



TESIS DOCTORAL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Utilización de variedades primitivas en la ampliación
de la base genética de *Vicia faba* L.**

Doctorando:

M^a Dolores Ruiz Rodríguez

Tesis dirigida por:

Dra. Carmen M^a Ávila Gómez

Dr. José Ignacio Cubero Salmerón

Córdoba, 2015

TITULO: *Utilización de variedades primitivas en la ampliación de la base genética de Vicia faba L.*

AUTOR: *María Dolores Ruiz Rodríguez*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: *Utilización de variedades primitivas en la ampliación de la base genética de Vicia faba L.*

DOCTORANDO/A: M^a Dolores Ruiz Rodríguez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El presente trabajo se ha realizado dentro del Programa de Doctorado “Biociencias y Ciencias Agroalimentarias” de la Universidad de Córdoba. Previamente, la doctoranda realizó el máster “Biotecnología Molecular, Celular y Genética” en el 2011.

La presente tesis doctoral está concluida y es apta para su defensa. El trabajo ejecutado ha cubierto adecuadamente cada uno de los objetivos que se plantearon.

Fruto del trabajo de la presente tesis se ha publicado un artículo en una revista científica a nivel internacional:

- **Ruiz-Rodríguez MD**, Avila CM, Torres AM, Fuchs J, Schubert I (2014). Anchoring of genetic linkage maps to the chromosome complement of *Vicia faba L.* *Molecular breeding* 33 (3): 743-748.

Participaciones en congresos:

- Avila C, Satovic Z, Madrid E, Ocaña S, **Ruiz MD**, Cubero JI, Torres AM (2012). Genomics research for faba bean (*Vicia faba L.*) breeding applications. VI International Conference on Legume Genetics and Genomics (VI ICLGG). Ponencia invitada. Hyderabad, India.
 - C.M. Avila, **M.D. Ruiz-Rodríguez**, S. Ocaña-Moral, J.I. Cubero and A.M. Torres (Octubre 2013). Molecular approaches for the identification and validation of QTLs for Orobanche spp. resistance in faba bean. International workshop “Building a new research alliance to reclaim Faba bean production area abandoned to Orobanche” en Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II & National Institute of Agricultural Research of Morocco. Ponencia invitada. Rabat, Marruecos.
-

La doctoranda ha colaborado en otros trabajos en nuestro grupo y como resultado ha participado como autora en un artículo científico:

- Gutiérrez N, Palomino C, Satovic Z, **Ruiz-Rodríguez MD**, Vitale S, Gutiérrez MV, Rubiales D, Kharrat M, Amri M, Emeran A, Cubero JI, Atienza SG, Torres AM, Avila CM. 2013. New QTLs for *Orobanche spp.* resistance in faba bean: Identification and validation across different environments. Mol Breeding 32: 909-922.

-

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 30 de JUNIO de 2015

Firma del/de los director/es



Fdo.: Carmen M. Ávila Gómez



Fdo.: J. Ignacio Cubero Salmerón

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar dar las gracias a mis directores de tesis Carmen Ávila y José Ignacio Cubero, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia en el mundo de la investigación. A Carmen, por su paciencia, disponibilidad y ayuda, por orientarme en este trabajo y por darme los mejores consejos. A José Ignacio, por estar siempre disponible, por sus aportaciones, conocimientos, su simpatía y amabilidad continua.

Al ministerio de Ciencia e Innovación por concederme una beca FPI asociada al proyecto AGL2008-02305, a través de la cual empecé esta fase de mi vida. Al Ifapa "Alameda del Obispo" que me ha acogido desde el primer día como si llevara toda la vida. A Jose Rubio, Mercedes Moreno por los momentos vividos en el Ifapa y en los piscolabis ocasionales. A Ana Torres por su simpatía, ayuda y consejos.

El que haya sido posible realizar esta tesis se debe al material vegetal obtenido en el proyecto AGL2005-07497-C02-01. De todo corazón tengo que agradecer la ayuda recibida por Fernando Flores a la hora de elaborar los análisis de componentes principales de este tesis, por estar siempre disponible para mis dudas y con todos los problemas surgidos con estos análisis, muchas gracias de verdad, y a Sergio Atienza, por su ayuda en los análisis de QTLs realizados.

A todos aquellos que me ayudaron a sacar adelante mi campo, Amparo Martínez y todos "los de la nave", Enrique Márquez, Mariano, Enriquillo, Ángel, Alfonsi y Amalia. Gracias a todos, sin vosotros esta parte de la tesis no hubiera sido posible.

De la misma forma, agradecer a Ana Pozo, Gloria y Encarni, por su ayuda en el laboratorio, consejos, enseñanzas y por ratitos fuera del laboratorio. A Juan Prieto, muchas gracias por todo en general, por tu completa ayuda en el campo, por estar siempre disponible cuando he necesitado algo, por tus clases de historia, de religión, de política y por todas nuestras conversaciones.

Gracias a todos con los que en algún momento compartí despacho, tanto en la primera planta como en la segunda, por hacer las mañanas de despacho más amenas, Natalia, Lola y muchos más. A Lola, Gema y Sara por hacer mucho más llevadera esta última parte de la tesis, gracias por todos los momentos vividos fuera del laboratorio.

A Dr. Prof. Ingo Schubert y Dr. Joerg Fuchs por darme la oportunidad de realizar estancias en IPK de Gatersleben y acogerme en su laboratorio como una más. A Katrin Kumke por su ayuda en la microdissección de cromosomas y por su simpatía, y amabilidad conmigo.

A nivel personal quiero dar las gracias a todos aquellos que de alguna manera han vivido esta tesis conmigo. A Patri y a mis florecillas que aún queriendo ser prudentes a la hora de preguntar, siempre se han interesado por cómo iba. A todos los que han sufrido lo bueno y por supuesto lo malo de esta tesis, por escucharme y tener paciencia ni cuando yo la tenía, Félix, mi hermano y muy en especial mis padres de quienes no olvido que gracias a ellos estoy aquí.

*Nunca consideres el estudio
como una obligación, sino como
una oportunidad para penetrar
en el maravilloso mundo del
saber*

(Albert Einstein)

A mis padres y familia

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.- Importancia de <i>V. faba</i> como leguminosa	6
2.- Restos de la mejora genética de habas	7
3.- Problemas de la mejora	8
4.- Selección asistida por marcadores	10
Bibliografía	14
CAPITULO I: Desarrollo de nuevas RILs y estudio preliminar de la base genética de caracteres de interés agronómicos	19
Introducción	21
Materiales y Métodos	27
1.- Material Vegetal	27
2.- Desarrollo de material RIL	28
3.- Ensayos de campo	30
4.- Evaluación de caracteres agronómicos	31
5.- Análisis de los resultados	32
5.1.- Análisis de componentes principales (PCA)	32
5.2.- Aproximación al tipo de herencia	32
Resultados y discusión	34
1.- Desarrollo de las poblaciones RILs	34
2.- Estudio preliminar de la variabilidad en los cruzamientos considerados	36
3.- Aproximación al tipo de herencia	45
3.1.- Altura de la primera flor (HLF) y Altura de la primera vaina (HLP)	45
3.2.- Flores por inflorescencia (FPI)	49
3.3.- Ramas Totales (NTP)	51
3.4.- Longitud de vaina (PL)	53
3.5.- Número de óvulos por vaina (NOP) y Número de granos por vaina (NSP)	55
3.6.- Peso de 100 granos (HSW)	59
3.7.- Número de vainas por planta (PPP) y granos totales (SPP)	61
Conclusiones	65
Bibliografía	70
CAPITULO II: Comprobación de los grupos de ligamiento de <i>Vicia faba</i> L. con sus correspondientes cromosomas	75
Resumen	77
Abstract	78
Introduction	79
Results & Discussion	82
Acknowledgements	85

Supplementary file 1	86
References	87
CAPITULO III: Estrategias para el desarrollo de marcadores eficientes en la selección de caracteres agronómicos	91
Introducción	93
Materiales y Métodos	96
1.- Identificación y validación de QTLs para arquitectura y rendimiento en la población Vf6xVf27	96
1.1.- Material vegetal	96
1.2.- Evaluación de caracteres	96
1.3.- Análisis de QTLs	97
2.- Validación en distintos fondos genéticos	98
2.1.- Alineación con otros mapas publicados	98
2.2.- Validación en los materiales en desarrollo	98
2.3.- Extracción de ADN y análisis de marcadores	98
2.4.- Asociación entre marcadores y caracteres	99
2.5.- Estrategia de genes candidatos para el carácter “altura de planta” y relacionados	100
Resultados y Discusión	101
1.- Evaluación fenotípica de la población RIL Vf6 x Vf27	101
2.- Identificación y validación de QTLs para arquitectura y rendimiento en la población Vf6 x Vf27	108
2.1.- Caracteres relacionados con la arquitectura de la planta	108
2.1.1.- Altura del primer nudo con flor (HLF)	108
2.1.2.- Altura del primer nudo con vaina (HLP)	109
2.1.3.- Flores por inflorescencia (INF)	112
2.1.4.- Número de nudos con flor (NF)	112
2.1.5.- Número de ramas (NTP)	113
2.2.- Caracteres relacionados con el rendimiento	113
2.2.1.- Longitud de vaina (PL)	113
2.2.2.- Número de óvulos por vaina (NOP)	114
2.2.3.- Número de semillas por vaina (NSP)	114
2.2.4.- Peso en gramos de 100 semillas (HSW)	115
2.2.5.- Número de vainas por planta (PPP)	115
2.3.- Resumen de los resultados obtenidos en este apartado	115
3.- Validación de QTLs en distintos fondos genéticos	117
3.1.- Alineación con otros mapas publicados	117
3.2.- Validación del material desarrollado	122
3.2.1.- Altura del primer nudo con flores (HLF) y del primer nudo con vainas (HLP)	124
3.2.2.- Flores por inflorescencia (FPI)	128
3.2.3.- Número de ramas (NTP)	130
3.2.4.- Longitud de vaina (PL)	132
3.2.5.- Número de óvulos por vaina (NOP) y número de granos por vaina (NSP)	134
3.2.6.- Peso de 100 semillas (HSW)	137
3.2.7.- Vainas por planta (PPP), granos totales por	

planta (SPP) y rendimiento (YIELD)	139
3.3.- Consideraciones finales sobre la validación en distintos fondos genéticos	142
4.- Estrategias para la saturación de regiones portadoras de QTLs: sintenia y bibliografía	142
Bibliografía	162
DISCUSIÓN GENERAL	171
Discusión General	173
Bibliografía	179
CONCLUSIONES	183
Conclusiones	185
ANEXO I: Análisis de PCA de las poblaciones F_2 y $F_{2:3}$	187
ANEXO II: Histogramas de las poblaciones F_2 y $F_{2:3}$	217
ANEXO III: Marcadores para la validación de QTLs en diferentes poblaciones	267
ANEXO IV: Polimorfismos detectados en las poblaciones	275

INDICE DE TABLAS

CAPITULO I:

Tabla 1: Descripción morfológica de los tipos botánicos descritos en <i>V. faba</i> y empleados en nuestro trabajo (Cubero, 1974)	27
Tabla 2: Cruzamientos evaluados y sus tipos botánicos	28
Tabla 3: Caracteres evaluados en la generación F _{2:3} de los cruzamientos estudiados	32
Tabla 4: Cruzamientos desarrollados hasta las generaciones F ₆ (RILs-Recombinant Inbred Lines)	35
Tabla 5: Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes campaña 2008/2009	38
Tabla 6: Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes campaña 2009/2010	40
Tabla 7: Vectores necesarios para explicar la información y los componentes más importantes	41
Tabla 7: Vectores necesarios para explicar la información y los componentes más importantes (Continuación)	42
Tabla 7: Vectores necesarios para explicar la información y los componentes más importantes (Continuación)	43
Tabla 8: Valores medios y herencia para altura de primera flor (HLF).	46
Tabla 9: Valores medios y herencia para altura de la primera vaina (HLP).	47
Tabla 10: Valores medios y herencia para flores por inflorescencia (FPI)	50
Tabla 11: Valores medios y herencia para número de ramas (NTP).	52
Tabla 12: Valores medios y herencia para longitud de vaina (LV).	54
Tabla 13: Valores medios y herencia para óvulos por vaina (NOP).	56
Tabla 14: Valores medios y herencia para número de semillas por vaina (NSP).	57
Tabla 15: Valores medios y herencia para peso de 100 semillas (HSW)	59
Tabla 16: Valores medios y herencia para número de vainas por planta (PPP).	62
Tabla 17: Valores medios y herencia para granos totales (SPP).	63
Tabla 18: Tabla resumen de las herencias esperadas	64

CAPÍTULO II

Table 1: PCR amplification of selected markers using DNA of microisolated chromosomes as a template	84
--	----

CAPITULO III

Tabla 1: Cruzamientos evaluados a nivel molecular	98
Tabla 2: Perfil de amplificación	99
Tabla 3: Estadísticos descriptivos. Campaña 2011 y 2012	104
Tabla 4: ANOVA de los caracteres evaluados en la población RIL Vf6xVf27	105
Tabla 5: Coeficientes de correlación (r) de Pearson. Campaña 2011	106
Tabla 6: Coeficientes de correlación (r) de Pearson. Campaña 2012	107
Tabla 7: QTLs detectados para caracteres agronómicos en la población RIL Vf6xVf27	110
Tabla 8A: Marcadores asociados al carácter Altura de la Primera Flor incluidos en el mapa Vf6xVf27	125
Tabla 8B: Marcadores asociados al carácter Altura de la Primera Flor no incluidos en el mapa Vf6xVf27	125
Tabla 9A: Marcadores asociados al carácter Altura de la Primera Vaina incluidos en el mapa Vf6xVf27	127
Tabla 9B: Marcadores asociados al carácter Altura de la Primera Vaina no incluidos en el mapa Vf6xVf27	127
Tabla 10A: Marcadores asociados al carácter Flores por Inflorescencia incluidos en el mapa Vf6xVf27	129
Tabla 10B: Marcadores asociados al carácter Flores por Inflorescencia no incluidos en el mapa Vf6xVf27	129
Tabla 11A: Marcadores asociados al carácter Número de Ramas incluidos en el mapa Vf6xVf27	131
Tabla 11B: Marcadores asociados al carácter Número de Ramas no incluidos en el mapa Vf6xVf27	131
Tabla 12A: Marcadores asociados al carácter Longitud de Vaina incluidos en el mapa Vf6xVf27	133
Tabla 12B: Marcadores asociados al carácter Longitud de Vaina no incluidos en el mapa Vf6xVf27	133
Tabla 13A: Marcadores asociados al carácter Número de óvulos por Vaina incluidos en el mapa Vf6xVf27	135
Tabla 13B: Marcadores asociados al carácter Número de óvulos por Vaina no incluidos en el mapa Vf6xVf27	136

Tabla 14A: Marcadores asociados al carácter Número de Semillas por Vaina incluidos en el mapa Vf6xVf27	136
Tabla 14B: Marcadores asociados al carácter Número de Semillas por Vaina no incluidos en el mapa Vf6xVf27	136
Tabla 15A: Marcadores asociados al carácter Peso de 100 Semillas incluidos en el mapa Vf6xVf27	138
Tabla 15B: Marcadores asociados al carácter Peso de 100 Semillas no incluidos en el mapa Vf6xVf27	138
Tabla 16A: Marcadores asociados al carácter Número de Vainas por planta incluidos en el mapa Vf6xVf27	140
Tabla 16B: Marcadores asociados al carácter Número de Vainas por planta no incluidos en el mapa Vf6xVf27	140
Tabla 17A: Marcadores asociados al carácter Granos totales incluidos en el mapa Vf6xVf27	141
Tabla 17B: Marcadores asociados al carácter Granos totales no incluidos en el mapa Vf6xVf27	140
Tabla 18A: Marcadores asociados al carácter Rendimiento incluidos en el mapa Vf6xVf27	141
Tabla 18B: Marcadores asociados al carácter Rendimiento no incluidos en el mapa Vf6xVf27	142
Tabla 19: Genes en los intervalos de confianza de QTLs de floración y crecimiento	144
Tabla 20: Posibles genes candidatos en el intervalo de confianza de QTL principal para longitud del tallo principal (LMS)	146
Tabla 21: Homología de los ESTs cercanos a los QTLs de PH, HLF y HLP	147
Tabla 22: Revisión de los genes candidatos publicados por Lagunes-Espinoza et al. (2012)	148
Tabla 23: Tabla conjunta de marcadores flanqueantes y en el intervalo de confianza de QYT PH-2-2008	149

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1: Producción de habas secas por continente (FAOSTAT, 2013)	4
Figura 2: Evolución superficie cultivada en Europa (FAOSTAT, 2013)	4
Figura 3: Evolución de la producción y superficie cultivada en España (FAOSTAT, 2013)	5
Figura 4: Bacterias <i>Rhizobium</i> en una raíz de <i>Vicia faba</i> L.	6

CAPÍTULO I

Figura 1: Semillas de los cinco tipos botánicos utilizados	28
Figura 2: Esquema del modelo de selección SSD ("single seed descent")	29
Figura 3: RILs sembradas en jaulón con malla anit-insectos	30
Figura 4: Scatterplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) de los datos de parentales evaluados en la campaña 2008/2009	37
Figura 5: Scatterplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) de los datos de parentales evaluados en la campaña 2009/2010	39
Figura 6: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Altura del primer nudo con flores (HLF) en las poblaciones F_2 evaluadas	47
Figura 7: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Altura del primer nudo con vaina (HLP) en las poblaciones F_2 evaluadas	48
Figura 8: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Flores por inflorescencia (FPI) en las poblaciones F_2 evaluadas	51
Figura 9: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de Ramas (NTP) en las poblaciones F_2 evaluadas	53
Figura 10: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Longitud de vaina (PL) en las poblaciones F_2 evaluadas	55
Figura 11: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de Óvulos por vaina (NOP) en las poblaciones F_2 evaluadas	58
Figura 12: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de Semillas por vaina (NSP) en las poblaciones F_2 evaluadas	58
Figura 13: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Peso de 100 granos (HSW) en las poblaciones F_2 evaluadas	60
Figura 14: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de Vainas por Planta (PPP) en las poblaciones F_2 evaluadas	62

Figura 15: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Granos Totales (SPP) en las poblaciones F ₂ evaluadas	63
CAPITULO II	
Figure 1: Scheme of the standard (wild-type) and of reconstructed karyotypes of the <i>V. faba</i>	81
Figure 2: (A): Agarose gel of the PCR products (B): Amplification of primers LG85 and CNGC4 with DNA of karyotypes ACB, EF and BKH	83
CAPITULO III	
Figura 1: Distribución de los caracteres estudiados en la población RIL Vf6xVf27 en las dos campañas evaluadas	101
Figura 1: Distribución de los caracteres estudiados en la población RIL Vf6xVf27 en las dos campañas evaluadas (Cont.)	102
Figura 1: Distribución de los caracteres estudiados en la población RIL Vf6xVf27 en las dos campañas evaluadas (Cont.)	103
Figura 2: Identificación de QTLs para caracteres agronómicos en la población RIL derivada del cruzamiento Vf6xVf27	111
Figura 3: Análisis comparativo de QTLs para caracteres agronómicos en distintos fondos genéticos	119
Figura 3: Análisis comparativo de QTLs para caracteres agronómicos en distintos fondos genéticos (Continuación)	120
Figura 4A: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Altura de la primera flor (HLF)	151
Figura 4B: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Altura de la primera vaina (HLP)	152
Figura 4C: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Flores por Inflorescencia (FPI)	153
Figura 4D: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Número de Ramas (NTP)	154
Figura 4E: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Longitud de Vaina (PL)	155
Figura 4F: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Número de Óvulos por vaina (NOP)	156
Figura 4G: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Número de Semillas por vaina (NSP)	157

Figura 4H: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Peso de 100 Semillas (HSW)	158
Figura 4I: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Vainas por Planta (PPP)	159
Figura 4J: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Granos Totales (SPP)	160
Figura 4K: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Rendimiento (YIELD)	161

RESUMEN

En la actualidad, los principales cultivos se caracterizan por su limitada diversidad genética. La uniformidad genética ha tenido consecuencias dramáticas en el pasado y constituye una seria amenaza para el futuro. Como consecuencia, la ampliación de la base genética es un objetivo crucial para combatir esta amenaza. En las habas (*Vicia faba* L.), el uso de variedades antiguas es la mejor opción para enfrentarse a este problema. Sin embargo, el uso de este material tiene dificultades. De hecho, aunque las variedades antiguas tienen alelos beneficiosos para la mayor parte de los caracteres de interés en mejora, dichos alelos se encuentran generalmente ligados con otros de efectos no deseados. Estos bloques de genes han sido tradicionalmente llamados genes co-adaptados por los mejoradores, para resaltar que incluso las dificultades inherentes a la transferencia de alelos de interés a partir de variedades antiguas. En este contexto, la investigación de la base genética de los caracteres de interés constituye un aspecto crucial en mejora y, al mismo tiempo, el desarrollo de nuevos materiales vegetales que permitan este tipo de estudios resulta un objetivo valioso en sí mismo. Dada la importancia de este tema se propusieron los objetivos específicos de esta tesis doctoral.

Durante esta tesis se han desarrollado varias poblaciones RIL (*Recombinant Inbred Lines*) a partir de cruzamientos entre variedades pertenecientes a los cuatro grupos botánicos descritos en la especie: *major*, *equina*, *minor* y *paucijuga*. Estas poblaciones constituyen un material idóneo para investigar la base genética de los caracteres de arquitectura de la planta y rendimiento mediante mapeo genético. Del mismo modo, la caracterización de las primeras generaciones de estas poblaciones (F_2 y $F_{2:3}$) ha permitido obtener una información muy valiosa para la mejora sobre la genética de estos caracteres. Más aún, la caracterización fenotípica en detalle de los individuos que conforman estas RILs puede permitir la identificación de nuevos individuos con alto potencial para ser introducidas en el programa de mejora.

El desarrollo de recursos biotecnológicos, como la secuenciación del genoma de especies modelo, constituye una fuente importante de información para las habas. De hecho, la existencia de sintenia entre las distintas especies de leguminosas hace posible la transferencia de conocimiento de unas especies a otras. Sin embargo, las relaciones de sintenia entre las habas y la especie modelo *Medicago truncatula* L. estaban incompletas ya que todos los trabajos previos habían sido infructuosos para asignar las relaciones entre el cromosoma IV de habas y *M. truncatula*. Sin embargo, los resultados de esta tesis han permitido superar esta situación, lo que ha beneficiado el desarrollo de mapas genéticos consenso en la especie.

Del mismo modo, las herramientas moleculares también facilitan la transferencia de caracteres (genes) desde genotipos antiguos a variedades élite. De hecho, la identificación de marcadores moleculares fuertemente ligados a genes/QTL permitiría su selección indirecta de forma rápida en los programas de mejora. Sin embargo, la asociación entre marcadores y caracteres tiene que ser validada en diferentes condiciones ambientales y/o en distintos fondos genéticos antes de que esta información pueda utilizarse en mejora. En esta tesis hemos validado varios QTLs para arquitectura de planta y caracteres relacionados con el rendimiento en la población RIL derivada del cruzamiento Vf6 x Vf27. En algunos casos, los QTL han sido identificados en un trabajo previo, pero su validación estaba pendiente. Nuestro trabajo ha permitido tanto la validación de algunos QTLs importantes como la identificación de nuevas regiones asociadas a los caracteres en estudio. Más aún, algunos QTLs han sido validados utilizando cuatro poblaciones F₂ distintas y/o mediante la comparación con distintos trabajos a partir de los marcadores comunes alrededor de las regiones de interés. Toda esta información será de gran utilidad a los programas de mejora.

Finalmente, aunque los marcadores moleculares ligados a caracteres de interés son muy útiles, la eficiencia de selección disminuye con la distancia entre el marcador y el gen/QTL responsable del carácter. Por tanto, la identificación de genes candidatos responsables de la variación para los caracteres de interés resulta muy interesante, ya que este conocimiento permite el desarrollo de marcadores diagnóstico, esto es, marcadores con una eficiencia de selección del 100%. La existencia de sintenia entre las leguminosas junto con el desarrollo de trabajos de mapeo comparativo ha demostrado la existencia de un alto grado de colinealidad entre los genomas de *M. truncatula* y habas. De ahí que, la publicación de la secuencia del genoma de esta especie modelo constituya una valiosa fuente de información para las habas. Estos recursos nos han permitido la identificación de genes candidatos para altura de planta en el cromosoma III.

En resumen, esta tesis ha producido una serie de avances significativos: (i) incremento del conocimiento de la base genética de caracteres agronómicos y relacionados con el rendimiento; (ii) identificación del cromosoma IV de habas para el desarrollo de estudios relacionados con sintenia; (iii) validación de QTLs e identificación de genes candidatos para incrementar las oportunidades para el desarrollo de mejora asistida por marcadores; (iv) establecimiento de las bases para el desarrollo de estudios en detalle de la interacción genotipo x ambiente mediante el desarrollo de poblaciones segregantes RIL.

ABSTRACT

Nowadays, the main crops are characterized by their limited genetic diversity. The narrowing of the genetic diversity caused dramatic consequences in the past, and, thus, it supposes a serious threat to the future. As a consequence, the widening of the genetic bases is a crucial goal to deal with this problem. In faba bean (*Vicia faba* L.), the best option to cope with this problem is the use of old cultivars. However, the use of this material also implies difficulties. Indeed, old cultivars contain beneficial alleles for most of the traits of interest in breeding. However, these alleles are usually linked with other undesirable alleles. The existence of 'blocks of genes' have been usually referred by breeders as 'co-adapted genes' to highlight the that the transfer of a single gene from old cultivars to new ones is far from easy. In this context, it is crucial to investigate the genetic basis for the traits of interest and, similarly, the development of new plant materials which allow these studies is a worthy objective in itself. Thus, we proposed the specific objectives of this PhD thesis.

This thesis has allowed the development of several *Recombinant Inbred Line* (RIL) populations derived from crosses between genotypes belonging to the four botanic types described in this species: *major*, *equina*, *minor* and *paucijuga*. These populations constitute an idoneous plant material to investigate the genetic basis of yield-related traits throughout genetic mapping. Similarly, the characterization of early generations of these populations (F_2 and $F_{2:3}$) has provided valuable information on the genetic basis of the traits of interest in breeding. Furthermore, the extensive phenotyping of the individuals forming these RILs may allow the identification of new individuals with high potential for the faba bean breeding program.

The development of new biotechnological resources, such as sequencing of model species, constitutes an important source of information for faba bean. Indeed, the existence of synteny among legumes makes possible the transference of knowledge from one species to another. However, the synteny relations between faba bean and the model species *Medicago truncatula* L. were incomplete since all previous efforts had failed to assign chromosome IV from *V. faba* to *M. truncatula*. However, the results obtained in this thesis have allowed overcoming this situation which has benefited the development of consensus maps in the species.

