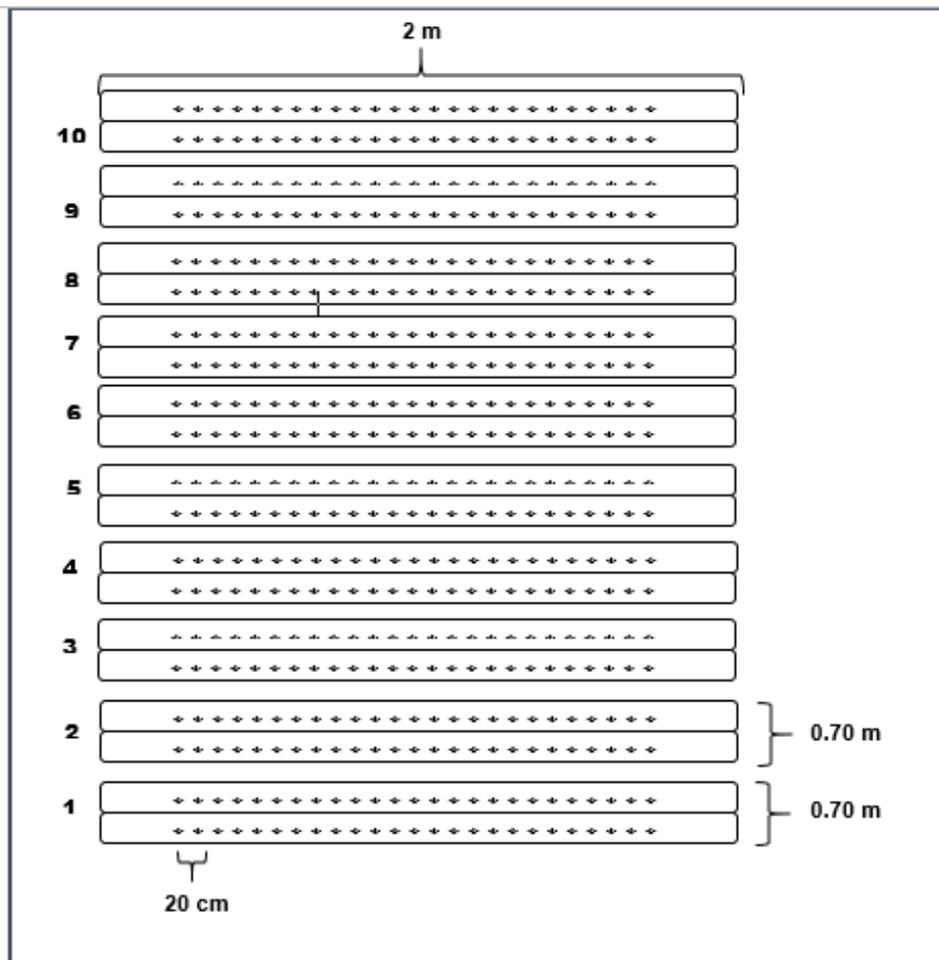
- Maesen, V. d. (1987). *Origin, History and Taxonomy of Chickpea*. En: MC. Madrid: Mundi.
- Manchada G, G. N. (2008). *Salinity and its effects on the functional biology of legumes*.
- Mandel. (1971). *A new of variance model for non-additive data*. *Technometrics*.
- Millán, T., Clarke, H., Siddique, K., G. P., Kumar, J., Gil, J., . . . Winter, P. (2006). *Chickpea molecular breeding: new tools and concepts*. *Euphytica*. Cordoba, Andalucía, España.
- Moreno, F., & Solís, I. (2010). *Mejora Vegetal para ingeniería agronómica*. Sevilla.
- Moyano, N. (2004). *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*. Madrid, España: Mundi.
- Moyano, N. (2004). *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*. Madrid, España: Mundi.
- Moyano, S. N. (2004). *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*. Granada: Mundi-Prensa Libros, s.a.
- Muehlbauer, F., & Singh, K. (1987). Genetics of Chickpea. *Genetica*, 99.
- Muehlbauer, F., & Singh, K. (1987). *Genetics of Chickpean*.
- Nakkoul, W. y. (1985).
- Patil, J. (1959). *Inheritance study in gram*. *Curr. Sci*.
- Robertson, L. (1997). Morphological variation in wild annual Cicer species in comparison to the cultigen. *Euphytica*. *Genetic*, 309.
- Rubio J, F. F. (1998). *Effect of the gene for double pod in chickpea on yield, yield components and stability of yield*. *Plant Breeding*. Field Crops Research.
- Rubio, J., Flores, F., Moreno, M., Cubero, J., & Gil, J. (2004). *Effects of the erect/bushy, single/double pod and late/early flowering genes on yield and seed size and their stability in chickpea*. Córdoba, Andalucía.
- Sabaghpour SH, K. J. (2003). *Inheritance of growth vigour and its association with other characters in chickpea*. *Plant Breeding*.
- Salmeron, C. (2005). Las leguminosas. 44-46.
- Salmerón, L. (2014). Marcadores moleculares del grupo de ligamiento 2 donde se ubican muchos de los genes de resistencia a fusariosis, en concreto la región

próxima al gen de resistencia a raza 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Genes Resistentes en garbanzos*, 28.