Similarly, molecular tools also facilitate the transference of traits (genes) from old plant materials to elite cultivars. Indeed, the identification of molecular markers tightly linked to genes/QTL would allow their quick selection in breeding programs. However, the association between markers and traits has to be validated in different environmental

conditions and/or genetic backgrounds prior to their effective use in breeding programs. In this thesis we have validated several QTLs for plant architecture and yield-related traits in the RIL population derived from the cross Vf6 × Vf27. In some cases, these QTL have been identified in a previous work but their validation was still pending. Our work has allowed both the validation of some important QTLs and the identification of new regions related to the traits under study. Furthermore, some QTLs have been validated using four different F₂ populations and/or through comparison with previous works based on common markers around the regions of interest. All this information will be very useful to breeding programs.

Finally, although molecular markers linked to traits of interest are very useful their selection efficiency diminish with the distance to the gene/QTL responsible of the trait. Thus, the identification of candidate genes directly responsible of the variation is very interesting since they allow the development of diagnostic markers, i.e., markers with selection 100% selection efficiency. The existence of synteny among legumes, along with comparative mapping efforts, has proven the existence of a high degree of collinearity between faba bean and *M. truncatula*. Thus, the public release of the *M. truncatula* genome sequence constitutes a valuable source of information for faba bean. These resources have allowed us the identification of candidate genes for plant height in the chromosome III.

In summary, this thesis has produced the following advances: (i) increased knowledge of the genetic basis of agronomic and yield-related traits in faba bean; (ii) identification of chromosome IV of faba bean for synteny-related projects; (iii) validation of QTLs and identification of candidate genes to increase the opportunities for marker-assisted selection; (iv) establishment of the bases for more detailed studies such as genotype x environment variation throughout the development of suitable plant materials.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN GENERAL

Como todas las leguminosas, las habas (*Vicia faba* L.) destacan por su gran valor nutritivo y su papel fijador de nitrógeno atmosférico; por ambas cosas han sido componentes esenciales en la agricultura tradicional: su riqueza en proteína y el perfil de aminoácidos las hacía complementos ideales en una alimentación basada en cereales o féculas tanto para el hombre como para el ganado, y el enriquecimiento del suelo que repone el nitrógeno extraído por los demás cultivos (lo “estercolaban”, decían los autores romanos) las hacía necesarias en las rotaciones, bien como cultivo secundario, bien como abono verde o en praderas.

Junto con otras leguminosas de grano han sido un cultivo histórico en España, habiendo sufrido como las demás la imposición de una agricultura llamada “industrial” que hoy se trata de resolver por medio de las agriculturas “sostenibles”, “integradas”, “de conservación”, “de laboreo mínimo” o “de no laboreo”, “ecológicas”, “biológicas”, “biodinámicas” y quizá otras varias; todas ellas requieren un factor común para lograr sus objetivos: volver a las rotaciones y, en ellas, utilizar leguminosas, pues no hay otra manera conocida en la actualidad que permita disminuir los fertilizantes nitrogenados de síntesis manteniendo al mismo tiempo la estructura física del suelo.

Las habas se sembraron en grandes superficies hasta mediados del siglo XX, cuando la mecanización se impuso masivamente y definitivamente en el campo de los países desarrollados, eliminando la necesidad de animales de tiro y, por tanto, la de pienso para ellos. Además, la enorme producción de soja (otra leguminosa) registrada sobre todo en el último tercio del siglo XX permitió la importación de grandes cantidades de torta rica en proteína para piensos compuestos aptos para todo tipo de ganadería. Ello dejó un vacío proteínico enorme en los países no productores de soja que no se ha rellenado ni siquiera parcialmente a pesar de las voces de alerta desde los años setenta del pasado siglo. Incluso, la política de los países europeos, la tantas veces mencionada PAC (Política Agraria Común), parece haber ignorado esta realidad, evitando tomar medidas que revirtieran de una forma efectiva esta situación. No obstante, la importancia de las leguminosas tanto de grano como de forraje es una realidad: no por sus superficies actuales sino por las potenciales esperables en una agricultura que intente ser verdaderamente sostenible.

En 2013 la superficie sembrada de habas fue de unos de 2 millones de ha con una producción total de unos 3,5 millones de toneladas (FAOSTAT, 2013). No se consideran en esa estadística las habas hortícolas para consumo en verde, enlatado o congelado,

que ocupan una superficie mucho menor pero de mucho mayor valor económico. La mayor parte de la producción de habas secas proviene de Asia, seguida de África y Europa (Figura 1). El principal país por superficie de cultivo es China (922.000 ha), seguido a gran distancia por Etiopía (151.225 ha). En general, el cultivo sigue siendo significativo en países en vías de desarrollo y regiones de agricultura de subsistencia por las razones apuntadas más arriba.

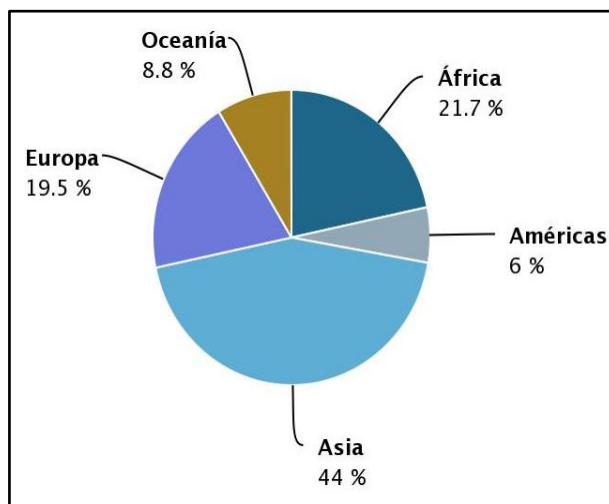


Figura 1: Producción de habas secas por continente (FAOSTAT, 2013)

En Europa la superficie cultivada fue, en 2013, de 227.233 ha, siendo Francia el principal país por superficie con 68.000 ha, seguido de Reino Unido, Italia, España y Alemania (FAOSTAT, 2013) (Figura 2).

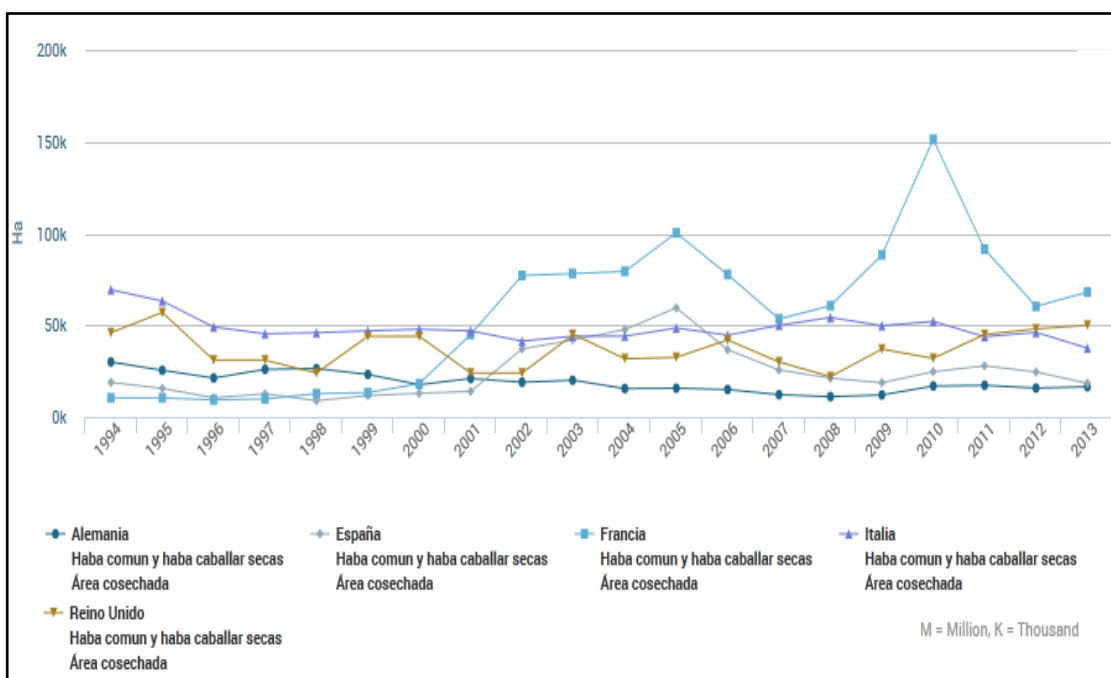


Figura 2: Evolución superficie cultivada en países de Europa durante los últimos veinte años (FAOSTAT, 2013).

En ese mismo año, la superficie dedicada a habas en España fue de 18.400 ha, con una producción de unas 28.000 toneladas (FAOSTAT, 2013). En la Figura 3 se recoge la serie histórica de los últimos 20 años. Puede observarse el aumento de superficie que se produjo en el período comprendido entre los años 2001 y 2005, para después volver a caer drásticamente, casi a niveles de 1994; la principal causa de tal caída fue la aplicación de la Reforma Política Agraria Comunitaria (PAC), esta vez la aprobada en 2003, en la que se planteó una reducción a un 25% de las ayudas de la superficie dedicada a este cultivo, provocando un descenso del cultivo desde las 59.500 ha en 2005 a las 18.400 ha en 2013. Todo ello nos da una idea de la dependencia que, en nuestro país, tiene este cultivo de las ayudas externas a la producción y por lo tanto de las normas de la PAC que se apliquen en cada momento. En otros países como Francia, se puede observar el mismo fenómeno si bien la caída posterior no fue tan drástica e incluso ha habido periodos con más área dedicada al cultivo en años más recientes (Figura 2). Es curioso que, al igual que en otras leguminosas de grano como el garbanzo y las lentejas, en España caen las superficies y las producciones totales pero aumentan las importaciones.

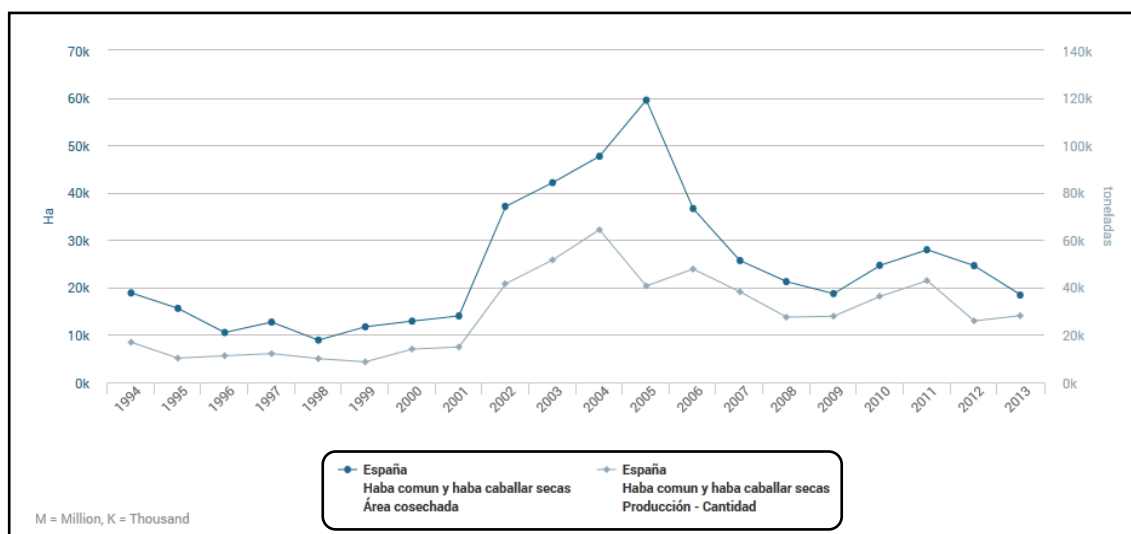


Figura 3: Evolución de la producción y superficie cultivada en España, en los últimos veinte años (FAOSTAT, 2013).

Con la aprobación de una nueva PAC para el periodo 2014-2020, se espera un aumento del área de cultivo dedicada a las leguminosas en general y de las habas en particular. La nueva reforma, en efecto, ofrece una buena oportunidad para la expansión del cultivo ya que establece un pago ecológico o “Greening” que supondrá hasta el 30% del Pago Directo y que estará destinado a prácticas que permitan el uso óptimo de los recursos naturales: aumento de la diversidad de cultivos, mantenimiento de pastos permanentes y conservación de superficies de interés ecológico. Dentro de la diversidad

que se pretende, las habas cobran interés por los beneficios adicionales hacia el medio ambiente que supone su cultivo. Disponer de materiales aptos para una agricultura moderna y sostenible es uno de los principales retos que afrontan los mejoradores de este cultivo.

1.- Importancia de *V. faba* como leguminosa

Todas las leguminosas se consideran cultivos mejorantes, ya que producen un incremento del nitrógeno en el suelo por su asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* y relacionados que son capaces de asimilar y fijar el nitrógeno atmosférico (Figura 4).



Figura 4: Bacterias *Rhizobium* en una raíz de *Vicia faba* L. (Masley S©, www.grow-it-organically.com)

Los datos aportados por Walley et al. (2007), sugieren que habas, guisantes y lentejas contribuyen de forma significativa en la fijación de nitrógeno en el suelo a largo plazo. Además, el uso de leguminosas en rotaciones de cultivos tiene otros efectos positivos como la reducción en la incidencia de parásitos de todo tipo al romper el ciclo continuo que ocurre en el monocultivo, así como la mejora de la estructura del suelo. Un gran número de trabajos ha mostrado siempre de forma consistente las ventajas de la rotación cereales-leguminosas no ya en efectos como el enriquecimiento en nitrógeno o en la estructura del suelo sino incluso en algo tan elemental como la “cuenta de resultados” (Christiansen et al. 2015, Preissel et al. 2015); baste con un ejemplo: en ensayos llevados a cabo en esta provincia de Córdoba se demostró que la rotación habas-trigo producía más rendimiento del cereal que el monocultivo trigo (Lopez-Bellido et al. 2012). También los resultados de distintos proyectos europeos sobre leguminosas,

como el recientemente finalizado *Legume-supported cropping systems for Europe*, han vuelto a mostrar los beneficios y la relevancia de estos cultivos. De ahí que la nueva PAC, antes brevemente comentada, parezca haber acogido, siquiera levemente, tales ideas.

2.- Retos de la mejora genética de habas

Los grandes problemas a los que se ha enfrentado tradicionalmente el cultivo de las habas, como los de otras leguminosas, han sido sus bajos rendimientos y la inestabilidad de los mismos. Entre los factores responsables figuraban la incidencia de plagas y enfermedades y los estreses abióticos como la sequía, heladas y altas temperaturas. Tal circunstancia comenzó a cambiar desde los primeros planes europeos a principio de los años setenta del pasado siglo y el papel del ICARDA (International Center for Agricultural Research in Dry Areas) para países en vías de desarrollo. Se consiguieron nuevos cultivares de alto rendimiento y se identificaron resistencias a las principales enfermedades; al ser programas públicos y el ICARDA una institución internacional dependiente del Grupo Consultivo Internacional de Investigaciones Agrarias (CGIAR en sus siglas oficiales inglesas), las nuevas líneas obtenidas eran de uso común y sucesivos programas europeos y nacionales produjeron variedades competitivas que sin embargo no fueron bien aprovechadas por las distintas políticas agrarias al no potenciar las tecnologías adecuadas para su desarrollo

En la actualidad, como el resto de cultivos, se enfrentan al nuevo reto de la mejora de la adaptabilidad a las nuevas condiciones de cultivo que puedan venir determinadas por el cambio climático con nuevos y cada vez más frecuentes estreses bióticos que habrá que tener en cuenta en cada área de producción. Las nuevas variedades pueden encontrar sus nichos en diferentes sistemas de cultivo, debiendo entrar por supuesto en rotaciones con otros cultivos como ya hemos dicho. Los productos finales, como en la actualidad, podrán ser de grano seco para pienso en países desarrollados, pero que en muchos otros siguen siendo un componente importante de platos tradicionales, y también para consumo en fresco y para las industrias de enlatado, congelado y, en general, para precocinados, lo que requerirá nuevos tipos aptos para la industria.

Todo ello exigirá cultivar las nuevas variedades con técnicas adecuadas, pues a pesar de que ya se dispone de buenas variedades, el agricultor, en muchos casos no elige la variedad apropiada o no la adquiere en una buena casa comercial, ni las abona ni las trata. Y, a pesar de todo, el avance ha calado de manera sensible, como lo prueba el hecho de que en 2013 el rendimiento medio en España ha sido de aproximadamente 1.6 t/ha (véanse los datos aportados al comienzo de esta Introducción), el doble al menos

que hace treinta años, a pesar de la escasa técnica que se aplica en el cultivo de variedades que, repetidamente, muestran poder llegar a las 3t/ha en condiciones de cultivo comercial y hasta las 4 t/ha en ensayos.

En definitiva, la agricultura moderna exigirá un paquete tecnológico completo en el que el agricultor sepa en cada caso cuáles son sus opciones en cuanto a variedades pero también en cuanto a las técnicas de cultivo a aplicar. En este sentido, una de las principales limitaciones actuales en el cultivo de las leguminosas y por tanto en el de las habas es el control de malas hierbas. Muchas de las materias activas empleadas en agricultura han sido prohibidas por la legislación europea, por lo que se precisará de nueva experimentación que solucione este problema, crucial para la expansión del cultivo.

El conocimiento de la base genética de cada uno de los caracteres para los que se va a mejorar facilitará en gran medida el manejo de cada uno y por tanto aumentará la probabilidad de obtener buenos resultados dentro de unos plazos razonables. Se ha avanzado en el estudio de la base genética de muchos de estos caracteres, tanto los asociados a la resistencia a enfermedades (Tivoli et al. 2006; Sillero et al. 2009; Villegas-Fernández, 2012; Rubiales et al. 2015), como los relacionados con factores abióticos como la resistencia al frío (Picard y Duc 1986; Arbaoui et al. 2008). En el caso de este último tipo de estreses también se está profundizando en la base fisiológica de los mismos, como respuesta a los requerimientos de adaptabilidad de cultivos exigidos por las previsiones de cambio climático en el futuro (Araujo et al. 2015). Un mayor conocimiento de las respuestas de la planta y una mejor caracterización de los distintos genotipos facilitarán el estudio de la base genética de las mismas.

De la misma manera se han hecho estudios sobre la genética caracteres agronómicos relacionados con la arquitectura y morfología de la planta (Cubero, 1970; Martín 1976; Suso y Cubero 1986), así como del rendimiento y sus componentes (Cubero, 1970; 1971; Martín, 1979; Suso y Cubero 1986; Torres et al. 1993; Simorte et al. 1995; Nadal et al. 2003 y Cruz-Izquierdo, 2009).

3.- Problemas de la mejora

Uno de los problemas al que se enfrentan los cultivos en general es la reducción de la variabilidad disponible. Este proceso se ha visto agravado durante el desarrollo de la mejora genética vegetal por la obtención de variedades más productivas y por la actividad de las casas comerciales que restringen, lógicamente por otra parte, la cantidad de variedades de su oferta.

La aparición de nuevas variedades más productivas y portadoras de caracteres interesantes para el productor ha provocado el abandono de cultivares y variedades locales adaptadas a sus condiciones de cultivo. Por otra parte, la propia metodología de los programas, basada muchas veces en el desarrollo de cruzamientos entre líneas élite, origina en sí misma una pérdida de la diversidad disponible y un estrechamiento en la base genética de los cultivos. Esta reducción de la diversidad disponible supone un gran riesgo para la Agricultura que está llevando al desarrollo de acciones para contrarrestar el proceso. En las últimas décadas, se han incrementado los proyectos de recolección de material a través de los Bancos de Germoplasma. De esta forma, se están conservando tanto variedades locales como especies silvestres relacionadas con las cultivadas. En el caso de las habas, es lamentable que no se haya descubierto el ancestro silvestre (posiblemente extinguido) y que no se pueda cruzar con ninguna otra especie del género *Vicia* como ha sido repetidamente demostrado (Cubero, 1982; 1984). Es una anomalía incluso dentro de las leguminosas (sólo la soja parece compartirla), pues tanto en lenteja (*Lens culinaris* Medik.) como en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se han logrado transferir genes de las especies silvestres a ambos cultígenos (Pickersgill et al. 1983; Ramsay y Pickersgill, 1984); en lenteja, por ejemplo, en la evaluación de colecciones de las especies silvestres del género *Lens* se han identificado genotipos con resistencia a enfermedades provocadas por hongos (Tullu et al. 2006; 2010; Podder et al. 2013) y con resistencia a jopo (*Orobanche crenata*) (Fernández-Aparicio et al. 2009). Del mismo modo, la resistencia a antracnosis ha sido introducida en un cultivar de lenteja mejorado a través de la hibridación con *Lens ervoides* (Fiala et al. 2009; Vail y Vanderberg, 2010).

En el caso del garbanzo, la ampliación de la base genética a través del cruzamiento con especies silvestres ha sido necesaria para poder construir mapas moleculares, tan estrecha era la base molecular del garbanzo, quizá porque la domesticación del cultivo se llevó a cabo en una sola población (Abbo et al. 2003).

En *V. faba* no se dispone de especies silvestres relacionadas que crucen con la domesticada, pero la ampliación de la base genética disponible para la mejora es imprescindible para el cultivo, por lo que el aumento de la variabilidad tiene que darse a través de las variedades primitivas que pueden ser portadoras de caracteres de interés, sobre todo buscando una mayor adaptación en el caso de un cambio climático global. En las habas se han descrito distintos tipos botánicos que identifican un conjunto de características pero que no tienen mayor entidad taxonómica, ya que se cruzan fácilmente entre sí (Cubero, 1984). Muratova (1931) distinguió dos subespecies (*paucijuga*, manifiestamente primitiva, y *(eu)faba*, y tres variedades botánicas dentro de esta última (*minor*, *equina*, *major*), pero todos los estudios llevados a cabo, como se verá

asimismo en la presente Tesis, demuestran que la distinción morfológica entre tales variedades no se debe a distintas arquitecturas genéticas: las diferencias obedecen a diferenciación regional y no morfológica como decía Muratova. Así pues, la necesidad de buenas recolectas en todas las posibles regiones donde se cultiva es una necesidad imperiosa.

En general, los trabajos en los que se ha abordado el estudio de la genética de caracteres de interés morfológico y reproductivo se llevaron a cabo cuando no existían herramientas moleculares (Susó y Cubero 1986; Martín y Cubero 1979; Cubero y Martín 1981). De ahí que el desarrollo de poblaciones segregantes, que permitan el estudio de los caracteres relacionados con el rendimiento y la arquitectura de planta, sea una de las prioridades para los programas de mejora genética de habas. Además de conseguir una aproximación a la base genética de cada uno de los caracteres, se podrían obtener nuevas formas distintas a las actuales y de posible valor agronómico. Por otra parte, serían un material muy adecuado para el desarrollo de herramientas moleculares que faciliten los procesos de selección a través de la selección asistida por marcadores (MAS-Marker Assisted Selection).

4.- Selección asistida por marcadores

La mejora genética es un proceso largo y complejo. Muchos de los caracteres que se estudian se encuentran influenciados por el ambiente, lo que supone una limitación importante para el éxito del mejorador. De ahí que una de las aspiraciones de éste sea poder seleccionar por el genotipo, en lugar de por el fenotipo. El desarrollo de los marcadores moleculares permitió por un lado el desarrollo de estudios genéticos a nivel molecular para identificar los factores genéticos responsables de los caracteres de interés en mejora y, por otro, el desarrollo de procedimientos de selección indirectos basados en estos marcadores moleculares. Las principales ventajas de dichos marcadores son su carácter neutro frente al ambiente y la posibilidad de análisis durante los primeros estadios de desarrollo o incluso en semillas y antes de la siembra con la consiguiente reducción en la cantidad de material vegetal a evaluar.

El desarrollo de técnicas moleculares ha facilitado la localización e identificación de genes de interés. Sin embargo, el éxito de esta identificación depende en gran medida del material vegetal empleado. En el caso de los caracteres cuantitativos, el éxito en la identificación de regiones asociadas a los caracteres en estudio (QTL-Quantitative Trait Loci) radica en la población de mapeo utilizada, que debe presentar un intervalo de variación suficiente para el carácter de interés, por lo que es conveniente que la distancia entre los parentales sea amplia para asegurar la presencia de polimorfismo (Rick, 1969).

De ahí que, como ya se ha mencionado, el desarrollo de poblaciones segregantes para el estudio de QTLs sea un objetivo importante en los programas de mejora de cualquier cultivo.

Existen gran cantidad de tipos de marcadores de ADN disponibles: RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Random Amplified polymorphic DNA), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSRs (Simple Sequence Repeats), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions), CAPS (Cleaned Amplified Polymorphic Sequences), STSs (Sequence-Tagged Sites), ESTs (Expressed Sequence Tags), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), etc. El tipo de polimorfismo más utilizado en la actualidad es el basado en SNP, por ser el más abundante. Se han desarrollado distintas tecnologías para su genotipado como KASPar (Semagn et al. 2014) u otras basadas en arrays como el "barley BOPA" (www.barleycap.org), que además permiten el genotipado simultáneo de cientos de marcadores al mismo tiempo. La tendencia actual es el desarrollo de genotipado masivo a través de tecnologías como DArT (Diversity Array Technology-www.diversityarrays.com) o del genotipado por secuenciación (GBS, genotyping by sequencing).

En habas, hasta hace relativamente poco se han empleado principalmente los marcadores RAPDs (Williams et al. 1990 y Welsh y MacClellan, 1990) para la identificación de genes o QTLs (Torres et al. 2010). La razón del uso de marcadores aleatorios radicaba en el escaso conocimiento que a nivel genómico se tenía de la especie. Poco a poco se han ido introduciendo otros tipos de marcadores más informativos como los microsatélites que, junto con el uso de trisómicos, permitieron la asignación de grupos de ligamiento de los mapas desarrollados a cromosomas específicos de la especie (Torres et al. 2010). En los últimos años se ha producido un nuevo salto cualitativo con la introducción de marcadores derivados de genes como los ESTs (Expressed Sequence Tags). Ellwood et al. (2008) publicaron el primer mapa de habas constituido exclusivamente por este tipo de marcadores que, posteriormente, Cruz-Izquierdo et al. (2012) mejoraron, ya que asignaron muchos de los grupos de ligamiento de este mapa a cromosomas específicos de *V. faba*. Esto ha permitido introducir a las habas en los estudios de sintenia en leguminosas, lo que ha abierto la puerta al uso de nuevas herramientas biotecnológicas. La inclusión de las habas en esta nueva línea de investigación permite tanto aprovechar los adelantos en el campo de la Biología Molecular como suministrarlos.

A partir de aquí se han desarrollado nuevos mapas que han culminado en la publicación de dos mapas consenso que actualmente constituyen la referencia para los trabajos de mapeo comparativo en la especie y de transferencia de información con el resto de las leguminosas (Satovic et al. 2013; Webb et al. 2015). En ambos trabajos se recoge un grupo de ligamiento asignado al cromosoma IV de *V. faba* que hasta el momento había sido la asignatura pendiente en los mapas desarrollados y por lo tanto en los estudios de sintenia realizados. Dicha asignación ha sido posible gracias al trabajo que se describirá en el capítulo II de la presente tesis.

Los mapas cada vez más informativos están siendo utilizados para la identificación de genes/QTLs asociados con caracteres interesantes para el cultivo como son la resistencia a las principales enfermedades (Satovic et al. 2013; Gutiérrez et al. 2013; Kaur et al. 2014) o la resistencia frente a estreses bióticos (Khazaei et al. 2014). También están sirviendo para la identificación de regiones asociadas a caracteres de calidad como el contenido en vicina-convicina (Khazaei et al. 2015) o la ausencia de taninos (Webb et al. 2015). En gran parte de estos trabajos se está aprovechando la posibilidad de trasaso de información entre las especies a través del uso de marcadores comunes.

En este contexto, la población usada para el desarrollo de los mapas de Ellwood et al. (2008) y Cruz-Izquierdo (2009) permitió la identificación de QTLs para los caracteres estudiados en nuestro trabajo: arquitectura de la planta y rendimiento, así como otros relacionados con la fenología del cultivo. Algunos de ellos fueron validados en las dos campañas estudiadas (Cruz-Izquierdo et al. 2012), siendo éstos los que más interés tienen desde el punto de vista de la mejora. De hecho, la validación de los resultados que se obtengan en cuanto al mapeo de genes y QTLs es imprescindible para la puesta en marcha de una estrategia eficaz de selección asistida por marcadores. Esta validación es conveniente en distintas condiciones ambientales pero también en distintos fondos genéticos, diferentes a aquellos en donde se identificaron, ya que con ello se pueden conseguir marcadores que sirvan en materiales distintos de los utilizados en su desarrollo.

Una vez validados los QTLs, el siguiente paso es la obtención de marcadores eficientes para la selección. Idealmente se trataría de diseñar marcadores sobre el gen responsable del carácter o lo que se viene llamando “marcadores diagnóstico”. En habas hay ejemplos de este tipo de marcadores en la bibliografía: marcadores asociados al gen TFL-1, responsable del crecimiento determinado en habas (Avila et al. 2006; 2007) o más recientemente al gen TTG-1 que confiere ausencia de taninos en las semillas (Webb et al. 2015). Sin embargo, este tipo de marcadores no siempre es fácil de desarrollar e

implica una labor de saturación de las regiones portadoras de QTLs tanto para llegar al gen candidato cuando sea posible como para obtener marcadores lo más cercanos posibles al mismo y por lo tanto con mayor probabilidad de servir en el programa de mejora.

En esta labor de saturación, el conocimiento ya mencionado sobre las relaciones de sintenia existente entre las distintas leguminosas y sobre todo con la especie modelo *Medicago truncatula* puede ser de gran ayuda. A lo largo de este trabajo trataremos de poner en práctica este tipo de estrategias. En concreto trataremos de llegar a la identificación de genes candidatos para altura de planta partiendo de QTLs validados en distintas campañas y de la información disponible en la bibliografía sobre este carácter en la especie modelo.

Por todo lo expuesto los OBJETIVOS de este trabajo han sido:

- Desarrollo de poblaciones RIL (*Recombinant Inbred Lines*) a partir de cruzamientos realizados entre parentales pertenecientes a los distintos tipos varietales descritos en habas y estudio preliminar de la genética de caracteres relacionados con la arquitectura de la planta y el rendimiento.
- Asignación de grupos de ligamiento pertenecientes a distintos mapas genéticos de habas al cromosoma IV de la especie.
- Validación en distintos ambientes de QTLs de arquitectura y rendimiento previamente identificados en la población RIL Vf6 × Vf27. Así mismo, validación preliminar de los mismos QTLs en distintos fondos genéticos.
- Proposición de genes candidatos responsables de la altura de la planta y otros caracteres relacionados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbo S, Berger J, Turner NC (2003). Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology* 30: 1081-1087.
- Araújo SS, Beebe S, Crespi M, Delbreil B, González EM, Gruber V, Lejwune-Henaut I, Link W, Monteros MJ, Prats E, Rao I, Vadez V, VazPatto MC (2015). Abiotic stress responses in legumes: Strategies used to cope with environmental challenges. *Critical Review in Plant Science* 34: 237-280.
- Arbaoui M, Link W, Satovic Z, Torres AM (2008). Quantitative trait loci of frost tolerance and physiologically related traits in faba bean (*Vicia faba* L.). *Euphytica*. 164:93-104.
- Avila CM, Atienza SG, Moreno MT, Torres AM (2007). Development of a new diagnostic marker for growth habit selection in faba bean (*Vicia faba* L.) breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 115(8): 1075-82.
- Avila CM, Nadal S, Moreno MT, Torres AM (2006). Development of a simple PCR-based marker for determination of growth habit in *Vicia faba* L. using a candidate gene approach. *Molecular Breeding* 17: 185-190.
- Cristiansen S, Ryan J, Singh M, Ates S, Bahhady F, Mohamed K, Youssef O, Loss S (2015). Potential legume alternatives to fallow and wheat monoculture for Mediterranean environment. *Crop & Pasture Science* 66(2): 113-121.
- Cruz-Izquierdo S (2009). Identificación de genes y QTLs relacionados con la domesticación y el rendimiento en la especie *Vicia faba*. Relaciones de sintenia con otros cultivos relacionados. Tesis doctoral. Departamento de Genética. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes. Universidad de Córdoba.
- Cruz-Izquierdo S, Avila CM, Satovic Z, Palomino C, Gutierrez N, Ellwood SR, Phan HTT, Cubero JI, Torres AM (2012). Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theoretical and Applied Genetics* 125(8): 1767-1782.
- Cubero JI (1970). Herencia de quince caracteres en *Vicia faba* L. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. Madrid, España.
- Cubero JI (1971). Herencia de la homocigosis y heterocigosis en la fertilidad de *Vicia faba* L. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. Madrid, España. Serie: Producción Vegetal 1:11-60.

- Cubero JI (1982). Interspecific hybridization in *Vicia*. En: Faba bean improvement pp. 91-108. Eds. G Hawtin y C Webb. Martinus Nijhoff, La Haya, Holanda.
- Cubero JI (1984). Utilization of wild relatives of food legumes. En: *Genetic Resources and their exploitation: Chickpeas, faba beans and lentils* pp. 73-84. Ed. por .JR Witcombe y W Erskine. Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, La Haya, Holanda.
- Cubero JI y Martín A (1981). Factorial Analysis of yield components in *Vicia faba* L: En: *Physiology and Breeding* pp. 139-151. Ed. por R. Thompson, Martinus Nijhoff Publishers, La Haya.
- Ellwood SR, Phan HTT, Jordan M, Hanes J, Torres AM, Ávila CM, Cruz-Izquierdo S, Oliver RP (2008) Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation or genoma structure with *Lens culinaris*. *BMC Genomics* 9:380.
- Fernández-Aparicio M, Sillero JC, Rubiales D (2009). Resistance to broomrape in wild lentils (*Lens* spp.). *Plant Breeding* 128: 266–270.
- Fiala JV, Tullu A, Banniza S, Séguin-Swartz G, Vandenberg A (2009). Interspecies Transfer of resistance to anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik.) *Crop Science* 49: 825-830.
- Gutierrez N, Palomino C, Satovic Z, Ruiz-Rodriguez MD, Vitale S, Gutierrez MV, Rubiales D, Kharrat M, Amri M, Emeran AA, Cubero JI, Atienza SG, Torres AM, Avila CM (2013). QTLs for *Orobanche* spp. Resistance in faba bean: identification and validation across different enviroment. *Molecular Breeding* 32: 909-922.
- Kaur S, Kimber RBE, Cogan NOI, Materne M, Forster JW, Paull JG (2014). SNP discovery and high-density genetic mapping in faba bean (*Vicia faba* L.) permits identification of QTLs for ascochyta blight resistance. *Plant Science*, 217:47-55.
- Khazaei H, O'Sullivan DM, Jones H, Pitts N, Sillanpää MJ, Pärssinen P Manninen O, Stoddard FJ (2015). Flanking SNP markers for vicine–convicine concentration in faba bean (*Vicia faba* L.) *Molecular Breeding* 35:38
- Khazaei H, O'Sullivan DM, Sillanpää MJ, Stoddard FL (2014). Use of synteny to identify candidate genes underlying QTL controlling stomatal traits in faba bean (*Vicia faba* L.).*Theoretical and Applied Genetics* 127: 2371-2385.

- Lopez-Bellido L, Munoz-Romero V, Benitez-Vega J, Fernandez-Garcia P, Redondo R, Lopez-Bellido RJ (2012). Wheat response to nitrogen splitting applied to a Vertisols in different tillage systems and cropping rotations under typical Mediterranean climatic conditions. *European Journal of Agronomy* 43: 24-32.
- Martín A (1976). Genética de los componentes del rendimiento en *Vicia faba*. Tesis Doctoral. E.T.S. de Ingenieros Agrónomos. Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Martin A y Cubero JI (1979). Inheritance of quantitative characters in *Vicia faba*. Pp. 90-95 in Bond, D.A., Scarascia-Mugnozza, G.T., Poulsen, M.H. (eds.), *Some current research on Vicia faba in Western Europe*. Commission of the European Communities, Luxemburgo.
- Masley S© (Recuperada en junio 2015). <http://www.grow-it-organically.com/growing-green-beans.html>
- Muratova VS (1931) Common beans (*Vicia faba* L.). *Bulletin of Applied Botany of Genetics and Plant Breeding (Suppl)* 50: 248-285.
- Nadal S, Suso MJ, Moreno MT (2003). Management of *Vicia faba* genetic resources: changes associated to the selfing process in the major, equina and minor groups. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 50:183-192.
- Picard J, Duc G, (1986). "Côte d'Or", a highly frost resistant population of faba bean. *Fabis Newsletter*. 13:11-12.
- Pickersgill B, Jones JK, Ramsay G, Stewart H (1983). Problems and Prospects of Wide Crossing in the Genus *Vicia* for the Improvement of Faba Bean. En: *Workshop on Faba Beans, Kabuli Chickpeas and Lentils in the 1980s* (Saxena MC and Varma S, eds.) ICARDA, 16-20, Aleppo, Syria.
- Podder R, Banniza S, Vandenberg A (2013). Screening of wild and cultivated of lentil germplasm for resistance to stemphylium blight. *Plant Genetic Resource: Characterization and Utilization* 11: 26-35.
- Preissel S, Reckling M, Schläfke N, Zander P (2015). Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: A review. *Field Crops Research* 175: 64-79.

- Ramsay G, Pickersgill B (1984). Inter-specific hybridisation in *Vicia* section faba: Comparison of selfed and hybrid embryo and endosperm. En: *Systems for Cytogenetic Analysis in Vicia Faba* L. Ed. por Chapman GP, Tarawali SA. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers.
- Rick CM (1969). Controlled introgression of chromosomes of *Solanum pennellii* into *Lycopersicon esculentum*: segregation and recombination. *Genetics* 62: 753.
- Rubiales D, Fondevilla S, Chan W, Gentzbittel L, Higgins TJV, Castillejo MA, Singh KB, Rispaill N (2015). Achievements and challenges in Legume breeding for pest and disease resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34: 1-42.
- Satovic Z, Avila CM, Cruz-Izquierdo S, Díaz-Ruiz R, García-Ruiz GM, Palomino C, Gutiérrez N, Vitale S, Ocaña-Moral S, Gutiérrez MV, Cubero JI, Torres AM (2013). A reference consensus genetic map for molecular markers and economically important traits in faba bean (*Vicia faba* L.) *Genomics* 14: 932.
- Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M (2014). Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* 33 (1): 1–14.
- Sillero, JC, Villegas-Fernández AM, Thomas J, Rojas-Molina MM, Emeran AA, Fernández-Aparicio M, Rubiales D (2009). Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* 115(3): 297-307.
- Simorte T, Flores F, Torres A, Moreno MT (1995). Componentes del rendimiento en generaciones segregantes de *Vicia faba*. INIA. Producción y protección vegetales. 10(3): 401-413.
- Suso MJ, Cubero JI (1986). Genetic changes under domestication in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 364-372.
- Tivoli B, Baranger A, Avila CM, Banniza S, Barbetti M, Chen W, Davidson J, Lindeck K, Kharrat M, Rubiales D, Sadiki M, Sillero JC, Sweetingham M, Muehlbauer FJ (2006). Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223–253
- Torres AM, Avila CM, Gutierrez N, Palomino C, Moreno MT, Cubero JI (2010) Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.) *Field Crops Research* 115: 243–252.

- Torres AM, Moreno MT, Cubero JI (1993). Genetics of six components of autofertility in *Vicia faba*. *Plant breeding* 111, 220-228.
- Tullu A, Buchwaldt L, Lulsdorf M, Banniza S, Barlow B, Slinkard AE, Sarker A, Taran B, Warkentin T, Vandenberg A (2006). Sources of resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in wild *Lens* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 111-119.
- Tullu A, Diederichsen A, Suvorova G, Vandenberg A (2010). Genetic and genomic resources of lentil: Status use and prospects. *Plant Genetic Resources* 9: 19-29.
- Vail S, Vandenberg A (2010). Evaluation of a clonal propagation protocol to obtain replicated disease data on infection by *Colletotrichum truncatum* in *Lens culinaris*. *Crop Science* 50: 926-932.
- Villegas Fernández AM (2012). Mejora de habas (*Vicia faba* L.) para Resistencia a *Botrytis fabae* Sard. Tesis doctoral. Dpto. De Genética. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Universidad de Córdoba.
- Walley FL, Clayton GW, Miller PR, Carr PM, Lafond GP (2007). Nitrogen economy of pulse crop production in the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* 99: 1710-1718.
- Webb A, Cottage A, Wood T, Khamassi K, Hobbs D, Gostkiewicz K, White M, Khazaei H, Ali M, Street D, Duc G, Stoddard F, Maalouf F, Ogbonnaya FC, Link W, Thomas J, O'Sullivan DM (2015) A SNP-based consensus genetic map for synteny-based trait targeting in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Biotechnology Journal*. ISSN 1467-7652 (en prensa).
- Welsh J, McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

CAPÍTULO I

**Desarrollo de nuevas RILs y estudio preliminar de
la base genética de caracteres de interés
agronómicos**

INTRODUCCIÓN

La reducción de la diversidad genética de los cultivos supone una seria amenaza para el futuro de la agricultura. La presión de selección ejercida por el hombre durante los procesos, primero de domesticación y después de mejora, ha causado cuellos de botella que han llevado al empobrecimiento progresivo de la base genética de los principales cultivos en los que se basa la alimentación humana (Tanksley and McCouch 1997; Warburton et al. 2006). Este factor de riesgo fue ya evidenciado en 1972 por la Academia Nacional de Ciencias de los EEUU, mediante la publicación de un estudio, motivado por la epidemia de *Helminthosporium* [hoy *Bipolaris*] *maydis* en los híbridos comerciales de maíz poseedores del citoplasma Texas, en el que se ponía de manifiesto el peligro latente en los cultivos más importantes debido a la uniformidad genética alcanzada en busca del rendimiento máximo (National Academy of Sciences, 1972.)

A partir de ahí, la comunidad científica reconoció que el incremento de la diversidad genética debía de ser un objetivo crucial en el desarrollo de los programas de mejora de los distintos cultivos para garantizar la seguridad alimentaria. Como consecuencia, se realizó un esfuerzo importante a nivel prospectivo que incrementó las colectas de variedades silvestres relacionadas con las especies cultivadas y las variedades locales de las mismas. Todo ello permitió un aumento considerable del número de muestras conservadas en bancos de germoplasma. Estudios posteriores con técnicas moleculares han confirmado la vulnerabilidad de los cultivos y en muchas ocasiones han puesto de manifiesto la baja diversidad genética de muchas especies cultivadas, a pesar de una gran variación fenotípica. Por ejemplo, la estrecha base genética en algunas especies como el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) o el cacahuete (*Arachis hipogea* L.) obliga al desarrollo de cruzamientos interespecíficos para el desarrollo de los mapas genéticos y sugiere que la domesticación se llevó a cabo a partir de muy pocos individuos de una población (Croser et al. 2003).

La vulnerabilidad de los cultivos hace imprescindible la máxima utilización tanto de las variedades primitivas como de los recursos silvestres para garantizar la existencia de una base genética suficiente para asegurar el éxito de los programas de mejora no sólo actuales sino futuros. La importancia de este proceso ha hecho que se acuñe un término específico, el de pre-mejora ('pre-breeding'), para englobar todos los procesos que permiten la transferencia de genes a partir de variedades primitivas o de ancestros silvestres a material mejorado.

La utilización en mejora de la diversidad disponible en estos materiales no está exenta de dificultades. Los mejoradores siempre hablaron de bloques de “genes coadaptados” para explicar la dificultad de transferir incluso caracteres monogénicos de una variedad primitiva o de una especie silvestre a una línea mejorada, ya que no sólo pasaba el gen de interés sino una buena cantidad de genes acompañantes estrechamente ligados a él en su bloque, genes muchas veces indeseados y con frecuencia indeseables que había que eliminar por medio de un largo proceso de selección. La existencia de tales grupos de ligamiento supone una barrera importante para la utilización de esta diversidad en mejora.

La dificultad de uso es mayor en el caso de especies silvestres. De ahí, que los avances sean más considerables en los cultivos de mayor importancia económica, donde el beneficio potencial compensa la inversión necesaria. De hecho, el uso de especies silvestres ha permitido avances considerables tanto en trigo duro (Ceoloni et al. 2014), como en trigo harinero (Khlestkina 2014) e incluso ha permitido el desarrollo de nuevos cultivos como el tritordeo (*×Tritordeum* Ascherson. et Graebner.) (Martín y Sánchez-Monge, 1982) a partir del cruzamiento entre la cebada silvestre *Hordeum chilense* Roem. et Schultz. y el trigo duro.

Las variedades primitivas o locales también presentan características de gran interés en la mejora de las cultivadas. Estas variedades han sido mantenidas en condiciones locales, y en muchas ocasiones están perfectamente adaptadas a las zonas donde fueron seleccionadas, por lo que suponen un reservorio de genes con potencial en mejora. Este hecho es relevante incluso en el caso de parientes silvestres, no sólo para caracteres obvios como la resistencia a enfermedades o plagas, sino incluso para caracteres de mayor complejidad como el rendimiento o la tolerancia a los estreses abióticos. El programa más ambicioso en este sentido es el desarrollo de trigos sintéticos en el CIMMYT. El trigo harinero es un alohexaploide fruto de la hibridación espontánea entre trigo duro y *Aegilops tauschii* Coss. El desarrollo de un programa de cruzamientos a gran escala en el CIMMYT en el que se repite este cruzamiento, pero utilizando la diversidad disponible en la especie silvestre, permite superar el cuello de botella que supuso la domesticación del trigo harinero. De hecho, este programa ha permitido la obtención de líneas con mayores rendimientos, grano más grande o tolerancia / resistencia frente a estreses bióticos o abióticos (van Ginkel and Ogonnaya 2007). En España, el programa de mejora de cebada probablemente constituye el mayor éxito de utilización de las variedades locales, tanto por la identificación de variedades de interés, como las adaptadas a sequía, como por el uso de estas variedades para la determinación

de la base genética de caracteres importantes como los relacionados con la floración o la resistencia a enfermedades (Igartua, 2014).

En cualquier caso, la utilización de estos recursos en mejora y el aprovechamiento de su tremendo potencial serán tanto más eficientes cuanto mejor conozcamos los caracteres a transferir y la base genética que los regula.

La domesticación y la posterior evolución de los cultivos han supuesto la selección de variantes génicas que favorecían las necesidades del hombre, como la indehiscencia, el mayor tamaño de grano, el raquis firme de las espigas, etc. En conjunto, se ha usado el término “síndrome de domesticación” para englobar los cambios producidos en el paso de especie silvestre a domesticada (Hammer, 1984; Harlan, 1992). En muchas ocasiones, además de estos cambios, también se han incluido otros relacionados más específicamente con la evolución o diversificación de las especies ya cultivadas (Meyer y Purugganan, 2013). En la actualidad, los distintos estudios tienden a intentar separar los dos procesos, siendo mucho lo que se ha avanzado en algunas especies en los últimos años en cuanto al conocimiento de los genes implicados. Este hecho, se ha debido principalmente al desarrollo de material vegetal adecuado para su estudio y a los avances conseguidos en cuanto a genética molecular tales como el mapeo fino de QTLs, el mapeo por desequilibrio en el ligamiento a través de los estudios de asociación del genoma o los análisis de complementación genética (Meyer y Purugganan, 2013). Por ejemplo, en el caso del maíz, que es la especie que ha sufrido un mayor cambio debido a la domesticación (Wallace et al. 2014), el proceso incluyó la selección de genes que controlan la mayor parte de los caracteres de interés agronómico como la arquitectura de la planta, las características del grano, el índice de cosecha, etc. Estudios preliminares indicaban que la transición de teosinte a maíz se debía a 5 o 6 loci (Beadle, 1980), sin embargo experimentos de mapeo fino posteriores indicaron que estos loci eran probablemente conjuntos de genes ligados (Quijada et al. 2009), mientras que datos aún más recientes a través de estudios transcriptómicos, indican la relación de casi 500 regiones genómicas, que a su vez podrían abarcar hasta 2000 genes que aportan pruebas de selección direccional consistente con posibles acciones en la domesticación (Hufford et al. 2012).

Las leguminosas siempre han ido por detrás de cereales y de otras especies en lo que concierne a la utilización de especies silvestres o variedades primitivas en mejora. La principal razón han sido las barreras al cruzamiento (Martínez et al. 1979; Cubero, 1982, 1984) y la segregación en bloques de caracteres (Cubero y Martín 1981), que dificulta el análisis genético y el trabajo con caracteres concretos. Por otra parte, en muchos casos,

se trata de cultivos de escasa relevancia económica aunque de enorme valor medioambiental. Este hecho ha marcado durante mucho tiempo una menor inversión en investigación y por lo tanto un menor conocimiento de la base genética de los caracteres de domesticación y/o diversificación de interés para la mejora de cada especie.

El caso de las habas no ha sido una excepción. A los problemas ya citados se les suma el hecho de que es imposible el estudio de los genes implicados en la domesticación ya que se desconoce su ancestro silvestre. Estos genes suelen afectar a caracteres de importancia agronómica, por lo que para su estudio es imprescindible la consideración de las variedades primitivas de la especie, donde existe una amplia diversidad genética.

Se reconocen cuatro tipos botánicos principales diferenciados fundamentalmente en función del tamaño de grano (de menor a mayor): *paucijuga*, *minor*, *equina* y *major*, aunque existen otras diferencias entre ellos como son el porte, la fertilidad, la ramificación o la longitud de vainas, entre otros (Cubero, 1974). Estas características tienen una gran utilidad en mejora ya que determinan la arquitectura de la planta y los componentes del rendimiento.

El avance del conocimiento a nivel molecular en la especie ha sido muy importante en los últimos años, pero aún estamos lejos de lo conseguido en otras especies de mayor valor económico. En contrapartida es mucho lo que se ha avanzado en especies como *Medicago truncatula* Gaertn., que se considera la especie modelo para el desarrollo de estudios genómicos en las leguminosas. Los estudios en *M. truncatula*, incluyendo su secuenciación completa, abren enormes posibilidades para la identificación de regiones genómicas e incluso de genes candidatos que regulan los caracteres de domesticación y/o especiación en las demás leguminosas. De hecho, en general se acepta que la información obtenida en la especie modelo puede hacer de puente entre la recopilada para las demás especies a través del establecimiento de lo que se conoce como relaciones de sintenia (Varshney et al. 2015).

En general, la domesticación de las diferentes especies leguminosas ha provocado cambios similares incluyendo mayor tamaño de semilla, ausencia de dehiscencia, vainas más largas etc. Sin embargo, esto no tiene por qué significar la existencia de genes ortólogos en las distintas leguminosas que regulen los mismos caracteres. Por ejemplo, Weeden (2007) comparó los genes responsables de la domesticación en guisante y judía y no encontró ninguno que fuese común a ambas especies, aunque no se pueda descartar la presencia de ortólogos en caracteres como el tamaño de semilla. Además, este hecho supondría una perspectiva halagüeña desde el punto de vista del mejorador,

ya que implicaría la posibilidad de modificar caracteres de interés de diferentes maneras, evitando los efectos negativos de la sustitución de unos alelos por otros (Weeden, 2007).

En cualquier caso, previo a cualquier estrategia de genes candidatos, resulta conveniente el desarrollo de poblaciones segregantes que nos permitan el estudio de la base genética de cada uno de los caracteres, el desarrollo de mapas de ligamiento y la identificación de genes y/o QTLs responsables de la genética de cada uno de ellos. Esta aproximación también permitiría la identificación de marcadores moleculares estrechamente ligados a estos genes/QTLs para su uso en la selección indirecta de genotipos de interés a través de un programa de selección asistida por marcadores, lo que facilitaría en gran medida los procesos de obtención de nuevas variedades.

Hasta el momento, hay pocos trabajos de identificación de QTLs para caracteres de diversificación en el cultivo de habas. El más significativo fue el realizado por Cruz-Izquierdo (2009) en el que identificó 60 QTLs responsables de la variación en 20 caracteres relacionados con la fenología, la arquitectura y el rendimiento del cultivo. Algunos de estos QTLs, incluso pudieron ser validados en distintas campañas agrícolas o, lo que es lo mismo, en distintos ambientes (Cruz-Izquierdo et al. 2012). En este trabajo estudió una población segregante derivada del cruzamiento entre la línea Vf6, perteneciente al tipo equina, y la Vf27, del tipo paucijuga. Pese a mostrar un gran variabilidad tanto fenotípica como genotípica, es improbable que este cruzamiento sea el más extremo para todos los caracteres de interés. De ahí que la generación de nuevas poblaciones segregantes que maximicen la variabilidad para cada uno de los caracteres considerados adquiera una gran importancia, más aún si tenemos en cuenta que es bastante probable que pueda existir una base genética distinta para los mismos caracteres en distintas líneas. Por ejemplo, Cubero y Martín (1981) describieron la existencia de dominancia negativa para tamaño de semilla en cruzamientos entre paucijuga y mayor. Sin embargo, en el mismo trabajo se concluyó que los resultados encontrados no podían ser extrapolados, ya que podían depender de los parentales utilizados

Las poblaciones RILs ("Recombinant Inbred Lines") son el material más idóneo para el desarrollo de estos estudios, ya que permiten incluir repeticiones y así estudiar la interacción genotipo \times ambiente y por tanto la estabilidad de los genes/QTLs obtenidos. El desarrollo de cruzamientos entre los distintos tipos botánicos reconocidos, supondría la ampliación de la base genética disponible para la mejora, incluyendo variaciones en arquitectura de planta que podrían ser incluidas de forma directa en el programa de mejora. Además, las poblaciones obtenidas a partir de estos cruzamientos servirían para

una aproximación al tipo de herencia de los caracteres de interés y por lo tanto la estimación del potencial en mejora de los distintos cruzamientos para los caracteres relacionados con el rendimiento y la arquitectura de la planta; del mismo modo, el estudio de las descendencias de estos cruzamientos permitirían comprobar si realmente existen bloques génicos para los caracteres de interés. En la actualidad, las nuevas plataformas de genotipado masivo hacen que la fase más costosa, tanto en tiempo como en dinero, sea el desarrollo de las poblaciones de mapeo, de ahí que el desarrollo de poblaciones RILs sea un objetivo en sí mismo.