- Santander, D. (2014). SATURACIÓN DEL MAPA GENÉTICO DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) EN POBLACIONES RILs DERIVADAS DE CRUZAMIENTOS INTRAESPECÍFICOS. *Leguminosas*, 3-17.
- Siddique KHM, L. S. (2003). *Cool season grain legumes in dryland Mediterranean environments of Western Australia: Significance of early flowering*. En: NP Saxena (ed) *Management of Agricultural Drought*. Science Publishers, Enfield, USA.
- Singh L, S. V. (1995). Stability of yield and its components in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Tropical Agriculture* , 13:191-197.
- Soler, L.-Y., Arnulf, G., & Solis, A. (2000). *The cradle of agriculture*. Science. Alemania: Agricolor Ediciones.
- Subbarao GV, J. C. (1995). *Strategies for improving drought resistance in grain legumes*. *Critic Rev Plant Sci*.
- Summerfield, R., & Roberts, E. (1988). *Photo-thermal regulation of flowering in pea, lentil, faba bean and chickpea*. En RJ Summerfield (ed) *World Crops: Cool Season Food Legumes*, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Vashney. (2013). *Draft genome sequence of kabuli chickpea (Cicer arietinum) provides a resource for trait improvement*. *Nature Biotechnology*.
- Vavilov, P. (1926). *Studies on the origin of cultivated plants*. Leningrad.
- Vega, J. d. (2009). *El cultivo del garbanzo diseño para una agricultura sostenible*. España.
- Verma, M., & Sandhu, J. (1990). *Crossability studies in different species of Cicer (L)*. *Crop Improv*. Universal.
- Winter, P., Benko-Iseppon, A., Hüttel, B., Ratnaparkhe, M., Tullu, A., Sonnante, G., . . . Muehlbauer, F. (2000). *A linkage map of the chickpea (Cicer arietinum L.) genome based on recombinant inbred lines from a C. arietinum x C. reticulatum cross: localization of resistance gene for fusarium wilt races 4 and 5*. *Theor Appl Genet*.

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Diseño de establecimiento en campo de una réplica.

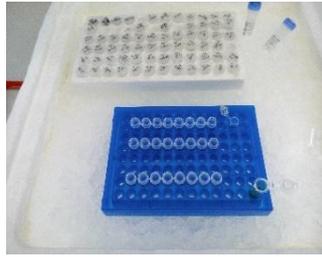
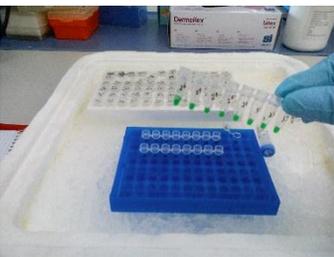
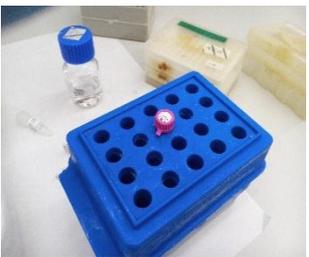




**Anexo 3. Fotos cámara de Cultivo**



**FOTOS LABORATORIO**



**FOTOS CAMPO**



#### Anexo 4: Códigos de entradas y lugares de procedencias de las semillas.

NS	Líneas	Procedencia	Donante
1	CA1347	La Piedad Ensayo de Garbanzos-México	
2	CA1348	La Piedad Ensayo de Garbanzos-México	
3	CA1373	La Piedad Ensayo de Garbanzos-México	
4	CA1375	La Piedad Ensayo de Garbanzos-México	
5	CA1409	La Piedad Ensayo de Garbanzos-México	
6	CA1416	La Piedad Ensayo de Garbanzos-México	
7	CA1443	Hellenie Agricultural Research Institute	
8	CA1553	Kanpur (India)	
9	CA1757	Iran	Colección Murthy
10	CA1775	Marruecos	Colección Murthy
11	CA1777	Uganda	Colección Murthy
12	CA1785	Marruecos	Colección Murthy
13	CA1800	Jordania	Colección Murthy
14	CA1817	Hyderabad (India)	ICRISAT 2645
15	CA1825	Hyderabad (India)	ICRISAT 4939
16	CA1836	Hyderabad (India)	ICRISAT 4983
17	CA1873	Hyderabad (India)	ICRISAT 74803
18	CA1874	Hyderabad (India)	ICRISAT 74807
19	CA1899	Hyderabad (India)	ICRISAT
20	CA1914	Hyderabad (India)	ICRISAT
21	CA1918	Hyderabad (India)	ICRISAT
22	CA1945	Peal de Becerro (Jaén)	
23	CA1989	Yunquera (Málaga)	
24	CA2001	Ventas del Carrizal (Jaén)	
25	CA2004	Cañete la Real (Málaga)	
26	CA2040	Ardales (Málaga)	
27	CA2064	Arriate (Málaga)	
28	CA2072	Arahal (Sevilla)	
29	CA2149	Santisteban del Puerto (Jaén)	
30	CA2153	Villacarrillo (Jaén)	
31	CA2154	Valverde del Camino (Huelva)	
32	CA2159	Beas (Huelva)	
33	CA2167	Salamanca	
34	CA2172	URSS	ICARDA (ILC-202)
35	CA2177	URSS	ICARDA (ILC-3279)
36	CA2194	Tarazona de la Mancha (Albacete)	
37	CA2201		Delegación Provincial de Agricultura
38	CA2225	Afganistan	ICARDA (ILC-2912)
39	CA2229		Inst. Nacional Vavilov (leningrado)
40	CA2235		Inst. Nacional Vavilov (leningrado)
41	CA2238	Fuentesauco (Zamora)	
42	CA2241		A. Trapero.PV ETSIAM (PV-57)
43	CA2245		A. Trapero.PV ETSIAM (PV-53)
44	CA2248		A. Trapero.PV ETSIAM (PV-47)