Objetivos

La finalidad de este capítulo es el incremento de la base genética disponible para los programas de mejora de habas a través de la introducción de la variabilidad existente en las variedades primitivas. Para ello y por todo lo expuesto, en el presente capítulo nos propusimos: el desarrollo de nuevas poblaciones RIL que sirvieran tanto para el estudio de la base genética de caracteres de arquitectura y rendimiento en habas como para la obtención de material de interés en un programa de mejora. Durante la generación de este material vegetal se realizó una primera aproximación a la genética de los caracteres y su posible comportamiento en mejora mediante el estudio de las segregaciones de las generaciones F_2 y $F_{2:3}$ de los distintos cruzamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Material Vegetal

El material vegetal estudiado en esta tesis se desarrolló a partir de cruzamientos entre 6 líneas parentales pertenecientes a los 4 tipos botánicos descritos en *V. faba* y a una forma intermedia: Vf172 (*paucijuga*); Vf751 y Vf1809 (*minor*); Vf417 (*equina-minor*); Vf422 (*equina*); Vf937 (*major*). El origen de estas líneas y las características morfológicas de cada tipo botánico se muestran en la Tabla 1 y Figura 1. Todas ellas pertenecen a la colección del Banco de Germoplasma de habas conservada como colección activa en el Centro Alameda del Obispo (Córdoba) del Instituto de Investigación y Formación agraria y Pesquera de la Junta de Andalucía.

Tabla 1: Descripción morfológica de los distintos tipos botánicos descritos en *V. faba* y empleados en nuestro trabajo (Cubero, 1974)

Genotipos parentales		
Genotipo	Tipo botánico y procedencia	Características del tipo botánico
Vf172	Tipo <i>Paucijuga</i> , India	Plantas pequeñas con numerosas ramas, muy autofértiles, bajo número de flores por nudos, bajísima producción, granos muy pequeños y redondeados
Vf751	Tipo <i>Minor</i> , PBI	Granos cilíndricos-redondeados, peso no mayor a 0,6 gramos. Primera flor y primera vaina muy altas, muchas flores por nudo
Vf1809	Tipo <i>Minor</i>	
Vf417	Tipo <i>Equina-minor</i> , Afganistán	Tipo intermedio, con características de los tipos minor y equina, granos elipsoidales sin llegar a estar aplanados.
Vf422	Tipo <i>Equina</i> , Etiopía	Granos con forma intermedia entre aplanados y cilíndrico-redondeados, peso entre 0,6 y 1,1 gramos.
Vf937	Tipo <i>Major</i> , España	Plantas con semillas aplanadas que pueden pesar hasta 2 gramos. Longitudes de vaina mayores, muchas flores por nudo, pocos tallos pero altos.



Figura 1: Semillas de los cinco tipos botánicos utilizados. A: Vf937 (*major*), B: Vf422 (*equina*), C: Vf417 (*equina-minor*), D: Vf751 (*minor*), E: Vf1809 (*minor*), F: Vf172 (*paucijuga*).

Para la obtención de las poblaciones de líneas recombinantes (RIL) se partió de 13 poblaciones F_2 de cruzamientos desarrollados en el marco del proyecto de investigación AGL2005-07497, cofinanciado por el entonces Ministerio de Ciencia e Innovación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (Tabla 2). Además se incluyó un nuevo cruzamiento del que se obtuvo la F_1 al final de primer año del trabajo (Tabla 2).

Tabla 2: Cruzamientos evaluados y sus tipos botánicos

Cruzamientos	Tipos botánicos
Vf417 × Vf172	<i>Equina-minor</i> × <i>Paucijuga</i>
Vf422 × Vf172	<i>Equina</i> × <i>Paucijuga</i>
Vf937 × Vf172	<i>Major</i> × <i>Paucijuga</i>
Vf751 × Vf1809	<i>Minor</i> × <i>Minor</i>
Vf1809 × Vf751	<i>Minor</i> × <i>Minor</i>
Vf751 × Vf417	<i>Minor</i> × <i>Equina-minor</i>
Vf422 × Vf751	<i>Equina</i> × <i>Minor</i>
Vf751 × Vf422	<i>Minor</i> × <i>Equina</i>
Vf1809 × Vf422	<i>Minor</i> × <i>Equina</i>
Vf937 × Vf751*	<i>Major</i> × <i>Minor</i>
Vf937 × Vf417	<i>Major</i> × <i>Equina-minor</i>
Vf417 × Vf937	<i>Equina-minor</i> × <i>Major</i>
Vf937 × Vf422	<i>Major</i> × <i>Equina</i>
Vf422 × Vf937	<i>Equina</i> × <i>Major</i>

* Cruzamiento obtenido durante la realización de la tesis

2.- Desarrollo del material RIL

Todas las poblaciones fueron sometidas a un proceso de selección SSD ('single seed descent') para el desarrollo de las RIL (Figura 2). Para ello cada generación se sembró en jaulón con malla anti-insectos, lo que permitía garantizar la ausencia de polinizadores (Figura 3). Con ello se pretendía las descendencias obtenidas provinieran de autofecundación. En F_2 se dispone de una única planta por cada genotipo que se

recogió entera. En generaciones sucesivas se sembraron 3 granos de cada genotipo en surcos de 50 cm separados por 70 cm de pasillo. Se recogió siempre la planta del centro del surco y de ahí se obtuvieron 3 granos para la siembra del año siguiente hasta llegar a F_6 y por lo tanto las poblaciones RILs. En el caso del cruzamiento nuevo se procedió de la misma manera hasta obtener la correspondiente generación F_4 .

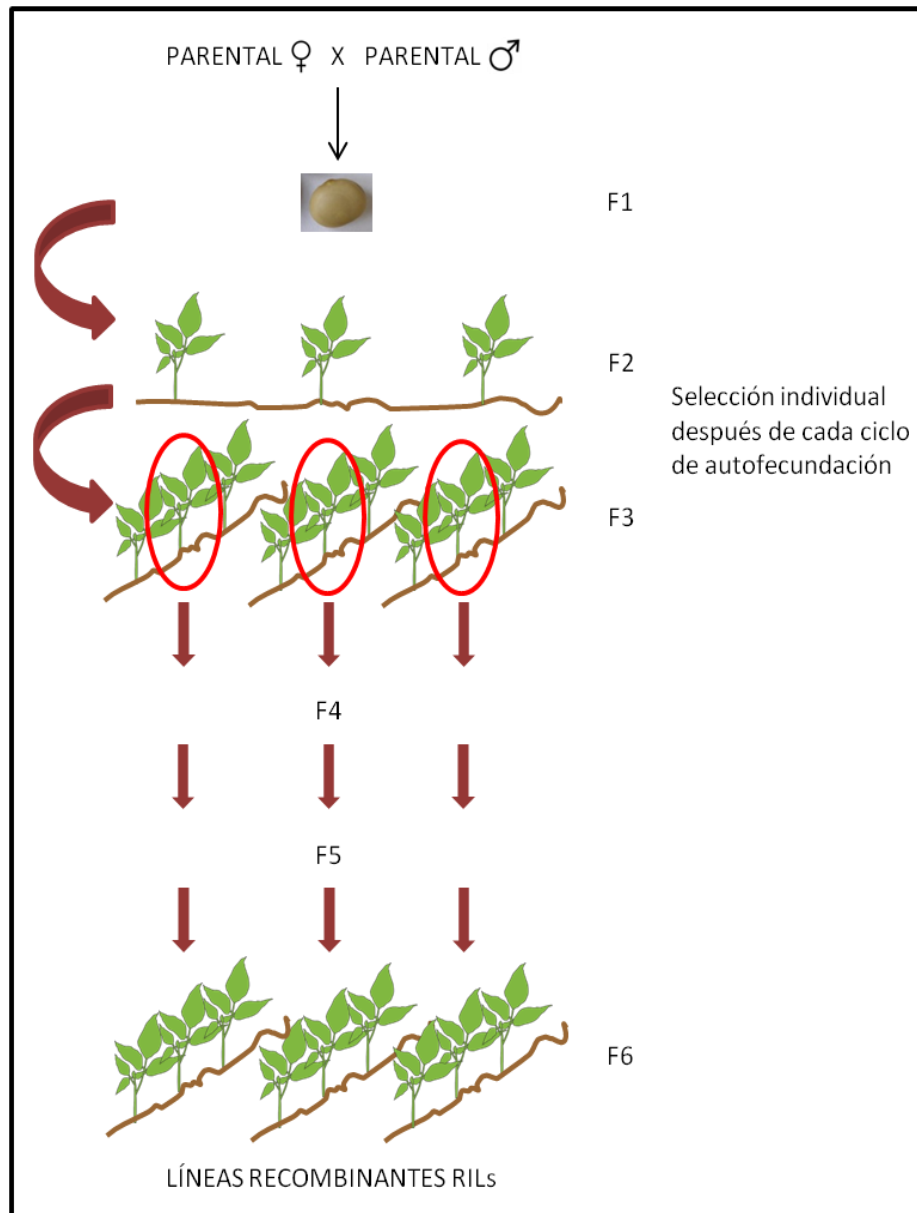


Figura 2: Esquema del modelo de selección SSD ("single seed descent")



Figura 3: RILs sembradas en jaulón con malla anti-insectos.

3.- Ensayos de campo

Todas las poblaciones provenientes del proyecto AGL2005-07497 fueron evaluadas durante dos campañas consecutivas en la finca Alameda del Obispo del IFAPA en Córdoba. En la campaña 2008/2009 se evaluaron las 13 poblaciones, mientras que en la 2009/2010 se hizo lo propio con las generaciones $F_{2:3}$ obtenidas (Figura 2). Así mismo, las poblaciones F_2 y $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento Vf937 × Vf751 se evaluaron, respectivamente, en las campañas 2010/2011 y 2011/2012.

Las siembras se realizaron en noviembre y las prácticas agrícolas fueron las habituales en la finca, con riegos de apoyo cuando fue necesario, para asegurar el cuajado de vainas.

Los individuos F_2 se sembraron y evaluaron bajo jaulón. Las plantas se dispusieron en surcos de 1m separados entre ellos por 70 cm siguiendo un diseño completamente aleatorizado que incluyó los parentales de cada cruzamiento como testigos. De esta generación F_2 se tomaron las muestras de material vegetal para extracción de ADN y se recogió su descendencia para obtener las familias $F_{2:3}$ derivadas. Para la evaluación de éstas últimas se realizó un ensayo en campo abierto, utilizando un diseño experimental en bloques completamente aleatorizados con dos repeticiones, incluyéndose, de nuevo, los parentales como testigos. Cada repetición de cada familia estuvo compuesta de un máximo de 10 plantas sembradas en surcos de 1 metro y con una separación entre surcos de 70 cm. Los caracteres evaluados en cada población se indican en la Tabla 3. Nuevamente la evaluación del cruzamiento Vf937 × Vf751 se vio retrasado, realizándose en la campaña 2011/2012 siguiendo el mismo protocolo.

Se descartó la evaluación de 5 de las 14 $F_{2:3}$ obtenidas ya que el ensayo de campo se vio afectado por encharcamiento prolongado o por ataque de jopo, lo que imposibilitó

el correcto desarrollo del ciclo de las plantas. En cada cruzamiento se seleccionaron los caracteres a estudiar teniendo en cuenta, en cada caso, los resultados obtenidos en la generación F_2 (Tabla 3).

4.- Evaluación de caracteres agronómicos

Se consideraron 2 grupos de caracteres, aquéllos relacionados con la arquitectura de la planta y los caracteres directamente relacionados con los componentes del rendimiento.

- Caracteres relacionados con la arquitectura de la planta:
 - Altura del primer nudo con flor (HLF): Número de nudos desde el suelo hasta la primera flor.
 - Altura del primer nudo con vaina (HLP): Número de nudos desde el suelo hasta la primera vaina.
 - Número total de ramas (NTP): Número total de ramas de cada planta
 - Flores por inflorescencia (FPI): Media del número de flores presente en cinco inflorescencias de cada planta.

- Caracteres relacionados con el rendimiento y sus componentes:
 - Número de vainas por nudo (PPN): Valor medio del número de vainas presente en cinco nudos de cada planta (evaluado sólo en F_2).
 - Número de vainas por planta (PPP): Número total de vainas que hay en la planta.
 - Número de óvulos por vaina (NOP): Media de óvulos de cinco vainas de cada planta.
 - Número de semillas por vaina (NSP): Media de granos formados de cinco vainas de cada planta.
 - Longitud de vaina (PL): Valor medio de la longitud medida en mm de cinco vainas de cada planta.
 - Peso de 100 semillas (HSW): Peso en gramos de 100 semillas de cada planta.
 - Granos totales (SPP): Número de granos total de todas las vainas de la planta (evaluado en F_2 y parentales).
 - Rendimiento (YIELD): Calculado con la fórmula $(HSW * SPP) / 100$ (evaluado en F_2 y parentales).

Tabla 3: Caracteres evaluados en la generación F_{2:3} de los cruzamientos estudiados

	Vf417xVf172	Vf422xVf172	Vf937xVf172	Vf751xVf422	Vf937xVf751	Vf937xVf417	Vf417xVf937	Vf937xVf422	Vf422xVf937
HLF	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
HLP	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
NTP	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
FPI		✓		✓	✓	✓		✓	
PPP	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
NOP			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
NSP			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PL	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
HSW	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

✓: Carácter estudiado en esa población. HLF: altura del primer nudo con flor, HLP: altura del primer nudo con vaina NTP: número total de ramas, FPI: media de flores por nudo, PPP: número total de vainas, NOP: media de óvulos por vaina, NSP: media de granos por vaina, PL: longitud de vaina, HSW: peso de 100 granos.

5.- Análisis de los resultados

5.1.- Análisis de componentes principales

Para estudiar la influencia de los caracteres evaluados en la variabilidad encontrada en cada población, en este capítulo se han analizado los componentes principales para los parentales, los 14 cruzamientos en F₂ evaluados y para 9 de las poblaciones F_{2:3} evaluadas con el programa estadístico SAS® 9.3 (SAS Institute Inc.) (Anexo I).

5.2.- Aproximación al tipo de herencia

Para cada cruzamiento se representaron los datos obtenidos mediante histogramas, tanto en F₂ como en F_{2:3} (Anexo II). En la estimación del tipo de herencia se tuvieron en cuenta los valores medios de los parentales y de la F₂, considerando sus intervalos de confianza (IC). Como primer criterio se observó la existencia de variabilidad entre los parentales. De esta forma, si los IC calculados coincidían o solapaban consideramos que no había variación entre parentales y que por lo tanto en la F₂ o bien no había variación con respecto a los parentales o bien el tipo de herencia sería transgresiva. En el primer caso, los IC debían solapar mientras que en el segundo el de la F₂ debía ser mayor o menor que el de los parentales según tuviera sentido positivo o negativo, respectivamente.

Cuando se observaron diferencias entre parentales, esto es, cuando sus IC no coincidían o solapaban, los distintos tipos de herencia se calcularon atendiendo al siguiente criterio:

$\overline{P_{\min}}$ = Valor medio del parental que presenta el menor valor para el carácter.

$\overline{P_{\max}}$ = Valor medio del parental que presenta el mayor valor para el carácter.

$\overline{F_2}$ = Valor medio de la población

$\overline{P_{\min - \max}}$ = Media de los parentales $(P_{\min} + P_{\max})/2$

Int. P_{\min} = Extremo del intervalo de confianza de $\overline{P_{\min}}$

Int. P_{\max} = Extremo del intervalo de confianza de $\overline{P_{\max}}$

Int. F_2 = Extremo del intervalo de confianza de $\overline{F_2}$

Los tipos de herencia se establecieron mediante fórmulas de tipo condicional utilizando Microsoft Excel.

Transgresividad negativa: Si se cumple que $\overline{F_2} + \text{Int. } F_2 < \overline{P_{\min}} - \text{Int. } P_{\min}$

Transgresividad positiva: Si se cumple que $\overline{F_2} - \text{Int. } F_2 > \overline{P_{\max}} + \text{Int. } P_{\max}$

Dominancia negativa: En ausencia de transgresividad, si se cumple que $\overline{F_2} + \text{Int. } F_2 < \overline{P_{\min - \max}}$

Dominancia positiva: En ausencia de transgresividad, si se cumple $\overline{F_2} - \text{Int. } F_2 > \overline{P_{\min - \max}}$

Dominancia cero: En ausencia de las anteriores, si $\overline{F_2} \sim \overline{P_{\min - \max}}$

Además, para cada carácter, se representó gráficamente el tipo de herencia estimado considerando todos los cruzamientos analizados, lo que permite una rápida visualización. Para ello se representaron las 6 líneas parentales en los vértices de un hexágono. Cada cruzamiento se representó mediante una flecha donde el origen indica el parental materno y el vértice el parental masculino. Se utilizaron distintos tipos de línea en las flechas para mostrar el tipo de herencia: dominancia (tipo de línea continuo), transgresividad (tipo de línea de guiones), sin variación (tipo de línea de puntos). Del mismo modo, se utilizó un código de colores para indicar el sentido de la herencia: verde (dominancia o transgresividad positivas), rojo (dominancia o transgresividad negativa), azul (dominancia cero), negro (sin variación en el carácter).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Desarrollo de las poblaciones RILs

Las poblaciones RIL cuentan con la gran ventaja de ser poblaciones fijadas en las que la heterocigosis es prácticamente residual. Este hecho elimina la limitación de semillas que existe en generaciones anteriores y que impide las repeticiones de los ensayos, limitando a la vez la precisión de las evaluaciones de los distintos caracteres. Por todo ello son poblaciones ideales para los estudios de la interacción genotipo x ambiente ya que se pueden diseñar experimentos en distintas localidades y, por lo tanto, distintos ambientes.

Con el fin de aprovechar la variabilidad observada en los distintos tipos botánicos de *V. faba*, se decidió el desarrollo de poblaciones RIL que además de permitir el estudio de la base genética de caracteres de interés relacionados con la arquitectura y el rendimiento de la planta, supusiera una oportunidad para la combinación de características deseables en genotipos que pudieran ser integrados al programa de mejora.

Para ello se partió del método de descendencia de semilla única, desde las generaciones F_2 recopiladas en la Tabla 4. Se han obtenido las generaciones F_6 de 11 de los 14 cruzamientos con los que se ha trabajado (Tabla 4). El cruzamiento Vf937 x Vf751 se ha desarrollado por completo en el marco de la tesis, encontrándose actualmente en la generación F_4 . En la misma generación se encuentran los cruzamientos Vf751 x Vf1809 y recíproco (Tabla 4).

Tabla 4: Cruzamientos desarrollados hasta las generación F₆ (RILs-Recombinant Inbred Lines)

Cruzamiento	Tipos Botánicos	Nº Genotipos F₂	Nº Genotipos RILs
Vf417 x Vf172	<i>Equina-minor x Paucijuga</i>	138	130
Vf422 x Vf172	<i>Equina x Paucijuga</i>	99	91
Vf937 x Vf172	<i>Major x Paucijuga</i>	108	95
Vf751 x Vf1809	<i>Minor x Minor</i>	138	129*
Vf1809 x Vf751	<i>Minor x Minor</i>	121	111*
Vf751 x Vf417	<i>Minor x Equina-minor</i>	51	40
Vf422 x Vf751	<i>Equina x Minor</i>	69	59
Vf751 x Vf422	<i>Minor x Equina</i>	68	60
Vf1809 x Vf422	<i>Minor x Equina</i>	189	115
Vf937 x Vf751	<i>Major x Minor</i>	105	85*
Vf937 x Vf417	<i>Major x Equina-minor</i>	180	147
Vf417 x Vf937	<i>Equina-minor x Major</i>	152	142
Vf937 x Vf422	<i>Major x Equina</i>	82	76
Vf422 x Vf937	<i>Equina x Major</i>	121	105

*Cruzamientos actualmente en F₄

Los datos recogidos en la Tabla 4, muestran la diferencia en el número de genotipos entre las distintas poblaciones RIL. No es un hecho trivial ya que este número marcará de manera importante la utilidad de las mismas en los estudios futuros que pretendamos llevar cabo. Por ejemplo, un tamaño pequeño de población puede llevar, a la hora de diseccionar molecularmente la base genética de los caracteres cuantitativos, a subestimar el número de regiones del genoma asociadas (QTLs), a sobreestimar su efectos o a fallar a la hora de cuantificar las interacciones entre las mismas (Beavis, 1998; Melchinger et al. 1998, Schön et al. 2004). Muchos de los trabajos sobre QTLs se desarrollan con poblaciones con alrededor de 100 individuos y aunque hay trabajos que sugieren que incluso 200 individuos son pocos para una detección precisa de QTLs, otros concluyen que poblaciones pequeñas también son útiles para la detección de QTLs de grandes efectos (Vales et al. 2005). A fin de cuentas, éstos últimos son los que, a priori, más interés práctico tienen en los programas de mejora.

Durante nuestro trabajo hemos obtenido once poblaciones RIL y estamos en proceso de conseguir otras tres. Siete de estas poblaciones superan los 100 individuos, pero otras 7 se encuentran, incluso, por debajo de ese número (Tabla 4). No obstante, estos materiales siguen siendo valiosos ya que pueden servir, como ya se ha mencionado, para la detección de QTLs de efectos grande, o bien para validar en distintos fondos genéticos este tipo de QTLs detectados previamente. Así mismo, dada la variabilidad entre los parentales elegidos, en estas poblaciones, aunque sean más

pequeñas, se pueden originar combinaciones génicas y fenotípicas interesantes en sí mismas para los programas de mejora.

El material desarrollado se encuentra conservado en condiciones de baja temperatura y humedad y a disposición de nuevos estudios que se deseen plantear. Son excepciones las poblaciones que se encuentran en F_4 que siguen su proceso de autofecundación para la obtención de las correspondientes poblaciones RIL.

2. Estudio preliminar de la variabilidad en los cruzamientos considerados

Previamente al estudio de variabilidad en las poblaciones F_2 y $F_{2:3}$ de los cruzamientos considerados, realizamos lo propio con los parentales de los mismos. Con ello pretendíamos una primera aproximación al posible agrupamiento de los caracteres y a cómo podían influir sobre la variabilidad observada

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible.

Las ventajas de esta técnica se pueden resumir así:

- 1.- Proporciona información de las relaciones existentes entre: a) las variables; b) entre los individuos; c) entre las variables y los individuos.
- 2.- Nos sugiere si existe alguna tendencia en los datos y qué variables están relacionadas con ella.
- 3.- Permite una transformación de los datos, en la cual, gran parte de la variación producida por numerosas variables se comprime en un número menor de variables.
- 4.- La transformación es tal, que las nuevas variables generadas o componentes, no están correlacionadas entre sí.
- 5.- Elimina, cuando sea posible, aquellas variables originales que aportan poco o nada a la investigación.

El análisis de componentes principales de los datos de los parentales en la campaña 2008/2009 mostró que los primeros dos componentes, en conjunto, explicaban

alrededor del 91% de la variabilidad fenotípica observada, con una contribución específica de 57 y 33,8 % de la variabilidad total, respectivamente. De acuerdo con los vectores propios, las variables originales se distribuyeron en 4 grupos dependiendo de su peso y el sentido de su influencia en cada una de las componentes principales (Figura 4). Dos de estos grupos se relacionan más directamente con caracteres de rendimiento (G1 y G3), mientras que los otros dos con caracteres de arquitectura de la planta (G2 y G4) (Figura 4).

El grupo G1 lo integran los caracteres NSP, YIELD, HSW, PL y NOP. Estos cinco caracteres están altamente correlacionados de forma positiva entre ellos. G3, por su parte, lo componen los caracteres PPN, SPP y PPP, que presentan una alta correlación entre ellos pero negativa con el grupo G1. Dentro de los caracteres de arquitectura de la planta, el grupo G2 lo componen los caracteres FPI, HLF y HLP que se correlacionan negativamente con NTP (G4).

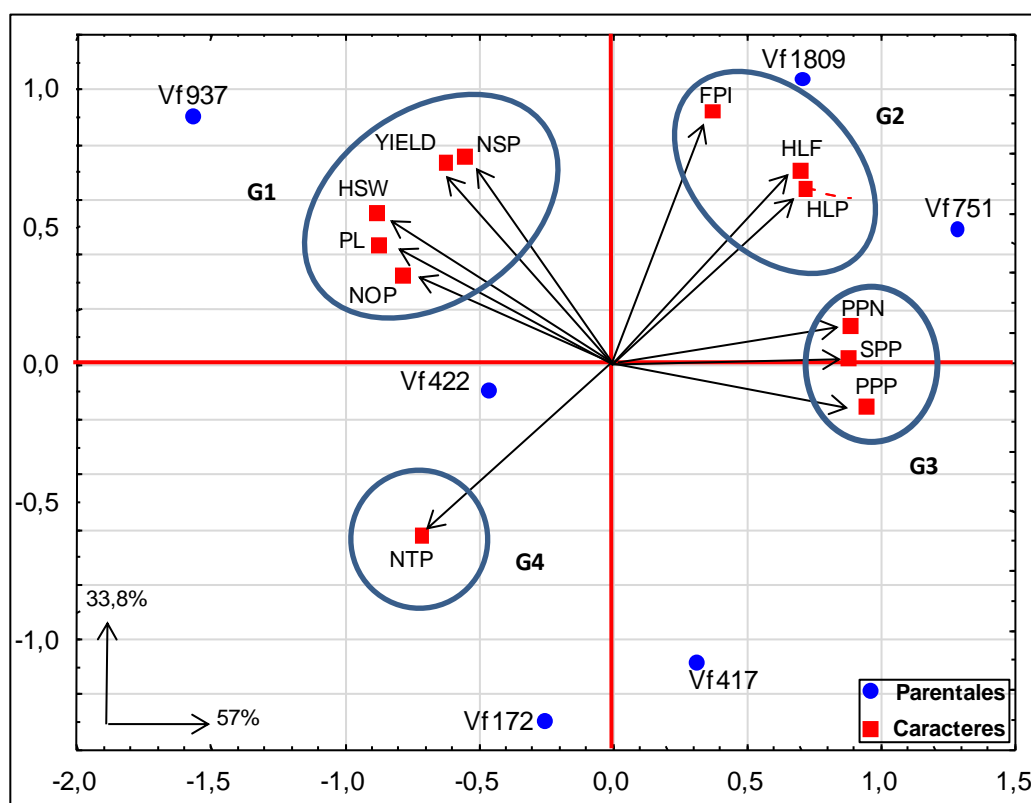


Figura 4: Scatterplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los datos de parentales evaluados en la campaña 2008/2009.

Los dos primeros ejes (PC1 y PC2) obtenidos tras el ACP de los datos de los parentales en la campaña 2008/2009 han separado los parentales en función de sus tipos botánicos. El tipo *major* (Vf937) está claramente definido por caracteres de rendimiento (G1) como el peso de las semillas, longitud de vainas, número de óvulos y granos por vaina. Los parentales Vf751 y Vf1809, tipo *minor* se caracterizan por ser

plantas con un gran número de flores por inflorescencia y una primera flor y primera vaina muy altas, tal y como indican los vectores del grupo G2, características ya descritas por Martín A (1976). En *paucijuga*, (Vf172) se evidencian las características descritas por Suso y Cubero (1986), tal como demuestra su relación positiva con G4, negativa con G1 y G2 y por debajo de la media para G3.

Los tipos Vf422 (tipo *equina*) y Vf417 (tipo *equina-minor*) son dos tipos botánicos intermedios como demuestra su posición respecto a los grupos formados por los caracteres (Fig. 4). Vf422 presenta semillas algo aplanadas, de tamaño grande, caracteres que acercan este tipo botánico al tipo *major*, sin llegar a igualarlo. Vf417, tipo botánico con características compartidas entre *equina* y *minor*, presenta semillas más pequeñas que *equina*, un poco menos aplanadas y más redondeadas. Los resultados obtenidos son los esperados para estos parentales.

Tabla 5: Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes tras el análisis ACP de los datos de los parentales en la campaña 2008/2009

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	.693	.717	-.011	-.068	.018
HLP	.711	.645	.116	-.252	-.041
NTP	-.717	-.614	.317	-.048	.074
FPI	.370	.924	.066	.024	-.070
PPN	.882	.143	-.429	-.111	.077
PPP	.948	-.149	.184	.192	-.095
NOP	-.790	.335	-.387	.328	-.084
NSP	-.558	.765	.030	.079	.310
PL	-.878	.437	-.025	-.180	-.065
HSW	-.822	.555	.093	-.072	-.057
SPP	.870	.316	.251	.276	.068
YIELD	-.629	.742	.191	.088	-.097

En la campaña 2009/2010 se mantiene, con respecto a la anterior, la distribución de los parentales y la relación de éstos con los caracteres agronómicos, presentando las características de los tipos botánicos ya descritas.

Nuevamente, con los dos primeros componentes se explicó alrededor del 90% de la variabilidad fenotípica observada (Figura 5). En esta ocasión se establecieron tres grupos de caracteres (G1 a G3 en Figura 5).

Tenemos un grupo (G1) formado por caracteres de arquitectura de la planta. Un gran grupo que compone prácticamente todos los caracteres de rendimiento (G2) y un tercer grupo formado por un carácter de rendimiento y otro de arquitectura (G3).

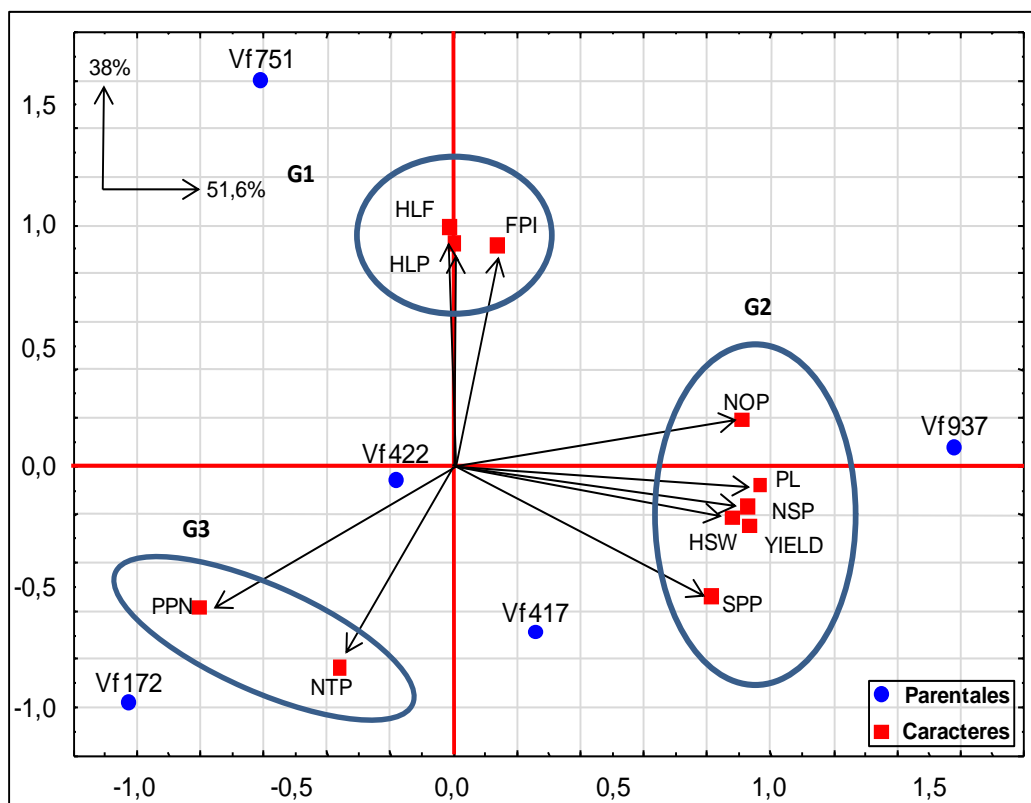


Figura 5: Scatterplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los datos de los parentales evaluados en la campaña 2009/2010.

El primer grupo (G1), integra caracteres de arquitectura de la planta como HLF, HLP y FPI. Estos tres caracteres están altamente correlacionados de forma positiva entre ellos. G1 prácticamente no presenta relación con la mayoría de los caracteres de G2 o muestran correlaciones negativas, tal y como ocurría en el análisis del año anterior. El grupo G2 abarca numerosos caracteres todos ellos de rendimiento, NOP, NSP, PL, YIELD, HSW y SPP.

El tercer grupo G3, formado por PPP (carácter de rendimiento) y NTP (carácter de arquitectura), correlacionados positivamente entre sí (0,820). Ambos, están correlacionados negativamente con los caracteres que componen los grupos G1 y G2.

En este año, el tipo *major* (Vf937) también está completamente definido por los caracteres de rendimiento (G2), ajustándose a un tipo con grandes vainas, con gran peso de granos y un alto rendimiento.

El genotipo *minor* evaluado (Vf751), al igual que el año anterior, mostró los caracteres que definen este tipo botánico: una primera flor y vaina altas y un elevado número de flores por inflorescencia como vemos en los vectores que definen G1. En cuanto a estos caracteres, los resultados muestran la inexistencia de correlación o correlación negativa entre el carácter de altura de primera flor y primera vaina y el rendimiento. Este hecho también se deducía de los resultados de la primera campaña y previamente fue descrito en habas por Martín A (1976), tras la evaluación de caracteres de interés agronómico en una serie de genotipos pertenecientes a los distintos tipos botánicos de la especie.

En cuanto Vf172, en la campaña 2009/2010, también muestra las características esperadas para su tipo botánico: un elevado número de ramas, numerosas vainas, aunque tengan un pésimo rendimiento. Muestran una relación negativa con los caracteres que componen G1 ya que son plantas muy bajas y con pocas flores, resultados que corresponden con lo esperado.

Al igual que ocurre en la campaña 2008/2009, los tipos botánicos Vf422 (*equina*) y Vf417 (*equina-minor*) se encuentran en posiciones intermedias con respecto a los caracteres, manteniendo las características que los definían en la campaña anterior.

Tabla 6: Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes de los caracteres evaluados en los parentales de la campaña 2009/2010

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-.020	.997	.069	.034	.000
HLP	.000	.935	.249	.255	.000
NTP	-.362	-.823	.018	.438	.000
FPI	.135	.926	-.164	.313	.000
PPP	-.805	-.573	.087	.127	.000
NOP	.906	.197	-.357	-.109	.000
NSP	.923	-.156	-.315	.157	.000
PL	.961	-.072	.255	.075	.000
HSW	.872	-.204	.445	-.004	.000
SPP	.808	-.529	-.205	.161	.000
YIEL	.934	-.240	.265	-.027	.000

En la Tabla 7 se resumen los principales resultados obtenidos de análisis de componentes principales de cada población F_2 y de alguna de las $F_{2:3}$ obtenidas.

Tabla 7: Vectores necesarios para explicar la información y los componentes más importantes para cada una de las poblaciones evaluadas en F_2 y $F_{2:3}$.

CRUZAMIENTO	CRUZAMIENTOS F_2				CRUZAMIENTOS $F_{2:3}$							
	Nº INDIVIDUOS	Nº DE VECTORES 90%	COEF DIRECTOR >0,85 EN 1ª COMPONENTE		COEF DIFRECTOR >0,5 EN 2ª COMPONENTE		Nº INDIVIDUOS	Nº DE VECTORES 90%	COEF DIRECTOR >0,85 EN 1ª COMPONENTE		COEF DIFRECTOR >0,5 EN 2ª COMPONENTE	
			Carácter	Coeficiente	Carácter	Coeficiente			Carácter	Coeficiente	Carácter	Coeficiente
Vf417xVf172	128	6 (90,05%)	SPP YIELD	0,915 0,870	HLP HLF NSP NOP	0,705 0,694 -0,567 -0,555	122	4 (90,17%)	HSW *	0,737	HLF HLP	0,777 0,650
Vf422xVf172	97	6 (88,26%)	SPP YIELD	0,904 0,894	HLP HLF	0,797 0,748	87	5 (92,72%)	HLP	0,872	HSW PL	0,868 0,848
Vf937xVf172	96	7 (92,78%)	YIELD SPP	0,919 0,888	PL NOP NSP HSW	0,720 0,650 0,632 0,503	90	5 (92,75%)	NOP *	0,808	HLP HLF PL NTP	-0,589 -0,600 0,550 0,673
Vf751xVf1809	97	6 (89,23%)	PL *	0,795	HLF HLP NTP PPP	0,776 0,74 -0,585 -0,56						
Vf1809xVf751	73	6 (88,00%)	YIELD	0,864	NSP NOP PPP	-0,678 -0,671 0,53						

* Cuando no hay ningún vector > 0,85 se pone el mayor

Tabla 7: Vectores necesarios para explicar la información y los componentes más importantes para cada una de las poblaciones evaluadas en F_2 y $F_{2:3}$ (Continuación)

CRUZAMIENTO	CRUZAMIENTOS F_2						CRUZAMIENTOS $F_{2:3}$					
	Nº INDIVIDUOS	Nº DE VECTORES 90%	COEF DIRECTOR >0,85 EN 1ª COMPONENTE		COEF DIFRECTOR >0,5 EN 2ª COMPONENTE		Nº INDIVIDUOS	Nº DE VECTORES 90%	COEF DIRECTOR >0,85 EN 1ª COMPONENTE		COEF DIFRECTOR >0,5 EN 2ª COMPONENTE	
			Carácter	Coeficiente	Carácter	Coeficiente			Carácter	Coeficiente	Carácter	Coeficiente
Vf751xVf417	43	6 (89,83%)	YIELD	0,964	NSP	0,682						
			SPP	0,954	PL	0,657						
			PPP	0,923	NOP	0,641						
					HSW	0,574						
					HLF	-0,635						
					HLP	-0,665						
Vf422xVf751	39	7 (92,73%)	YIELD	0,935	HLP	0,671						
			SPP	0,882	HLF	0,664						
					NOP	0,636						
					NSP	0,616						
					FPI	0,593						
Vf751xVf422	56	6 (88,86%)	YIELD	0,927	NSP	0,748	54	5 (93,68%)	NOP	0,865	HLP	0,890
					NOP	0,642			NSP	0,899	HLF	0,911
					PL	0,549						
					NTP	-0,532						
Vf1809xVf422	115	7 (90,80%)	SPP	0,903	HLF	0,833						
			YIELD	0,881	HLP	0,852						
Vf937xVf751	94	6 (89,42%)	YIELD	0,874	HLF	0,708	89	7 (92,97%)	NOP*	0,716	FPI	0,681
					HLP	0,69					HLF	0,716
					NTP	0,531					HLP	0,794

* Cuando no hay ningún vector > 0,85 se pone el mayor

Tabla 7: Vectores necesarios para explicar la información y los componentes más importantes para cada una de las poblaciones evaluadas en F_2 y $F_{2:3}$ (Continuación)

CRUZAMIENTO	CRUZAMIENTOS F_2						CRUZAMIENTOS $F_{2:3}$					
	Nº INDIVIDUOS	Nº DE VECTORES 90%	COEF DIRECTOR >0,85 EN 1ª COMPONENTE		COEF DIFRECTOR >0,5 EN 2ª COMPONENTE		Nº INDIVIDUOS	Nº DE VECTORES 90%	COEF DIRECTOR >0,85 EN 1ª COMPONENTE		COEF DIFRECTOR >0,5 EN 2ª COMPONENTE	
			Carácter	Coeficiente	Carácter	Coeficiente			Carácter	Coeficiente	Carácter	Coeficiente
Vf937xVf417	142	6 (88,10%)	YIELD	0,897	PL	-0,707	138	5 (88,04%)	PL	0,918	HLF	0,893
			SPP	0,88	HSW	-0,641					HLP	0,876
					NOP	-0,632						
					PPP	0,519						
Vf417xVf937	41	6 (90,17)	SPP	0,934	HLF	0,782	123	4 (94,21%)	NOP	0,882	HSW	0,801
			YIELD	0,896	HLP	0,644					PPP	0,709
			PPP	0,876	PL	-0,621						
					NSP	-0,572						
Vf937xVf422	70	6 (90,78%)	YIELD	0,912	HLP	0,793	71	5 (92,50%)	HLF *	0,746	NTP	0,522
			SPP	0,907	HLF	0,761					NOP	0,514
					PL	-0,588					NSP	0,650
					HSW	-0,579					PL	0,781
Vf422xVf937	102	7 (92,42%)	YIELD	0,946	HLF	0,711	107	3 (94,10%)	NOP	0,913	PPP	0,996
			SPP	0,931	HLP	0,692			PL	0,906		
			PPP	0,882	FPI	0,513			NSP	0,882		

* Cuando no hay ningún vector > 0,85 se pone el mayor

Lo primero que llama la atención es el alto número de componentes principales que son necesarias para explicar la variabilidad observada en las distintas poblaciones F_2 . De hecho, se precisan seis e incluso siete para explicar el 90% de la variación fenotípica observada (Tabla 7 y Anexo I; Tablas 1-28 y Figuras 1-14), lo que puede indicar que no existen bloques que expliquen la arquitectura genética de las poblaciones. Este hecho es de gran relevancia para los programas de mejora de la especie ya que implicaría la posibilidad de trabajar con los caracteres estudiados de manera independiente.

En la Tabla 7 se recogen los coeficientes de correlación de las variables que más aportan a las dos primeras componentes. Se observa como la variable transformada correspondiente al primer componente principal, en las poblaciones F_2 , viene definido principalmente por el rendimiento (yield) o por sus componentes, mientras que la segunda componente está más relacionada con caracteres de arquitectura de la planta como HLF y HLP, seguidos en importancia por caracteres también relacionados con el rendimiento como NSP y NOP. El carácter FPI, en general y sorprendentemente dado que existen notables diferencias entre los parentales empleados, tiene poco peso a la hora de explicar la variabilidad de las distintas poblaciones.

En cuanto a las $F_{2:3}$ evaluadas, los resultados no son del todo comparables ya que no se evaluaron los mismos caracteres que en F_2 y tampoco los mismos en todas las $F_{2:3}$ (ver Materiales y Métodos). El número de componentes principales necesarios para explicar el 90% de la variación sigue siendo elevado (de 3 a 5) (Tabla 7), aunque menor que en F_2 . Este hecho se podría explicar por el menor número de caracteres evaluados, aunque ya en otros trabajos se había descrito este descenso en el número de componentes necesarias para explicar la variabilidad observada en $F_{2:3}$. Por ejemplo, Martín A (1976) describió este hecho al analizar sus materiales y concluyó que podía deberse a que unos caracteres podían estar enmascarando a otros. Una continuación de este trabajo fue la desarrollada por Simorte et al. (1995). En él se determinó una arquitectura genética en bloques en las distintas generaciones. Este resultado es opuesto al obtenido en nuestro trabajo. Nuevamente, la diferencia en los caracteres evaluados puede ser la razón. Simorte et al. (1995) estudiaron seis caracteres, todos ellos íntimamente relacionados con el rendimiento. El menor número de caracteres puede explicar en parte las diferencias. Además, por otro lado, algunos de los seis caracteres medidos en ese trabajo presentan normalmente correlaciones positivas que puede significar que aunque estemos midiendo caracteres en principio distintos, en realidad lo que estemos haciendo sea medir un mismo carácter de distintas maneras.

La conclusión de mayor interés en el ACP realizado es que la agrupación de caracteres propia de los parentales desaparece en F_2 y $F_{2:3}$, sobre todo en F_2 , sugiriendo que no existe un fuerte ligamiento entre aquellos y que en las $F_{2:3}$ puede comenzar una reagrupación aunque sin repetir la constitución de los parentales

3. Aproximación al tipo de herencia

Además de estudios sobre los factores que influyen en la variabilidad fenotípica observada en los distintos cruzamientos, también se ha efectuado una aproximación al tipo de herencia de cada carácter. Aunque el estudio en profundidad de esta cuestión requeriría de una experimentación más completa, con la inclusión, entre otras cosas, de distintas generaciones de los dos distintos cruzamientos, la información preliminar obtenida en nuestro trabajo puede ser de interés a la hora de plantear futuros estudios.

En líneas generales y antes de ver los resultados con más detalle podemos decir que se observa una tendencia hacia efectos de dominancia, de distinto sentido dependiendo del carácter y del cruzamiento evaluado. Este hecho podría sugerir que estos caracteres están controlados por el mismo sistema génico en los distintos genotipos empleados. La información obtenida es de gran valor a la hora de seleccionar los cruzamientos apropiados para el estudio de cada carácter. La variabilidad observada en las distintas poblaciones también es una información necesaria para la selección de los distintos cruzamientos. En este apartado, intentaremos combinar los resultados obtenidos en este sentido para hacer una selección de las poblaciones que a priori serían idóneas para el estudio en profundidad de cada carácter.

3.1.- Altura de la primera flor (HLF) y Altura de la primera vaina (HLP)

Tanto HLF como, sobre todo, HLP tienen una gran importancia en la mejora del cultivo. En muchas ocasiones la recolección se realiza con la cosechadora de cereal por lo que gran parte de las vainas situadas cerca del suelo no se recogen, con la consiguiente merma de la producción. Por otra parte, estas mismas vainas en condiciones de alta humedad pueden llegar a pudrirse o desarrollar mayores niveles de enfermedad redundando de nuevo en la producción, tanto en la cantidad como en la calidad (Zdravkovic et al. 2005).

Ya hemos visto en los análisis ACP que HLF y HLP son caracteres de cierta importancia a la hora de explicar la variabilidad observada en los distintos cruzamientos.

En muchos casos se encuentran entre los caracteres más influyentes en las segundas componentes calculadas (Tabla 7).

Los parentales utilizados en los cruzamientos muestran diferencias importantes para la posición de la primera flor, oscilando entre los 3,22 nudos de Vf172 (*paucijuga*) y los 9,26 de Vf751 (*minor*) (Tabla 8). Estas diferencias se observan también al analizar los resultados de las poblaciones, con unos valores medios de población que oscilan entre 3,65 (Vf937xVf172) y 8,14 (Vf937xVf751) (Tabla 8). En el caso de altura de la primera vaina, Vf172 y Vf751 vuelven a presentar los valores extremos con valores medios de 3,5 y 9,33, respectivamente (Tabla 9). En cuanto a los cruzamientos, los valores medios oscilaron entre 4,51 (Vf422 x Vf172) y 9,81 (Vf937xVf751) (Tabla 9).

Tabla 8: Valores medios e intervalo de confianza para altura de primera flor (número de nudos) (HLF). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	4.58±0.16	4.63±0.50	3.22±0.42	d+
Vf422xVf172	4.36±0.19	4.97±0.39	3.22±0.42	d+
Vf937xVf172	3.65±0.22	5.02±0.27	3.22±0.42	d-
Vf751xVf1809	7.87±0.38	9.26±0.71	7.75±0.85	d-
Vf1809xVf751	7.58±0.33	7.75±0.85	9.26±0.71	d-
Vf751xVf417	6.07±0.37	9.26±0.71	4.63±0.50	d-
Vf422xVf751	5.17±0.43	4.97±0.39	9.26±0.71	d-
Vf751xVf422	5.16±0.031	9.26±0.71	4.97±0.39	d-
Vf1809xVf422	7.00±0.27	7.75±0.85	4.97±0.39	d+
Vf937xVf751	8.14±0.26	5.02±0.27	9.26±0.71	d+
Vf937xVf417	5.02±0.17	5.02±0.27	4.63±0.50	nv
Vf417xVf937	5.09±0.25	4.63±0.50	5.02±0.27	nv
Vf937xVf422	4.67±0.21	5.02±0.27	4.97±0.39	nv
Vf422xVf937	5.64±0.24	4.97±0.39	5.02±0.27	t+

d: dominancia; t: herencia transgresiva; + y -: sentido de una y otra; nv: no existe variación entre los parentales, ni se estos con la media de la F₂

Atendiendo a la distribución de los datos y al rango de los mismos, hemos seleccionado los cruzamientos que nos resultan más idóneos, siempre a priori, para futuros trabajos de detalle sobre los caracteres considerados en este caso. Las seleccionadas con estos criterios fueron: Vf751xVf1809, Vf1809xVf751 y Vf937xVf751 (Anexo II; págs 217-221 y págs 222-226).

Tabla 9: Valores medios e intervalos de confianza para altura de primera vaina (número de nudos) (HLP). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	4.67±0.18	5.65±0.57	3.5±0.44	d0
Vf422xVf172	4.51±0.19	5.83±0.55	3.5±0.44	d0
Vf937xVf172	4.06±0.30	5.32±0.30	3.5±0.44	d-
Vf751xVf1809	8.70±0.51	9.33±0.73	7.87±0.93	nv
Vf1809xVf751	8.08±0.39	7.87±0.93	9.33±0.73	nv
Vf751xVf417	7.66±0.82	9.33±0.73	5.65±0.57	d0
Vf422xVf751	6.43±0.51	5.83±0.55	9.33±0.73	d-
Vf751xVf422	5.71±0.42	9.33±0.73	5.83±0.55	d-
Vf1809xVf422	7.40±0.29	7.87±0.93	5.83±0.55	d+
Vf937xVf751	9.81±0.45	5.32±0.30	9.33±0.73	d+
Vf937xVf417	5.37±0.18	5.32±0.30	5.65±0.57	nv
Vf417xVf937	5.58±0.33	5.65±0.57	5.32±0.30	nv
Vf937xVf422	4.82±0.24	5.32±0.30	5.83±0.55	nv
Vf422xVf937	6.40±0.30	5.83±0.55	5.32±0.30	nv

d: dominancia; d0: ausencia de dominancia; + y -: sentido de una y otra; nv: no existe variación entre los parentales, ni se estos con la media de la F₂

En cuanto al tipo de herencia observada para HLF, el análisis de los datos obtenidos sugiere la existencia de dominancia de distinto signo dependiendo del cruzamiento analizado (Tabla 8; Figura 6). No se aprecia efecto materno, ya que los cruzamientos recíprocos analizados, además de mostrar el mismo tipo de herencia, muestran medias muy similares (Tabla 8).

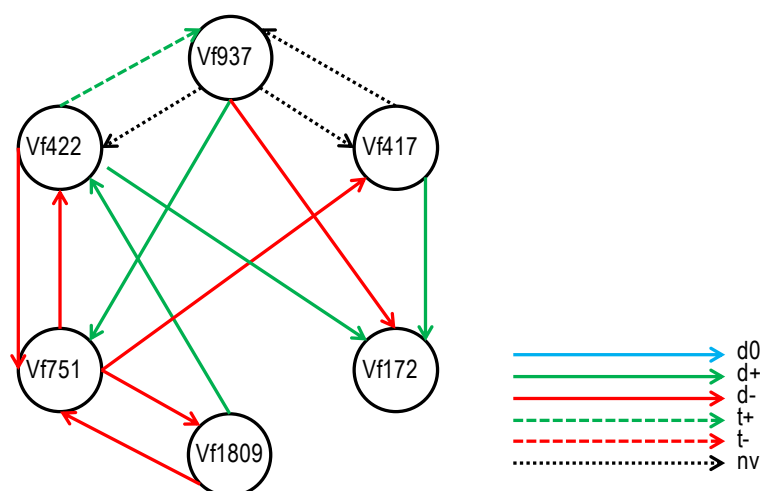


Figura 6: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Altura del primer nudo con flores (HLF) en las poblaciones F₂ evaluadas. Los distintos tipos de flecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

La única excepción la encontramos en cruzamientos Vf937xVf422 y recíproco que muestran distinto comportamiento. Pese a no detectarse diferencias entre sus parentales ya que los intervalos de confianza calculados solapan, en el caso del cruzamiento Vf422 x Vf937 nuestro criterio para la determinación del tipo de herencia (ver Materiales y Métodos) detecta una tendencia a la transgresión positiva: el intervalo de confianza de la F_2 no solapa con el de los parentales y muestra valores por encima de éstos. En este punto cabría resaltar que la diferencia calculada es pequeña y que el resultado obtenido habrá que tomarlo con cautela.

Resulta obvio que los caracteres HLF y HLP, en principio, deben estar muy relacionados: si una planta tiene un valor alto de HLF, indudablemente lo tendrá también de HLP. Por esta razón sería esperable que la herencia de los dos caracteres fuera del mismo tipo y sentido en cada cruzamiento, sin embargo no ocurre así. Para HLP se aprecia herencia intermedia (d0) en tres de los cruzamientos, dominancia negativa (d-) en otros tres y dominancia positiva (d+) en dos de las poblaciones. En seis de los cruzamientos evaluados no se apreciaron diferencias entre los parentales y de estos con la población F_2 .