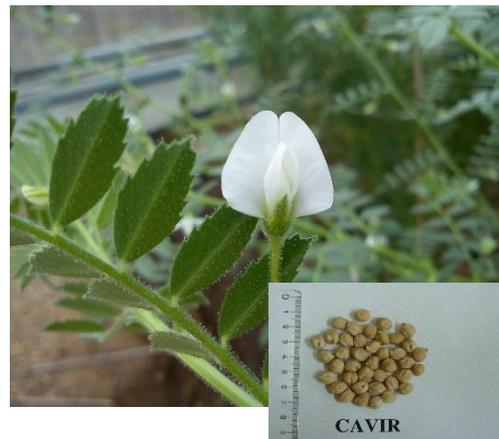
45	CA2258		A. Trapero.PV ETSIAM (PV-59)
46	CA2272		A. Trapero.PV ETSIAM (PV-59)
47	CA2296		ICARDA (FLIP 84-15)
48	CA2300		ICARDA (FLIP 85-1)
49	CA2303		ICARDA (FLIP 85-5)
50	ICCV88516		

**Anexo 5. Formato para levantar datos en laboratorio**

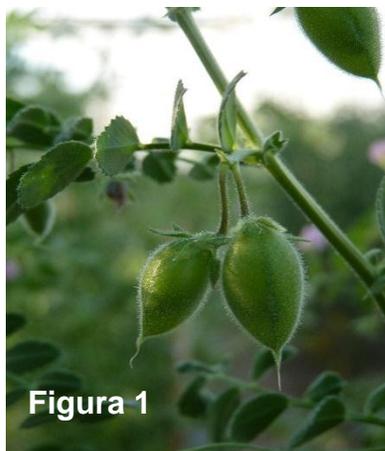
**N° GEL:** \_\_\_\_\_ **FECHA:** \_\_\_\_\_  
**PROYECTO:** \_\_\_\_\_ **ARCHIVO:** \_\_\_\_\_  
**MATERIAL:** \_\_\_\_\_  
**TIPO DE EXTRACCIÓN:** \_\_\_\_\_  
**TIPO DE GEL:** \_\_\_\_\_  
**% RESOLVING:** \_\_\_\_\_ **%STANKING:** \_\_\_\_\_

N°	MUESTRA	CARGA	OBSERVACIONES
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			

**Anexo 6: Garbanzos Tipo Desi y tipo Kabulli encontrados en las entradas.**



**Carácter doble vaina y vaina simple en Garbanzos**



El fruto es una vaina bivalva, en el garbanzo se pueden presentar el carácter doble vaina (figura 1) y Vaina simple (Figura 2) es un carácter normal y más encontrado en cultivos de garbanzos.

## Anexo 7. Glosario de Términos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNasas	Ribonucleasa
ADNasas	Endonucleasa
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamoni
CAGM7922	Marcador de Fusarium oxysporum
CY17	Marcador de Ascochyta rabiei
DTT	Ditiotreitol
DCA	Diseño completamente al azar
dNTPs	Desoxirribonucleicos trifosfato
DNAzol	ADN genómico
ETSIAM	Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos y de Montes
FM5	Marcador de porte en garbanzo
GAA47	Marcador de floración en garbanzo
H <sub>2</sub> O	Agua
H	Hidrogeno
ICRISAT	Instituto internacional de cultivos para zonas tropicales semiáridas
IFAPA	Instituto de formación
M	Molaridad
Mb	Megabyte
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
Ns/μL	Concentración de muestras por micro litros
NGS	Programa de secuencia de ADN
N <sub>2</sub>	Nitrógeno líquido
STMS	Sequence Tagged Microsatellite Site
STS	Sequence Tagged Site
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Potencial de hidrogeno
Pm	Peso molecular
RAPDS	Polimorfismo de ADN basado en una amplificación aleatoria
RILS	Líneas recombinantes
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restricción de distinta longitud
rpm	Revoluciones por minuto
TAQ	Polimerasa termoestable
TA142	Marcador de floración
TBE	Disolución tampón formado por tris, borato y EDTA.
UCO	Universidad de Córdoba
μL	Micro litro
QTL	Loci de rasgos cuantitativos