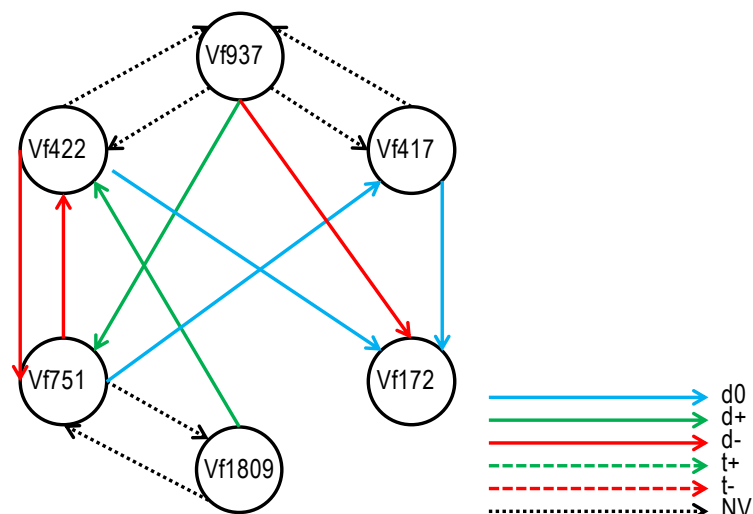


Figura 7: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Altura del primer nudo con vainas (HLP) en las poblaciones F_2 evaluadas. Los distintos tipos de flecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

Estos cambios observados se pueden explicar por el hecho de que hay más factores influyendo en HLP, que pueden hacer que la correlación con HLF no sea siempre tan alta como esperamos. Así por ejemplo, las habas son una especie parcialmente alógama con porcentajes que pueden oscilar entre el 5 y el 80%, dependiendo del genotipo evaluado (Susó y Moreno, 1999; Susó et al. 2001). En el

mismo contexto, un factor externo como la presencia de polinizadores en momentos clave del ciclo del cultivo también será importante en cuanto al cuajado de vainas, sobre todo para algunos genotipos. Por todo ello debemos tener en cuenta que cuando consideramos HLP quizás estemos evaluando distintos procesos complejos que a su vez pueden estar influenciados por las condiciones ambientales. En nuestro caso, los ensayos de evaluación de las poblaciones F_2 se han realizado en condiciones de autofecundación. La autofertilidad o capacidad de fecundación en ausencia de polinizadores, es un carácter cuyo estudio ya está siendo abordado por nuestro grupo (Dra. Torres, comunicación personal) por lo que en el futuro esperamos tener más información que nos permitan discernir entre los distintos fenómenos y por lo tanto llegar a un mejor estudio y conocimiento de los distintos factores que determinan HLP. En todo caso, es obvio que el carácter HLF depende de la constitución genética de la planta más directamente que el HLP pues éste es también función de la facilidad de polinización y de la autofertilidad de la planta, a su vez determinada por su propio sistema genético

La altura del primer nudo con vainas había sido previamente estudiada por Martín (1976). Dicho autor describió un tipo de herencia con dominancia total negativa que no se ajusta del todo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, que claramente dependen de cada cruzamiento evaluado. Además, sus resultados también mostraban un ligero efecto materno que tampoco concuerda con nuestros hallazgos.

3.2.- Flores por Inflorescencia (FPI)

La importancia de este carácter se debe a su relación con el rendimiento del cultivo, que es uno de los principales caracteres a tener en cuenta en cualquier programa de mejora. El rendimiento está determinado por gran cantidad de factores genéticos y se encuentra influenciado por el ambiente de ahí que para la selección se utilicen caracteres correlacionados con el rendimiento y con menor influencia ambiental, como el número de flores por inflorescencia (Simorte et al. 1995).

Los parentales de los cruzamientos mostraron un considerable nivel de variación, con valores medios que oscilaron entre 2,23 de la línea Vf172 (*paucijuga*) y 6,20 de Vf1809 (*minor*) (Tabla 10). A pesar de esta variación, los valores medios de los tipos *minor* (Vf1809 y Vf751) fueron algo menores de lo esperado, a tenor de los datos previos de nuestro grupo. De hecho, en la siguiente campaña, la línea Vf751 mostró un valor medio para FPI de 7,96, muy superior al obtenido en la campaña de evaluación de las F_2 que estamos considerando (5,75).

Tabla 10: Valores medios e intervalos de confianza para flores por inflorescencia (valor medio en cinco nudos) (FPI). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	3.21±0.10	2.96±0.30	2.15±0.15	d+
Vf422xVf172	3.43±0.12	3.97±0.23	2.15±0.15	d+
Vf937xVf172	3.52±1.84	4.35±0.28	2.15±0.15	d0
Vf751xVf1809	6.12±0.19	5.75±0.52	6.20±0.76	nv
Vf1809xVf751	6.35±0.20	6.20±0.76	5.75±0.52	nv
Vf751xVf417	4.31±0.19	5.75±0.52	2.96±0.30	d0
Vf422xVf751	4.56±0.19	3.97±0.23	5.75±0.52	d-
Vf751xVf422	3.96±0.20	5.75±0.52	3.97±0.23	d-
Vf1809xVf422	5.41±0.16	6.20±0.76	3.97±0.23	d+
Vf937xVf751	5.72±0.22	4.35±0.28	5.75±0.52	d+
Vf937xVf417	3.55±0.10	4.35±0.28	2.96±0.30	d-
Vf417xVf937	4.61±0.23	2.96±0.30	4.35±0.28	d+
Vf937xVf422	4.30±0.16	4.35±0.28	3.97±0.23	nv
Vf422xVf937	4.26±0.13	3.97±0.23	4.35±0.28	nv

d: dominancia; d0: ausencia de dominancia; + y -: sentido de una y otra; nv: no existe variación entre los parentales, ni se estos con la media de la F₂

Como ya hemos visto tras los análisis ACP, el carácter FPI no es de los que más aportan a la variación observada en las poblaciones evaluadas. Aún así, existen cruzamientos que mostraron un rango de variación interesante y una distribución continua de los datos idónea para continuar los estudios en el futuro. Destacan los dos cruzamientos realizados entre estas líneas *minor*. Aunque nos se observó variación entre los parentales y de éstos con las poblaciones F₂ atendiendo a los intervalos de confianza de las medias, (Tabla 10), las poblaciones presentaron rangos de variación amplios: 3,2-9,6 y 4,2-8,8 para Vf751xVf1809 y su recíproco respectivamente (Anexo II; págs 227-231) lo que sugiere una mayor diferencia genotípica que la fenotípica detectada en los parentales. Del mismo modo, el cruzamiento Vf937xVf751 también presenta un buen rango de variación (3,4-8,8) por lo que también puede resultar interesante. La población RIL derivada de esta F₂ evaluada cuenta con menos de 90 individuos por lo que, en cuanto a estudios moleculares, puede ser más adecuada para la validación de regiones o marcadores asociados con el carácter en distintos fondos genéticos.

La mayoría de los cruzamientos presentaron dominancia positiva sin que se observe segregación transgresiva en ningún caso (Tabla 10; Figura 8). Estos resultados no concuerdan con los descritos por Cubero (1970) y Martín y Cubero (1979) que describieron sobredominancia en sentido positivo en sus materiales. Trabajos posteriores

sí observaron, al igual que en nuestro trabajo, dominancia en sentido positivo para este carácter (Suso y Cubero, 1986; Torres et al. 1993).

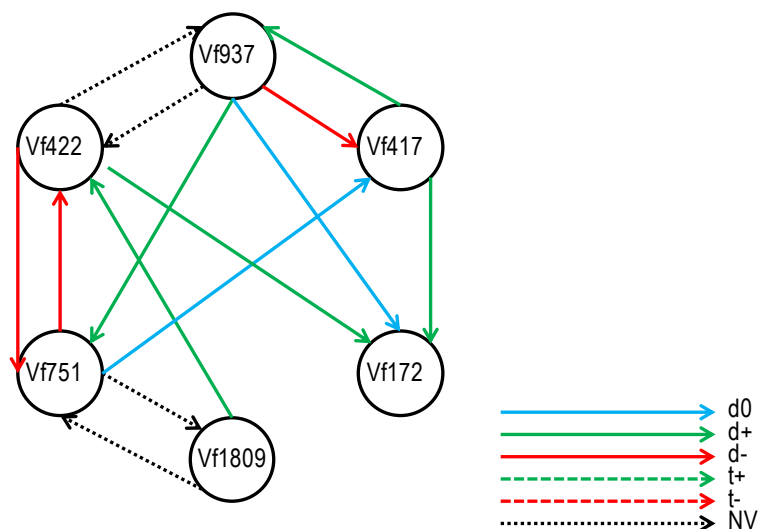


Figura 8: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Flores por inflorescencia (FPI) en las poblaciones F_2 evaluadas. Los distintos tipos de flecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

3.3.- Ramas totales (NTP)

Las malas hierbas compiten con los cultivos por los recursos disponibles (agua, radiación solar, nutrientes etc.). De ahí que su control sea un objetivo agronómico importante en cualquier cultivo. En muchas ocasiones se recurre al control químico en las distintas fases del cultivo lo que conlleva un coste importante tanto desde el punto de vista económico como ambiental. A este hecho se suma que cada vez hay menos materias activas permitidas con lo que los agricultores no pueden controlar la flora adventicia, siendo en ocasiones motivo para el abandono del cultivo (Dra. Alcantara, comunicación personal). En este contexto sería deseable el desarrollo de variedades con un elevado número de ramas totales, ya que estas líneas consiguen una mayor cobertura del terreno, lo que incide positivamente en el control de las malas hierbas.

Los valores medios obtenidos para las líneas parentales evaluadas se muestran en la Tabla 11. Llama la atención los resultados obtenidos ya que no concuerdan con lo esperado según el tipo botánico. En principio, los valores extremos debían corresponder a los genotipos *paucijuga* y *major*, con muchas y pocas ramas, respectivamente. Sin embargo, los genotipos Vf172 y Vf937 presentaron valores muy similares, incluso fue algo mayor el obtenido para la línea del tipo *major* (Vf937). Al mismo tiempo, los

genotipos pertenecientes al tipo *minor* mostraron los valores más pequeños, cuando en principio se les supone características intermedias. Dada, además, la gran influencia ambiental descrita para este carácter por otros autores (Toker 2004; Cruz-Izquierdo, 2009), consideramos que los resultados obtenidos deberán ser confirmados en sucesivos estudios. Las poblaciones RIL desarrolladas, en las que no habrá limitación de semillas, supondrán una gran oportunidad en este sentido.

A pesar de que en muchos casos los parentales muestran valores medios similares para este carácter (Tabla 11), muchos cruzamientos presentan un amplio rango de variación y una buena distribución del carácter (Anexo II; págs 232-236). Teniendo en cuenta estos criterios, los cruzamientos Vf937xVf172 y Vf937xVf417 serían buenos candidatos para futuros estudios (Anexo II, pág 232 y pág 235, respectivamente).

Tabla 11: Valores medios e intervalos de confianza para el Número de Ramas (NTP). Tipo de herencia estimada para el carácter.

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	4.94±0.29	4.26±0.64	3.90±0.56	nv
Vf422xVf172	4.70±0.40	3.83±0.57	3.90±0.56	nv
Vf937xVf172	5.28±0.44	4.0±0.54	3.90±0.56	t+
Vf751xVf1809	2.82±0.23	2.5±0.41	2.65±0.68	nv
Vf1809xVf751	2.97±0.20	2.65±0.68	2.5±0.41	nv
Vf751xVf417	4.11±0.53	2.5±0.41	4.26±0.64	d+
Vf422xVf751	2.43±0.20	3.83±0.57	2.5±0.41	d-
Vf751xVf422	3.78±0.45	2.5±0.41	3.83±0.57	d+
Vf1809xVf422	3.29±0.20	2.65±0.68	3.83±0.57	nv
Vf937xVf751	3.91±0.42	4±0.54	2.5±0.41	d+
Vf937xVf417	4.47±0.32	4±0.54	4.26±0.64	nv
Vf417xVf937	2.80±0.25	4.26±0.64	4±0.54	t-
Vf937xVf422	5.15±0.45	4±0.54	3.83±0.57	t+
Vf422xVf937	3.72±0.28	3.83±0.57	4±0.54	nv

d: dominancia; t: herencia transgresiva; + y -: sentido de una y otra; nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población F₂.

La ausencia de variabilidad entre parentales también se ha hecho patente al aplicar los criterios para estudiar el tipo de herencia en las distintas poblaciones. En concreto, este resultado se ha obtenido en diez de los catorce cruzamientos considerados. Tan sólo en tres de ellos (Vf937xVf172, Vf417xVf937 y Vf937xVf422) se observó herencia transgresiva de distinto signo según el caso (Tabla 11; Figura 9). No obstante, dadas las pequeñas diferencias encontradas entre los IC y la mencionada influencia ambiental en el

carácter, las tendencias observadas en nuestros ensayos deberán ser corroboradas en futuros estudios. Este razonamiento es extensible a todos los cruzamientos evaluados.

En estudios previos se habían descrito distintos tipos de herencia para NTP: Martín (1976) en sus materiales obtuvo herencia intermedia mientras que Cubero (1970) y Suso y Cubero (1986) describieron la existencia de dominancia parcial para este carácter.

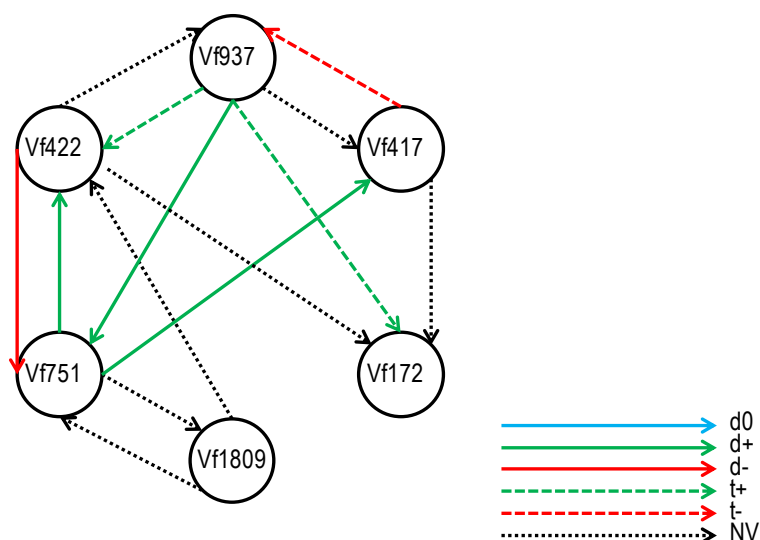


Figura 9: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de ramas (NTP) en las poblaciones F_2 evaluadas. Los distintos tipos de fecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

3.4.- Longitud de vaina (PL)

Los parentales utilizados presentan unos valores medios para longitud de vaina que oscilan entre los 55,2 mm (Vf417, *equina-minor*) a los 115,2 mm del tipo *major* (Vf937). El tipo botánico *paucijuga* (Vf172) presenta valores mayores de los esperados, mientras que los tipos botánicos *minor* (Vf751, Vf1809) y *equina-minor* (Vf417) presentan valores similares y poca variación en las poblaciones derivadas de sus cruzamientos (Tabla 12). Considerando los resultados obtenidos (Anexo II; págs 229-233), los cruzamientos más destacables para futuros estudios serían Vf937xVf172, Vf937xVf751 y Vf937xVf417, todo ellos con intervención del tipo *major*.

La dominancia fue el tipo de herencia más común en los cruzamientos analizados, siendo de carácter negativo en la mayor parte de los casos (Tabla 12). La tendencia a

vainas de menor longitud es el rasgo más destacable considerando el conjunto de los cruzamientos analizados.

Así mismo, se observan diferencias notables en las medias de las poblaciones de algunos cruzamientos recíprocos, por lo que se puede concluir la existencia de efecto materno. De hecho, el cruzamiento Vf937xVf422 presenta una media poblacional para longitud de vaina de 93,03 mm, mientras que su recíproco sólo alcanza los 65,02 mm (Tabla 12). El mismo efecto se aprecia entre los cruzamientos recíprocos Vf937xVf417 y Vf417xVf937, siendo la media mayor cuando la línea de tipo *major* (Vf937) actuó como madre. El efecto materno descrito también se confirma en la segregación de las poblaciones $F_{2:3}$ evaluadas para el carácter, tal y como se puede apreciar en los histogramas recogidos en el Anexo II (págs 237-241).

Tabla 12: Valores medios e intervalos de confianza para longitud de vaina (mm) (PL). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	62.65±1.15	55.82±3.58	64.67±7.83	nv
Vf422xVf172	72.44±1.58	85.89±5.07	64.67±7.83	d-
Vf937xVf172	80.92±2.65	115.2±8.63	64.67±7.83	d-
Vf751xVf1809	55.09±1.94	59.10±4.54	63.52±5.59	nv
Vf1809xVf751	61.13±2.17	63.52±5.59	59.10±4.54	nv
Vf751xVf417	63.23±2.04	59.10±4.54	55.82±3.58	nv
Vf422xVf751	73.54±2.72	85.89±5.07	59.10±4.54	d0
Vf751xVf422	63.06±2.28	59.10±4.54	85.89±5.07	d-
Vf1809xVf422	61.72±1.45	63.52±5.59	85.89±5.07	d-
Vf937xVf751	77.95±2.23	115.2±8.63	59.10±4.54	d-
Vf937xVf417	95.98±2.35	115.2±8.63	55.82±3.58	d+
Vf417xVf937	65.02±2.16	55.82±3.58	115.2±8.63	d-
Vf937xVf422	93.03±2.52	115.2±8.63	85.89±5.07	d-
Vf422xVf937	72.46±1.69	85.89±5.07	115.2±8.63	t-

d: dominancia; t: herencia transgresiva; + y -: sentido de una y otra; d0: ausencia de dominancia; nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población F₂.

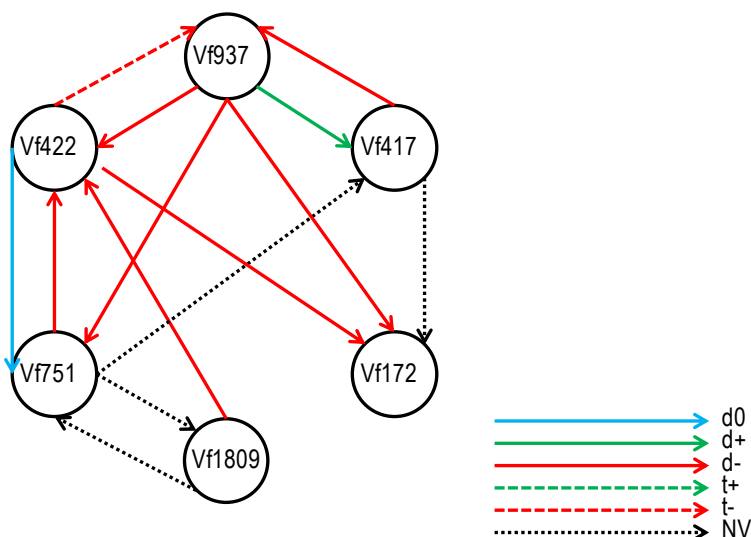


Figura 10: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Longitud de vaina (PL) en las poblaciones F_2 evaluadas. Los distintos tipos de fecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

3.5.- Número de Óvulos por vaina (NOP) y Número de Granos por Vaina (NSP)

Ambos caracteres son componentes del rendimiento del cultivo, de ahí el interés de su estudio. En general los parentales evaluados en nuestro trabajo no mostraron grandes diferencias, con un rango que osciló entre 2,76 (Vf417) y 4,67 (Vf937) para el número de óvulos por vaina y los 2,45 (Vf172) y los 3,88 (Vf937) para el número de granos por vaina (Tablas 13 y 14). Resulta destacable que el número de óvulos por vaina del tipo *paucijuga* sea de los más altos (4,07) mientras que presenta el menor número de granos por vaina (2,45). Esta diferencia sugiere un nivel de aborto de óvulos importante en las condiciones del estudio, a pesar de que es una planta muy autofértil (Cubero, 1974).

En general, el rango de variación en las poblaciones segregantes analizadas es estrecho para ambos caracteres (Anexo II; págs. 242-246 y págs. 247-251), situándose los valores en muchos casos entre 3 y 4. Considerando este limitado nivel de variación en los cruzamientos analizados es difícil recomendar cruzamientos para futuros estudios. Quizás sería bueno para estos caracteres el desarrollo de materiales que contrasten más para éstos y otros caracteres de vaina. Existen líneas con un alto NOP y NSP que se podrían incluir como parentales con este fin. Aún así atendiendo, de nuevo, al rango de valores obtenidos para cada población y a la distribución de los mismos parece que los cruzamientos más idóneos para futuros estudios son aquellos en los que el tipo *major*

actúa como madre: Vf937xVf172, Vf937xVf751 y Vf937xVf417, así como el cruzamiento Vf1809xVf422.

Tabla 13: Valores medios e intervalos de confianza para óvulos por vaina (NOP). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	3.19±0.07	2.76±0.15	4.07±0.75	d-
Vf422xVf172	3.27±0.07	3.88±0.49	4.07±0.75	t-
Vf937xVf172	4.18±0.11	4.67±0.34	4.07±0.75	nv
Vf751xVf1809	3.69±0.12	2.95±0.40	3.88±0.15	d+
Vf1809xVf751	3.62±0.09	3.88±0.15	2.95±0.40	d+
Vf751xVf417	3.08±0.10	2.95±0.40	2.76±0.15	nv
Vf422xVf751	3.4±0.12	3.88±0.49	2.95±0.40	d0
Vf751xVf422	2.80±0.09	2.95±0.40	3.88±0.49	d-
Vf1809xVf422	4.62±0.20	3.88±0.15	3.88±0.49	t+
Vf937xVf751	3.85±0.11	4.67±0.34	2.95±0.40	d0
Vf937xVf417	4.15±0.08	4.67±0.34	2.76±0.15	d+
Vf417xVf937	3.23±0.07	2.76±0.15	4.67±0.34	d-
Vf937xVf422	3.05±0.09	4.67±0.34	3.88±0.49	t-
Vf422xVf937	3.50±0.07	3.88±0.49	4.67±0.34	nv

d: dominancia; t: herencia transgresiva; + y -: sentido de una y otra; d0: ausencia de dominancia; nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población F₂.

En cuando al tipo de herencia, en la bibliografía se han descrito distintos tipos para NOP. Así, Cubero (1970), reportó dominancia total en sentido positivo tras evaluar el carácter en material F₁ obtenido a partir de cruzamientos entre parentales de grano pequeño, mientras que Martín (1976) observó herencia intermedia que podía llegar a superdominancia en sentido positivo en algunas de sus poblaciones. Por su parte Torres et al. (1993) también detectó herencia intermedia y algún caso de dominancia parcial en sentido negativo al evaluar sus materiales. En los tres trabajos citados se describió superdominancia en sentido positivo para el carácter NSP.

En nuestro trabajo, dependiendo de las poblaciones consideradas, hemos estimado distintos tipos de herencia para los dos caracteres (Tablas 13 y 14). Para NOP predominan los efectos de dominancia de distinto sentido según el cruzamiento. También hemos detectado sobredominancia, incluso algún caso de herencia intermedia. Como ya hemos visto, todos estos tipos ya han sido descritos en la bibliografía para el número de óvulos por vaina. En el caso de NSP, hemos detectado sobredominancia positiva tan solo en tres de los 14 cruzamientos evaluados. Para el resto, la tendencia es hacia la dominancia, de nuevo, de distinto sentido según cada caso. Incluso en los casos donde la

utilización estricta del criterio para la determinación de la herencia ha detectado sobredominancia para estos caracteres hay que hacer notar que en todos ellos, aunque se cumplen los requisitos fijados, las diferencias entre los IC de las F_2 y los parentales son muy pequeñas (Tablas 13 y 14) y que la tendencia podría ser más hacia la dominancia que hacia la transgresión.

Tabla 14: Valores medios e intervalos de confianza para número de semillas por vaina (NSP). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F_2	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	2.80±0.09	2.49±0.19	2.45±0.22	t+
Vf422xVf172	2.98±0.08	2.66±0.17	2.45±0.22	t+
Vf937xVf172	3.48±0.15	3.88±0.38	2.45±0.22	d+
Vf751xVf1809	3.16±0.16	2.65±0.35	3.2±0.32	nv
Vf1809xVf751	3.10±0.12	3.2±0.32	2.65±0.35	nv
Vf751xVf417	2.77±0.12	2.65±0.35	2.49±0.19	nv
Vf422xVf751	3.00±0.14	2.66±0.17	2.65±0.35	t+
Vf751xVf422	2.49±0.11	2.65±0.35	2.66±0.17	nv
Vf1809xVf422	2.98±0.16	3.2±0.32	2.66±0.17	d0
Vf937xVf751	2.89±0.14	3.88±0.38	2.65±0.35	d-
Vf937xVf417	3.40±0.11	3.88±0.38	2.49±0.19	d+
Vf417xVf937	2.44±0.15	2.49±0.19	3.88±0.38	d-
Vf937xVf422	2.79±0.10	3.88±0.38	2.66±0.17	d-
Vf422xVf937	3.16±0.09	2.66±0.17	3.88±0.38	d-

d: dominancia; t: herencia transgresiva;+ y -: sentido de una y otra; nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población F_2 .

Si observamos los resultados obtenidos para los cruzamientos recíprocos, la diferencia de medias entre los cruzamientos de las líneas Vf937 y Vf417 podría ser significativa, sobre todo teniendo en cuenta el efecto materno descrito para longitud de vaina (Tablas 13 y 14). Para NOP se puede observar el mismo efecto en los cruzamientos Vf422xVf751 y recíproco, siendo más difícil determinarlo para NSP ya que aunque se aprecian diferencias entre las medias de las dos poblaciones, las de los parentales son muy similares. Trabajos previos en el grupo también habían descrito la existencia de efecto materno para el número de óvulos por vaina (Martín 1976; Cubero y Martín 1981).

Es notable el hecho de que en diversos estudios a lo largo de un lapso de tiempo considerable se hayan obtenido siempre sistemas genéticos discordantes. Dado que tanto el número de óvulos por ovario como el de semillas son caracteres de la mayor

importancia en la reproducción de la especie, su naturaleza adaptativa es clara y de ahí que se hayan podido fijar sistemas genéticos distintos en los distintos ambientes.

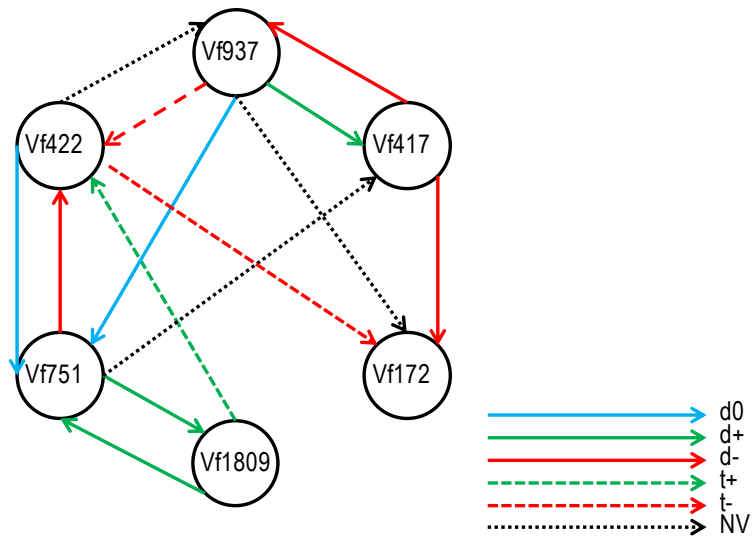


Figura 11: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de Óvulos por Vaina (NOP) en las poblaciones F_2 evaluadas. Los distintos tipos de fecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

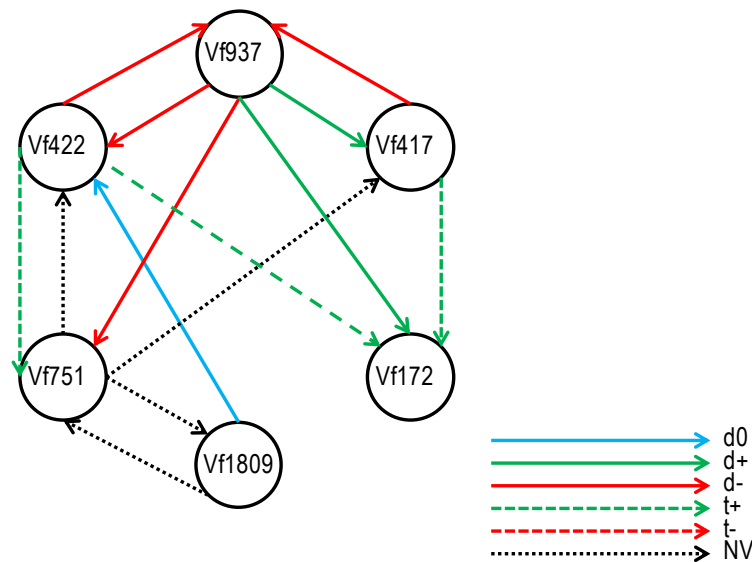


Figura 12: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de Semillas por Vaina (NSP) en las poblaciones F_2 evaluadas. Los distintos tipos de fecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

3.6.- Peso de 100 granos (HSW)

Este carácter es uno de los principales componentes del rendimiento (Cubero y Martín, 1981), de ahí el interés de su estudio, que pueda redundar en el programa de mejora de la especie.

El análisis de los parentales mostró que la línea Vf1809 presentaba el menor valor medio para este carácter (37,74 g), mientras que la línea Vf937 presentaba los valores mayores (132,7 g) como corresponde a su tipo *major* (Tabla 15). En la línea de otros caracteres estudiados, la semilla del parental *paucijuga* empleada tampoco se ajusta a lo esperado por su tipo botánico. Para estos genotipos, se esperan granos que no superen los 0,2 g por grano, o lo que es lo mismo: menos de 20 g de peso para los 100 granos. El parental Vf172 evaluado presentó valores para este carácter de 49,48 g, superiores incluso a las medias obtenidas para los genotipos del tipo *minor* o *equina-minor* (Tabla 15). Por todo ello, aunque la línea Vf172, en general, se ajusta a las características de su tipo según el análisis de componentes principales realizado (Figuras 2 y 3), conviene tener en cuenta lo expuesto a la hora de interpretar los resultados.

Tabla 15: Valores medios e intervalos de confianza para Peso de 100 Semillas (gr) (HSW). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	64.82±2.17	47.54±4.81	49.48±7.38	t+
Vf422xVf172	64.96±2.59	89.49±4.93	49.48±7.38	d-
Vf937xVf172	64.41±3.84	132.66±9.36	49.48±7.38	d-
Vf751xVf1809	36.04±1.59	47.4±3.69	37,74±5,29	d-
Vf1809xVf751	41.47±2.88	37,74±5,29	47.4±3.69	d0
Vf751xVf417	55.96±2.19	47.4±3.69	47.54±4.81	t+
Vf422xVf751	65.70±4.77	89.49±4.93	47.4±3.69	d0
Vf751xVf422	64.15±2.31	47.4±3.69	89.49±4.93	d-
Vf1809xVf422	42.82±1.49	37,74±5,29	89.49±4.93	d-
Vf937xVf751	62.18±2.81	132.66±9.36	47.4±3.69	d-
Vf937xVf417	104.36±3.50	132.66±9.36	47.54±4.81	d+
Vf417xVf937	98.09±4.89	47.54±4.81	132.66±9.36	d+
Vf937xVf422	111.03±4.17	132.66±9.36	89.49±4.93	d0
Vf422xVf937	65.47±2.04	89.49±4.93	132.66±9.36	t-

d: dominancia; t: herencia transgresiva; + y -: sentido de una y otra; d0: ausencia de dominancia; nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población .

La explicación más verosímil a este fenómeno es que durante un periodo de tiempo, donde no se incluyó la línea en estudios como este, se fuera recogiendo semillas de las plantas con mayor cantidad favoreciendo inconscientemente el mayor tamaño de grano pero no el de la planta. Es decir se ha podido repetir el proceso de diversificación por selección automática.

La variabilidad disponible en las poblaciones segregantes analizadas es notable (Tabla 15, Anexo II; págs. 252-256). En general, los cruzamientos en los que interviene la línea Vf937 presentan un buen rango de variación y una buena distribución del carácter (Anexo II; págs. 252, 255 y 256), por lo que cualquiera de ellos sería un buen candidato para futuros estudios.

La dominancia vuelve a ser el sistema genético más habitual si bien se observan casos de segregaciones transgresivas (Tabla 15). Martín y Cubero (1979), describieron sentido negativo para la dominancia. En nuestro estudio este sentido ha sido el más repetido aunque también se han detectado casos de dominancia positiva e incluso de herencia intermedia. Cubero (1970) también describió dominancia en sentido positivo para este carácter. Parece patente la existencia de una gran variedad en la base genética de este carácter.

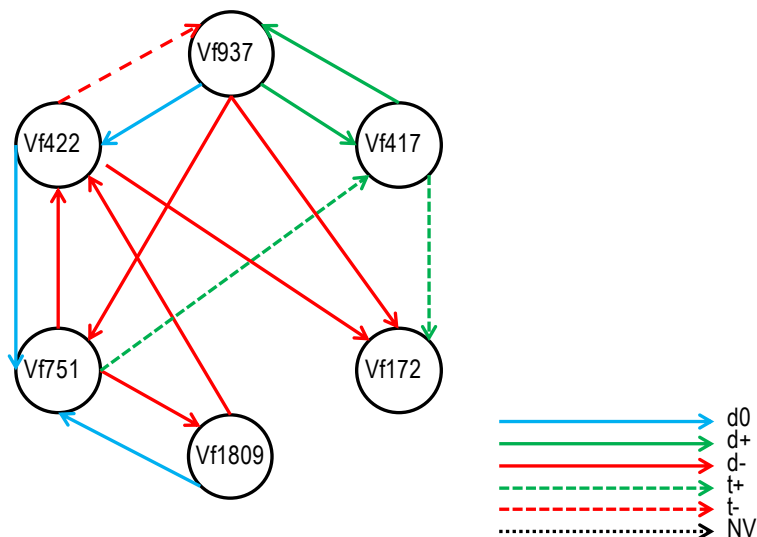


Figura 11: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Peso de 100 granos (HSW) en las poblaciones F_2 evaluadas. Los distintos tipos de flecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

Como se ha descrito en otros caracteres anteriormente, existen diferencias notables para las medias de los cruzamientos recíprocos de las líneas Vf937 y Vf422 (Tabla 15). De hecho, el cruzamiento Vf937xVf422 presenta una media de 111,0 g para el peso de 100 semillas, mientras que este valor desciende hasta los 65,47 g en el cruzamiento recíproco. El mismo efecto se confirma para los cruzamientos Vf937xVf417 y recíproco, indicando un efecto materno importante, pero que es dependiente de los parentales involucrados, ya que la influencia materna no es evidente en el resto de cruzamientos recíprocos analizados (Tabla 15).

3.7.- Número de vainas por planta (PPP) y Grano totales (SPP)

Al igual que ocurre con el peso de 100 granos, el número de vainas y de granos por planta tienen una gran influencia en el rendimiento. Estos caracteres son totalmente dependientes del ambiente (Suso y Cubero, 1986) por lo que la disponibilidad de poblaciones como las RIL que permitan el control de la influencia ambiental es un objetivo prioritario para abordar el control genético de ambos caracteres. Por otra parte, a la hora de considerar nuestros resultados debemos tener en cuenta la forma de cultivo de las poblaciones evaluadas. Todas ellas se han sembrado y evaluado en condiciones de autofecundación por lo que los caracteres que estamos considerando van a depender principalmente de la autofertilidad de cada genotipo, al no haber posibilidad de polinización cruzada. El estudio de estos caracteres en condiciones más parecidas a las reales de cultivo podría ser más informativo para el programa de mejora, siempre teniendo en cuenta que en, ese caso, se introduce como factores importantes la presencia y la eficacia de los polinizadores. Todo ello, sin olvidar el estudio de la autofertilidad en sí misma ya que cuanto mayor sea el conocimiento de todos los factores que influyen en la producción final del cultivo, más eficientes podrán ser las estrategias de mejora.

En las Tablas 16 y 17 se presentan los resultados obtenidos con los datos recopilados. Se detectaron amplios rangos de variación, incluso dentro de los parentales, como se aprecia por la amplitud de los intervalos de confianza calculados. Este hecho nos lleva, salvo en contadas excepciones, a no detectar variación entre parentales y de éstos con la media de la población. Trabajos previos habían descrito sobredominancia positiva para el número de vainas totales (Martín y Cubero, 1979) y dominancia en el mismo sentido para el número de granos (Suso y Cubero, 1986). La discordancia apunta de nuevo a una gran complejidad genética, lógica dada la naturaleza del carácter.

Tabla 16: Valores medios e intervalos de confianza para Número de Vainas por Planta (PPP). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	25.76±2.13	28.33±7.31	23.68±4.75	nv
Vf422xVf172	25.59±3.53	23.82±5.25	23.68±4.75	nv
Vf937xVf172	19.92±2.12	15±4.34	23.68±4.75	nv
Vf751xVf1809	35.97±3.66	29.08±6.92	29.57±17.21	nv
Vf1809xVf751	26.68±3.54	29.57±17.21	29.08±6.92	nv
Vf751xVf417	35.60±9.15	29.08±6.92	28.33±7.31	nv
Vf422xVf751	26.51±3.50	23.82±5.25	29.08±6.92	nv
Vf751xVf422	34.17±4.44	29.08±6.92	23.82±5.25	nv
Vf1809xVf422	28.19±2.64	29.57±17.21	23.82±5.25	nv
Vf937xVf751	23.5±3.51	15±4.34	29.08±6.92	d0
Vf937xVf417	17.73±1.78	15±4.34	28.33±7.31	d-
Vf417xVf937	20.70±2.96	28.33±7.31	15±4.34	d0
Vf937xVf422	23.14±2.86	15±4.34	23.82±5.25	nv
Vf422xVf937	27.05±2.37	23.82±5.25	15±4.34	nv

d-: dominancia de signo negativo; d0: ausencia de dominancia; nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población.

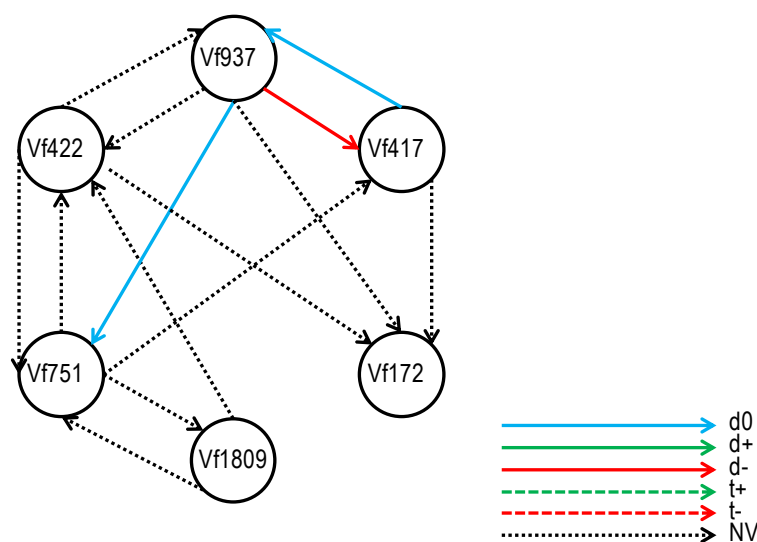


Figura 14: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Número de Vainas por Planta (PPP) en las poblaciones F₂ evaluadas. Los distintos tipos de flecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

Tabla 17: Valores medios e intervalos de confianza para granos totales (SPP). Tipo de herencia estimada para el carácter

	F ₂	P1	P2	Herencia
Vf417xVf172	60.98±5.25	61.5±18.23	51.81±11.70	nv
Vf422xVf172	63.93±7.39	54.55±13.06	51.81±11.70	nv
Vf937xVf172	54.53±5.98	48.96±13.50	51.81±11.70	nv
Vf751xVf1809	87.59±9.64	65.16±18.92	71.00±44.21	nv
Vf1809xVf751	62.83±9.05	71.00±44.21	65.16±18.92	nv
Vf751xVf417	69.41±13.92	65.16±18.92	61.5±18.23	nv
Vf422xVf751	61.35±9.54	54.55±13.06	65.16±18.92	nv
Vf751xVf422	65.44±8.05	65.16±18.92	54.55±13.06	nv
Vf1809xVf422	62.76±6.92	71.00±44.21	54.55±13.06	nv
Vf937xVf417	46.39±5.04	48.96±13.50	61.5±18.23	nv
Vf417xVf937	46.24±7.01	61.5±18.23	48.96±13.50	nv
Vf937xVf422	52.88±6.37	48.96±13.50	54.55±13.06	nv
Vf422xVf937	68.44±6.29	54.55±13.06	48.96±13.50	nv

nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población .

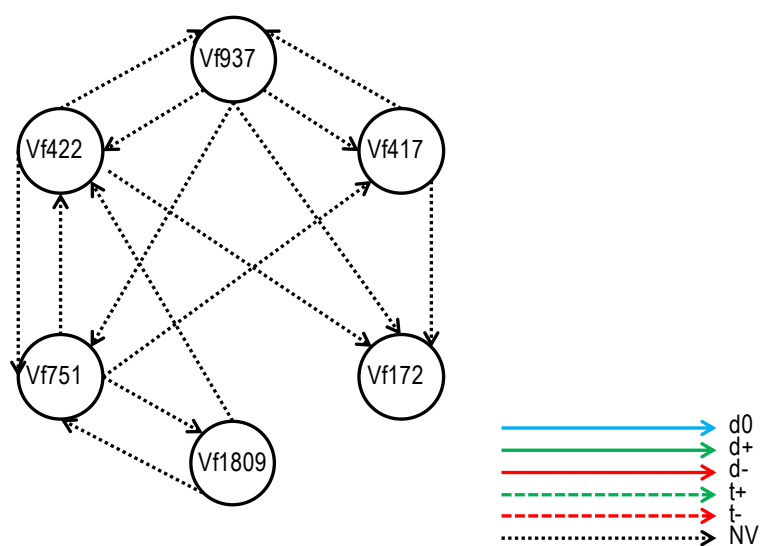


Figura 15: Representación del tipo de herencia estimada para el carácter Granos Totales (SPP) en las poblaciones F₂ evaluadas. Los distintos tipos de flecha representan los tipos de herencia, según la leyenda de la figura en la que d= dominancia, t= transgresión y NV= inexistencia de variación para el carácter entre los parentales y entre éstos y la población evaluada. Cada flecha representa un cruzamiento, siendo el origen el parental femenino y el final, el masculino.

Tabla 18: Tabla resumen de las herencias esperadas para los caracteres agronómicos estudiados

		HLF	HLP	FPI	NTP	PL	NOP	NSP	HSW	PPP	SPP
Vf417xVf172	Em x P	d+	d0	d+	nv	nv	d-	t+	t+	nv	nv
Vf422xVf172	Eq x P	d+	d0	d+	nv	d-	t-	t+	d-	nv	nv
Vf937xVf172	Mj x P	d-	d-	d0	t+	d-	nv	d+	d-	nv	nv
Vf751xVf1809	mm x m	d-	nv	nv	nv	nv	d+	nv	d-	nv	nv
Vf1809xVf751	m x mm	d-	nv	nv	nv	nv	d+	nv	d0	nv	nv
Vf751xVf417	mm x Em	d-	d0	d0	d+	nv	nv	nv	t+	nv	nv
Vf422xVf751	Eq x mm	d-	d-	d-	d-	d0	d0	t+	d0	nv	nv
Vf751xVf422	mm x Eq	d-	d-	d-	d+	d-	d-	nv	d-	nv	nv
Vf1809xVf422	m x Eq	d+	d+	d+	nv	d-	t+	d0	d-	nv	nv
Vf937xVf751	Mj x mm	d+	d+	d+	d+	d-	d0	d-	d-	d0	
Vf937xVf417	Mj x Em	nv	nv	d-	nv	d+	d+	d+	d+	d-	nv
Vf417xVf937	Em x Mj	nv	nv	d+	t-	d-	d-	d-	d+	d0	nv
Vf937xVf422	Mj x Eq	nv	nv	nv	t+	d-	t-	d-	d0	nv	nv
Vf422xVf937	Eq x Mj	t+	nv	nv	nv	t-	nv	d-	t-	nv	nv

d: dominancia; t: herencia transgresiva; nv: sin variación entre parentales y de éstos con la población

CONCLUSIONES

Cruzamientos entre líneas de *V. faba* que incluían distintos orígenes geográficos y diferentes formas botánicas se habían realizado en estudios anteriores con objetivos diversos: conocer el tipo de herencia de los caracteres que separan los cultivares actuales de las primitivas cercanas al hipotético parental silvestre (de ahí el uso como parental de las formas *paucijuga*), analizar los componentes del rendimiento y estudiar las posibilidades en la mejora de la especie de las variedades locales recogidas en las regiones de cultivo antiguas y modernas. El presente trabajo se centra en este último objetivo, si bien, como los demás, la información obtenida es más amplia y solapa con los dos anteriores.

El hecho de que los estudios que aquí se resumen se hayan llevado a cabo a lo largo de más de treinta años, por distintos equipos, diferentes líneas salvo alguna excepción y diversos métodos confiere gran valor a los resultados conseguidos aunque, como se verá en estas conclusiones, a pesar de la más que aceptable homogeneidad que muestran dichos estudios, no presenten la claridad que todo genetista, siempre con las Leyes de Mendel ante sí, desea para explicar la herencia de los caracteres que maneja.

Conviene decir, ante todo, que estudios previos ya demostraron que la variación que muestra *V. faba* obedece principalmente a diferencias regionales debidas a la selección practicada en los distintos lugares en que se cultiva y no a diferencias botánicas; todos los estudios de genética llevados a cabo apuntan en esa dirección, y el de Serradilla et al. (1993) con marcadores isoenzimáticos lo confirma. La taxonomía propuesta por Muratova (1931), de enorme valor en cuanto la sistematización llevada a cabo en su estudio (que manejó variedades locales auténticamente primitivas), se ha mostrado artificial al estudiar la genética de los caracteres que la investigadora rusa creyó esencialmente diferenciales; en efecto, tanto el número de folíolos por hoja que separa sus dos subespecies, *paucijuga* y (*eu*)*faba* como la relación grosor/longitud del grano que discrimina entre las variedades botánicas de la segunda han resultado ser puros caracteres cuantitativos. Las dos subespecies de Muratova no son consideradas hoy como tal sino simples variedades conseguidas por mera selección humana siguiendo criterios locales; la especie es, en realidad, un único complejo génico sin barreras evolutivas. Todas las formas pueden cruzarse entre sí sin pérdida de fertilidad, algo que, como veremos, justifica en gran parte la dificultad de interpretación de los sistemas genéticos resultantes.

Los resultados del presente trabajo se comentan a continuación con los obtenidos por otros autores: Hobbs y Burnett (1982) con tres series de líneas derivadas de variedades locales afganas, rusas y europeas (los cruzamientos se realizaron dentro de cada grupo); Martín y Cubero (1979) con líneas de las cuatro variedades botánicas de Muratova (*paucijuga*, considerada como simple variedad y no como subespecie, *minor*, *equina* y *major*); los dos estudios mencionados se enfocaron principalmente a componentes del rendimiento. Desde un punto de vista genético, Suso et al. (1983, 1984, 1986) y Suso y Cubero (1986) con dos grupos de líneas, uno derivado de variedades primitivas (incluyendo *paucijuga*) y otro de cultivares modernos. He aquí un resumen de los resultados; a notar, la presencia constante de dominancia parcial (débil) tanto positiva como negativa (mencionada como asimetría en la dominancia) sin patrón discernible, tendencia en algunos casos a herencia transgresiva¹, fuerte acción ambiental y frecuente falta de variación entre parentales (en parte debida a la acción ambiental, pero en buena parte también a constitución genética) que impide el análisis:

1. Altura del primer nudo con flores. No estudiado más que en el presente trabajo (agronómicamente, el carácter importante es el de la primera vaina, pero éste último depende de la fertilidad de la planta y de la presencia de polinizadores, en tanto que la primera flor está mucho más cerca de la estructura genética). Dominancia positiva (flor alta sobre baja) y negativa (al contrario) según cruzamientos, sin patrón discernible.
2. Altura del primer nudo con vaina. Dominancia negativa, positiva o nula según cruzamientos, sin patrón discernible y ausencia de variación entre parentales en casi la mitad de los casos. Coincide con Martín y Cubero (1979): dominancia negativa (baja sobre alta), con fuerte efecto ambiental.
3. Número de flores por inflorescencia. Dominancia negativa, positiva o, en menos casos, nula según cruzamientos, sin patrón discernible. Los demás estudios coinciden en la asimetría, aunque algunos detectan más dominancia positiva débil, pero con asimetría presente, sobre todo en variedades rusas., así como casos de herencia transgresiva.

¹ En otros estudios se menciona *superdominancia* o bien *heterosis*: la primera es, en estos estudios, pura elucubración al consistir en que, por cada par de alelos, el heterocigoto tienen un valor mayor que ambos homocigotos; la heterosis o vigor híbrido está ocasionada por la interacción entre genes diferentes, efecto bien visible y aprovechado comercialmente; al manejar F₂, de lo que se puede hablar es de *herencia transgresiva* motivada por complementación génica y, en buena parte, por la propia heterosis residual tras la segregación.

4. Número de ramas por planta. Casi la mitad de casos sin variación significativa entre parentales. Dominancia y hasta herencia transgresiva de ambos signos. Otros estudios muestran una situación asimismo caótica: escasa dominancia (de haberla, de sentido positivo), interacciones génicas (señal de heterogeneidad génica) y gran influencia ambiental, todo ello contribuyendo a oscurecer los resultados.
5. Longitud de la vaina. Sólo estudiada en el presente trabajo. Dominancia negativa salvo dos casos (positiva y nula); en una cuarta parte de los cruzamientos no se registró variación significativa entre parentales.
6. Óvulos por vaina (ovario). Es otro carácter en que se encuentra gran discordancia entre cruzamientos: todas las tendencias en dominancia y transgresividad. Martín y Cubero (1979), por el contrario, encontraron, manejando líneas de todos los grupos botánicos, dominancia completa positiva. Es obvio que el resultado depende fuertemente de los parentales elegidos.
7. Semillas por vaina. Resultados asimismo dependientes del cruzamiento, registrándose, como en el caso anterior, todas las posibilidades, si bien la tendencia a la transgresividad es siempre positiva. Otros estudios detectan escasa dominancia positiva y dudosa tendencia a herencia transgresiva. Muestra de la confusión es el resultado de Hobbs y Burnett (1982): dominancia asimétrica (es decir, de ambos signos) según orígenes de los parentales y heredabilidades desde 0.10 a 0.67.
8. Peso de 100 granos. Es equivalente, dada la alta correlación existente, al índice grosor/longitud de tanta importancia en la taxonomía de Muratova así como al tamaño del grano. En el presente estudio se registran más casos de dominancia negativa (grano menor dominante sobre mayor), pero también de positiva y nula, con transgresividad de ambos signos, todo ello sin patrón discernible. Salvo en las poblaciones de origen afgano estudiadas por Hobbs y Burnett (1982), en que detectan dominancia parcial positiva, los demás estudios encuentran dominancia parcial negativa, algo lógico, pues a menor tamaño del grano la planta mantiene un mayor número de granos, que es lo que le importa para reproducirse]).
9. Número de vainas por planta. Carácter donde el ambiente pesa enormemente (entre otras causas, dada su dependencia de polinizadores eficaces), sólo se han podido estudiar tres cruzamientos a causa del solape entre parentales; en uno se ha registrado clara dominancia negativa y en dos herencia intermedia, sin patrón discernible como es habitual. Los demás estudios registran fuerte efecto ambiental, en todo caso dominancia parcial positiva y tendencia a transgresividad positiva o bien dominancia débil de ambos signos según parentales.

10. Número de granos por planta. En el presente estudio, no se registra variación significativa entre parentales. En los restantes, dominancia parcial positiva en general, pero no en todos los grupos estudiados por Hobbs y Burnett (1982).

La heterogeneidad genética que se deduce de los resultados anteriores que incluyen trabajos diversos en material y en métodos no se restringen a los caracteres del presente estudio, sino a todos los de la planta sean morfológicos o reproductivos. Puede decirse que, salvo contadas excepciones, la norma es encontrar dominancia de ambos signos casi uniformemente débil debido a la alta aditividad generalizada, dominancia que aparece más clara cuanto más lejanos en origen (pero no en caracteres botánicos) sean las líneas parentales, hasta el punto que desaparece prácticamente cuando los cruzamientos se hacen dentro de grupos regionales. Tendencia a herencia transgresiva en algunos caracteres, signo de heterogeneidad genética, fuerte influencia ambiental sobre todo en caracteres de planta (ramas, altura, vainas y granos totales). Los resultados, como se ha dicho, son consistentes a pesar de la diversidad de parentales utilizados en los cruzamientos, los distintos fines perseguidos y métodos de análisis empleados.

La sensación que se tiene al observar en conjunto todos los trabajos realizados es que, en cuanto cultivada, es una especie de domesticación reciente y de base genética más bien estrecha, posiblemente debida a haberse partido de una sola población, como es el caso de otros muchos cultivos (garbanzo, cacahuete, escaña menor entre otros). La difusión tardía y geográficamente restringida no permitió la proliferación de mutantes.

Se confirma en todos los estudios que la distinción taxonómica no tiene sentido, primando en todo caso la regional, claro indicador de que las distintas presiones de selección llevadas a cabo diferentes lugares. Parece claro que, en la evolución de *Vicia faba* como especie cultivada (se desconoce el ancestro silvestre), ha habido poca presión selectiva dentro de grupos, pero sí entre grupos; esto se nota particularmente al comparar las paucijuga (el grupo que muestra caracteres más cercanos al hipotético silvestre, sólo recogido en Afganistán y norte de Pakistán, puede que hoy desaparecido) con las modernas):

(1) aumenta el número de foliolos por genes con dominancia positiva (superficie asimiladora);

(2) aumenta el tamaño del grano (peso de 100 semillas) con genes de dominancia negativa: granos menores dominantes frente a mayores, para tener mayor número

por planta, carácter éste que muestra, de modo congruente con el anterior, tendencia a dominancia e incluso a heterosis positiva (más sobre menos);

(3) aumenta la longitud del grano y su delgadez tanto por el grosor en sí como por el coeficiente (dominancia negativa en los dos casos).

(4) Pero dentro del grupo moderno, se registra dominancia en la doble dirección (negativa y positiva) lo cual puede interpretarse como una separación de los grupos equina (algo más gorditos: dominancia positiva del gordito) y mayor (más delgados por dominancia negativa).

Y, a pesar de diferencias morfológicas tan claras, los cruzamientos son totalmente fértiles, la aditividad es el componente genético más importante (incluso en caracteres reproductivos) siempre, a veces único, la dominancia, de detectarse, es parcial y salvo excepciones, débil; existe herencia transgresiva de distinto signo según cruzamientos, al igual que la dominancia, lo que indica, como ya se ha dicho, heterogeneidad genética como respuesta a diferentes presiones selectivas. Todo ello hace que los resultados de los cruzamientos sean distintos cuando se hacen entre o dentro de grupos regionales.

La alta aditividad registrada como componente principal del sistema genético, y su reflejo en heredabilidades medias y altas salvo casos puntuales, sugiere que la selección llevada a cabo por el hombre ha discurrido por cauces apacibles, con respuestas de aceptables a buenas. Una prueba indirecta de ello es la rápida elevación del rendimiento en variedades europeas cuando se coordinó el trabajo de mejora en los años setenta y ochenta del pasado siglo. Y, asimismo, el hecho mencionado en este mismo capítulo de la modificación automática de las líneas paucijuga mantenidas en nuestra colección por el simple hecho de recoger la semilla producida y utilizarla para la siguiente generación, operación realizada de forma mecánica sin intención alguna de selección de las semillas más gruesas: de haber predominado la dominancia sobre la aditividad, la selección incluso automática, hubiera sido disruptiva.

Desde el punto de vista de la Mejora, es interesante el hecho de la diferente arquitectura genética de las facies regionales lo que, en definitiva, nos permite afirmar que hay una firme base genética para la mejora.

BIBLIOGRAFÍA

- Beadle GW (1980). The ancestry of corn. *Scientific American* 242: 112-119.
- Beavis W (1998). QTL analyses: Power, precision, and accuracy. pp. 145 -162. In: Paterson, A.H. (ed.), *Molecular Dissection of Complex Traits*. CRC Press, Boca Raton.
- Ceoloni C, Kuzmanovic L, Forte P, Gennaro A, Bitti A (2014). Targeted exploitation of gene pools of alien Triticeae species for sustainable and multi-faceted improvement of the durum wheat crop. *Crop & Pasture Science* 65: 96-111.
- Croser JS, Ahmad F, Clarke HJ, Siddique KHM (2003). Utilisation of wild Cicer in chickpea improvement - progress, constraints, and prospects. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 429-444.
- Cruz-Izquierdo S (2009). Identificación de genes y QTLs relacionados con la domesticación y el rendimiento en la especie *Vicia faba*. Relaciones de sintenia con otros cultivos relacionados. Tesis doctoral. Departamento de Genética. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes. Universidad de Córdoba.
- Cruz-Izquierdo S, Avila CM, Satovic Z, Palomino C, Gutierrez N, Ellwood SR, Phan HTT, Cubero JI and Torres AM (2012). Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theoretical and Applied Genetics* 125(8): 1767-1782.
- Cubero JI (1970). Herencia de quince caracteres en *Vicia faba* L. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. Madrid, España. 50 pág.
- Cubero JI (1974). On the evolution of *Vicia faba* L. *Theoretical and Applied Genetics* 45: 47-51.
- Cubero JI (1982). Interspecific hybridization in *Vicia*. En: *Faba bean improvement*. pp 91-108. Ed. By G. Hawtin y C. Webb. Martinus Nijhoff, La Haya, Holanda.
- Cubero JI (1984). Taxonomy, distribution and evolution of faba bean and its wild relatives. En: Witcombe JR, Erskine W (eds) *Genetic resources and their exploitation-chickpeas, faba beans and lentils*. Martinus Nijhoff, La Haya, Holanda, pp. 131-144.

- Cubero JI, Martín A (1981). Factorial Analysis of yield components in *Vicia faba* L: En: *Physiology and Breeding* pp. 139-151. Ed by R. Thompson, Martinus Nijhoff Publisher, La Haya.
- Hammer K (1984). The domestication syndrome. *Kulturpflanze* 32: 11–34 (in German).
- Harlan JR (1992). *Crops and man*. Madison, WI: American Society of Agronomy.
- Hobbs SLA, Burnett JH (1982). The genetic control of morphological and yield characters in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics* 62: 9-15.
- Hufford MD, Xu X, van Heerwaarden J, Pyhäjärvi T, Chia JM, Cartwright RA, Elshire RJ, Glaubitz JC, Guill KE, Kaepler SM, Lai J, Morrell PL, Shannon LM, Song C, Springer NM, Swason-Wagner RA, Tiffin P, Wang J, Zhang G, Doebley J, McMullen MD, Ware D, Buckler ES, Yang S y Ross-Ibarra J (2012). Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nature Genetics* 44: 808-811.
- Igartua E (2014). Comunicación oral correspondiente al trabajo: Mohamed NEM, Yahiaoui S, Casas AM, Cantalapiedra CP, Contreras-Moreira B. Gracia MP, Lasa JM, Ciudad FJ, Montoya JL, Molina-Cano JL, Moralejo M, Igartua E (2014). Asociación para caracteres agronómicos en cebadas españolas. *Actas de Horticultura* 69:221-222.
- Khlestkina E (2014). Current applications of wheat and wheat–alien precise genetic stocks. *Molecular Breeding* 34:273-281.
- Martín A (1976). *Genética de los componentes del rendimiento en Vicia faba*. Tesis Doctoral. E.T:S. de Ingenieros Agrónomos. Universidad de Córdoba. Córdoba, España. 383 pág.
- Martín A, Sánchez-Monge Laguna E, (1982). Cytology and morphology of the amphiploid *Hordeum chilense* x *Triticum turgidum* conv. Durum. *Euphytica* 31: 261-267.
- Martin, A., Cubero, J.I. (1979). Inheritance of quantitative characters in *Vicia faba*. Pp. 90-95 in Bond, D.A., Scarascia-Mugnozza, G.T., Poulsen, M.H. (eds.), *Some current research on Vicia faba in Western Europe*. Commission of the European Communities, Luxemburgo.

-
- Martinez A, Coiduras A, Moreno MT, Cubero JI (1979). Barriers to crossability and Quantitative Inheritance in *Cicer arietinum*. *Theoretical and Applied Genetics* 55: 5-16.
- Melchinger AE, Utz HF, Schön CC (1998). Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149(1): 383-403.
- Meyer SM y Purugganan MD (2013). Evolution crops species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics* 14: 840-852.
- Muratova V (1931). Common beans (*Vicia faba* L.) *Bulletin of Applied Botany of Genetics and Plant Breeding*. (Suppl.) 50: 248-285.
- National Academy of Sciences (1972). *Genetic Vulnerability in Major Crops*. National Academy of Sciences, Washington DC, EEUU.
- Quijada P, Shannon LM, Glaubitz JC, Studer AJ y Doebley J (2009). Characterization of a major maize domestication QTL on the short arm of chromosome 1. *Maydica* 54:401-408.
- Schön CC, Utz HF, Groh S, Truberg B, Openshaw S, Melchinger AE (2004). Quantitative trait locus mapping based on resembling in vast maize test cross experiment and its relevance to quantitative genetics for complex traits. *Genetics* 167:485-498.
- Serradilla JM, De Mora T, Moreno MT (1993). Geographic dispersion and varietal diversity in *Vicia faba* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 40: 143-151.
- Simorte T, Flores F, Torres A, Moreno MT (1995). Componentes del rendimiento en generaciones segregantes de *Vicia faba*. *INIA. Producción y protección vegetales*. 10(3): 401-413.
- Suso MJ y Cubero JI (1986). Changes under domestication in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 364-372.
- Suso MJ, Moreno MT (1999). Variation in outcrossing rate and genetic structure of six cultivars of *Vicia faba* L. is affected by geographic location and year. *Plant Breeding* 118: 347-350

-
- Suso MJ, Pierre J, Moreno MT, Esnault R, Le Guen J (2001). Variation in outcrossing levels in faba bean cultivars: role of ecological factors. *Journal of Agricultural Science* 136: 399-405.
- Suso MJ, Moreno MT, Cubero JI (1983). Inheritance of leaf characters in *Vicia faba*. *Genet. Agr.* 37: 23-32.
- Suso MJ, Moreno MT, Cubero JI (1984). Inheritance of seed size and seed shape in *V. faba*. *Legume Research* 7(2): 89-94.
- Suso MJ, Moreno MT, Cubero JI (1986). Inheritance of leaf characters in *Vicia faba*. II. Primitive cultivars. *Genet. Agr.* 40: 47-56.
- Tanksley SD, McCouch SR (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066.
- Toker C (2004). Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield criteria in faba bean (*Vicia faba* L.). *Hereditas* 140: 222-225.
- Torres AM, Moreno MT, Cubero JI (1993). Genetics of six components of autofertility in *Vicia faba*. *Plant breeding* 111, 220-228.
- Vales MI, Schön CC, Capettini F, Chen XM, Corey AE, Mather DE, Mundt CC, Richardson KL, Sandoval-Islas JS, Utz HF, Hayes PM (2005). Effect of population size in the estimation of QTL: a test using resistance to barley stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 1260-1270.
- Van Ginkel M, Ogonnaya F (2007). Novel genetic diversity from synthetic wheats in breeding cultivars for changing production conditions. *Field Crops Research* 104:86-94.
- Varshney RK, Kudapa H, Pazhamala L, Chitikineni A, Thudi M, Bohra A, Gaur PM, Janila P, Fikre A, Kimurto P y Ellis N (2015). Translational Genomics in Agriculture: Some Examples in Grain Legumes. *Critical Review in Plant Science*, 34: 1-3, 169-194.
- Wallace JG, Larsson SJ, Buckler ES (2014). Entering the second century of maize quantitative genetics. *Heredity* 112:30-38.
- Warburton M, Crossa J, Franco J, Kazi M, Trethowan R, Rajaram S, Pfeiffer W, Zhang P, Dreisigacker S, Ginkel M (2006). Bringing wild relatives back into the family:

recovering genetic diversity in CIMMYT improved wheat germplasm. *Euphytica* 149:289-301.

Weeden NF (2007). Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: Is there a common genetic basis to the “Domestication syndrome” for legumes? *Annals of Botany* 100(5): 1017-1025.

Zdravkovic M, Zdravkovic J, Stankovic L, Pavlovic N. 2005. Combining abilities of inheriting first pod height of some french bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genetika*, 37 (1): 65-70.

CAPÍTULO II

Comprobación de los grupos de ligamiento de *Vicia faba* L. con sus correspondientes cromosomas.

Publicado como:

Ruiz-Rodriguez MD, Avila CM, Torres AM, Fuchs J, Schubert I (2014) Anchoring of genetic linkage maps to the chromosome complement of *Vicia faba* L. Molecular breeding 33 (3): 743-748.

Resumen:

La asignación de los grupos de ligamiento de los mapas genéticos a cromosomas específicos es fundamental para el avance en los estudios de la base genética de los caracteres de interés. Sin embargo, el cromosoma IV de *Vicia faba* L. no había sido relacionado con ningún grupo de ligamiento. En este trabajo se utilizaron líneas de translocación de fondo genético conocido para el aislamiento de cromosomas específicos mediante técnicas de microdissección.

La amplificación de marcadores moleculares presentes en los mapas genéticos permitió demostrar que el grupo de ligamiento I.B se corresponde con el cromosoma IV de la especie. Este resultado es de especial relevancia, ya que hasta este trabajo se pensaba que el grupo I.B pertenecía al cromosoma I.

El anclaje de todos los grupos de ligamiento a distintos cromosomas de habas facilitará el mapeo fino de caracteres cuantitativos, la identificación de genes usando sintenia y potenciará el desarrollo de marcadores eficientes para la selección en los programas de mejora.

PALABRAS CLAVE: Microaislación de cromosomas, *Vicia faba*, mapas genéticos y físicos, sintenia.

Abstract:

Using amplification of marker sequences with DNA from a set of distinct microdissected *Vicia faba* L. chromosomes covering the entire genome, we could unambiguously show that the linkage group I.B, which includes the pseudogene of legumin B4 ($\psi 1$) and was previously ascribed to the metacentric chromosome I actually belongs to chromosome IV. By considering the breakpoints of the translocated BKH chromosomes III and IV, even the subchromosomal position of loci LG085 and CNGC4 could be inferred. Anchoring all linkage groups to distinct faba bean chromosomes will facilitate quantitative trait locus fine mapping and gene identification using synteny, and will boost the development of efficient markers for selection in breeding programs.

KEY WORDS: Chromosome microisolation, *Vicia faba*, genetic and physical maps, synteny.

INTRODUCTION

The field bean *Vicia faba* L. has one of the largest (~13,000 Mbp) and (at least cytogenetically) well investigated plant genomes. In contrast to other Viceae species with $2n=2x=14$, faba bean has six chromosome pairs, numbered I to VI, according to their length (Michaelis and Rieger, 1959). The largest and metacentric chromosome I carries a satellite while the remaining five chromosomes are acrocentric and similar in size. A fusion of two telocentrics was suggested as the origin of chromosome I (Schubert et al. 1995).

The integration of the cytogenetic, genetic and physical maps is a key issue for faba bean as a basis for genetic improvement of agronomic traits. Cytological tools for pursuing this goal by assigning genes, markers and entire linkage groups to their respective chromosomes and chromosome regions include primary trisomics (Cabrera and Martín, 1989; Cabrera et al. 1989) and translocation stocks (Sjödin, 1971; Schubert et al. 1983). The translocation lines with multiple reconstructed karyotypes allow all the chromosome pairs to be distinguished. Macas et al. (1993 a, b) used DNA from defined microdissected or flow-sorted translocation chromosomes as templates for PCR to identify the chromosome carrying a specific gene sequence. Based on the translocation breakpoints, this technique revealed a resolution to a subchromosomal level and has further facilitated the physical mapping of low copy DNA sequences on faba bean chromosomes. Alternatively, trisomics of *V. faba* have been obtained from different sources such as polyploids (Poulsen and Martín, 1977), translocation lines (Sjödin, 1971; Schubert et al. 1983) and asynaptic mutants (González and Martín, 1983) for anchoring of genetic traits to distinct chromosomes.

After successful identification and characterization of five of the six possible primary trisomics (Martín and Barceló, 1984), crosses between an asynaptic line and a normal diploid parent have been extensively used to assign faba bean linkage groups to the corresponding chromosomes (Torres et al. 1995; 1998; Satovic et al. 1996; Vaz Patto et al. 1999; Roman et al. 2004). Subsequently, the use of physically localized markers (Macas et al. 1993 a, b; Pozarkova et al. 2002) led to the integration of genetic and physical maps and supported the unambiguous assignation of linkage groups to most of the faba bean chromosomes (Román et al. 2004). At present, genetic maps with wide coverage of chromosomes (Torres et al. 2010; Cruz-Izquierdo et al. 2012) are available. These maps allowed the identification of quantitative trait loci (QTLs) underlying resistance to broomrape and ascochyta blight (Román et al. 2002; 2003; Avila et al. 2004;

Díaz-Ruiz et al. 2009; Díaz et al. 2010), or controlling yield-related traits (Cruz-Izquierdo et al. 2012).

Comparative genomic analyses has allowed establishment of the correspondence between *V. faba* chromosomes with those of other model and/or crop legumes, using PCR-based markers derived from ESTs (expressed sequence tags; Ellwood et al. 2008; Cruz-Izquierdo et al. 2012). However, this approach could not be applied to all faba bean chromosomes, because no linkage group had so far been assigned to chromosome IV.

Macas et al. (1993b) localized the pseudogene of legumin B4 ($\psi 1$) in the proximal part of chromosome IV. However, a weak PCR product suggested a possible second $\psi 1$ copy on the distal part of chromosome V and the later assignment of $\psi 1$ to chromosome I by Román et al. (2004) contradicted these findings. Furthermore, several markers assigned to chromosome IV in progenies derived from trisomic plants, remained unlinked in the consensus map (Román et al. 2004), and thus could not clarify this issue. For that reason, the linkage group containing $\psi 1$ was named I.B in the last reported map (Cruz-Izquierdo et al. 2012), while no linkage group could be assigned to chromosome IV. The lack of connection between linkage groups I and I.B suggested the possibility that the latter might correspond to chromosome IV.

The aim of this work was to investigate whether the linkage group I.B corresponds to the chromosome IV of *V. faba*. To do so, faba bean chromosomes were microdissected and used for PCR amplification of EST-derived markers previously mapped either to specific chromosomes or to linkage group I.B.

Metaphase chromosomes of *V. faba* were isolated from the reconstructed karyotypes ACB (chromosomes II, IV and V), EF (chromosome I and VI) and BKH (chromosomes III and IV; Fig. 1; for description see Schubert & Rieger, 1991), as described by Dolezel et al. (1992) and Schubert et al. (1993) (Supplementary material 1). The resulting suspension was passed through a 35 μm nylon filter to remove tissue and cellular debris, fixed on slides by centrifugation (400 rpm, 5 min) and stored in ethanol at 4 °C.

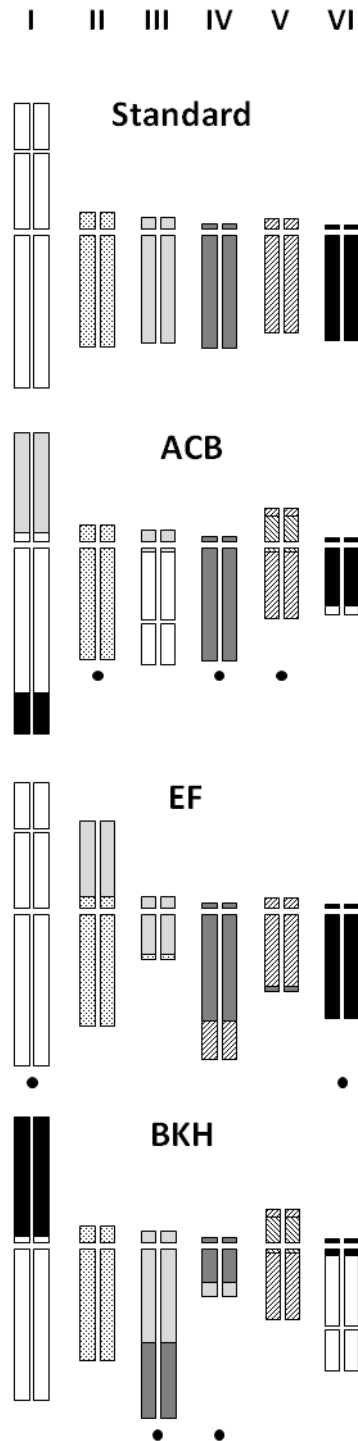


Figure 1: Scheme of the standard (wild-type) and of reconstructed karyotypes of the *V. faba*. Chromosomes used as targets for PCR are marked with a dot (●). Karyotype ACB: chromosomes II and IV (equivalents to the wild-type) and the pericentrically inverted chromosome V. Karyotype EF: chromosomes I and VI (equivalents to the wild-type). Karyotype BKH: chromosomes III and IV (representing a reciprocal translocation of the wild-type chromosomes III and IV).

The microscopically controlled chromosome isolation was performed on a mechanically driven micromanipulator. The chromosomes were picked up using a glass needle and transferred into tubes with 1 μ l of collection buffer containing proteinase K (Sorokin et al. 1994). Eight to ten chromosomes of each type were pooled in a tube. In a first reaction, each chromosome pool was amplified using the Single Cell WGA kit (BioLabs) following manufacturer's instructions. This 'amplified' DNA was used as template for PCR amplification of markers previously assigned to specific chromosomes (Table 1). Given the limited amount of initial DNA and the number of PCR reactions carried out, a second amplification with the Single Cell WGA kit was repeated to chromosomes II_ACB, IV_ACB and VI_EF.

Markers previously mapped to specific chromosomes were amplified using 1 μ l of amplified nuclear DNA in 25 μ l of PCR mix. The MyTaq Red DNA polymerase kit (Bioline) was used following manufacturer's instructions with a T_m of 58°C. Amplification with the same primer pairs from DNA of the *V. faba* genotypes Vf6, Vf136, Vf27 and 29H, parental lines of the mapping populations reported to date (reviewed in Torres et al. 2010), served as positive control and to check for correct size of the bands amplified from the reconstructed karyotypes.

RESULTS & DISCUSSION

The similarity in size among chromosomes II to VI of *V. faba* hampers the use of the wild type for chromosome isolation. Thus, the translocation lines ACB, EF and BKH, possessing specific karyotypes (Fig. 1), were used for microdissection. Seven chromosomes were collected separately (Fig. 1). Chromosomes II, IV and V were isolated from the karyotype ACB; chromosomes I and VI were obtained from karyotype EF. Finally, two translocation chromosomes were isolated from BKH (Fig. 1). Chromosome III from BKH (referred as III_BKH) is a translocation involving chromosome III (almost complete) and the distal part of the long arm of the chromosome IV. Chromosome IV_BKH is also a translocation involving chromosomes III (distal part of the long arm) and IV (short arm and the proximal part of the long arm). DNA from these chromosomes was used as template for PCR to amplify markers previously assigned to specific chromosomes by Macas et al. (1993b) and Cruz-Izquierdo et al. (2012). PCR results are summarized in Table 1.

Amplification of the four marker sequences previously assigned to linkage group I.B (LG085, CNGC4, FIS-1 and PRAT) from DNA of karyotypes ACB and EF, revealed bands of the expected size (412, 460, 580 and 406 bp, respectively) in the ACB chromosome IV (Fig. 2a). Subsequently, translocation chromosomes III and IV of karyotype BKH were used as templates for amplification of two of these sequences (Fig. 2b). In agreement with the previous results, LG085 and CNGC4 were amplified from the translocated chromosomes III and IV of karyotype BKH, respectively, further supporting their location on the standard chromosome IV. Moreover, we could infer that LG085 is located within the distal two thirds of the long arm and CNGC4 either on the short arm or on the proximal part of the long arm of chromosome IV (Figs. 1, 2). Although the amplification of CNGC4 on chromosome IV of karyotype ACB was very weak (Fig. 2b), the clear band obtained in Fig. 2a supports, unambiguously, the previous assignment.

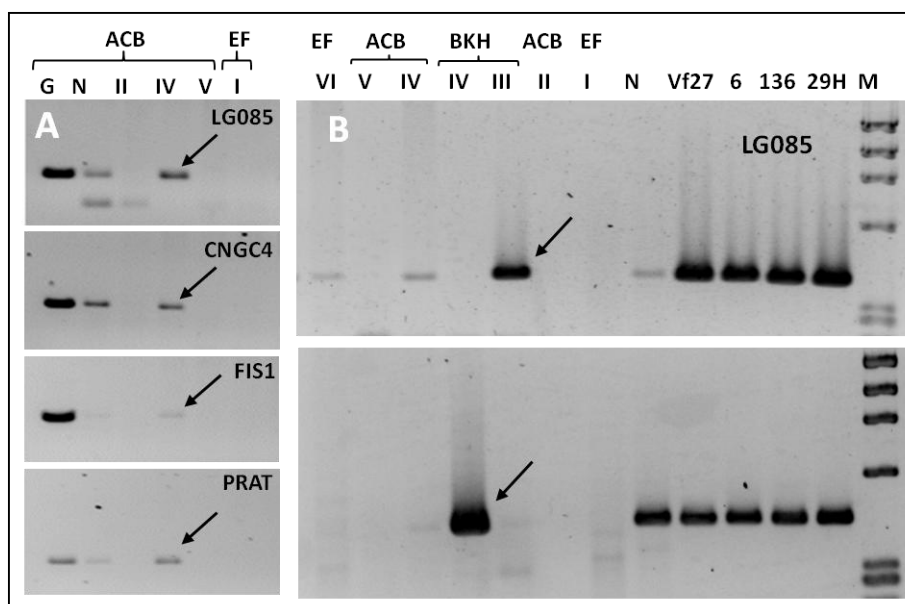


Figure 2: (A): Agarose gel of the PCR products obtained with primers LG85, CNGC4, FIS1, PRAT and DNA of microdissected chromosomes of karyotypes ACB and EF. (B): Amplification of primers LG85 and CNGC4 with DNA of karyotypes ACB, EF and BKH. G: genomic; N: nucleus; Vf27, 6, 136 and 29H: faba bean lines used in different mapping projects; M: marker (Phix174/Hae III).

A weak amplification product was also detected for LG085 in chromosome VI from karyotype EF. This band might be caused by nonspecific amplification. Alternatively, it might indicate a duplication of this gene in chromosome VI. In faba bean, different loci have been reported to amplify and map on different chromosomes using the same primer pair (Ellwood et al. 2008; Cruz-Izquierdo et al. 2012).

The consistency of the results was assessed using a set of markers previously assigned to the rest of chromosomes (Table 1). LG007 and PEPCASE revealed bands of the expected size (430 and 390 bp, respectively) when the DNA of chromosome I of karyotype EF was used as template. Lup242 and viciline primers yielded bands of about 510 and 840 bp, respectively, with DNA of chromosome II of karyotype ACB. Strong bands of 460 and 414 bp were obtained with primers mtmt_GEN_00477_01_1 and Psat_EST_00190_01_1, respectively, using DNA of chromosome III and IV of karyotype BKH.

Table 1: PCR amplification of selected markers using DNA of microisolated chromosomes as a template.

Markers	Chromosome location (*)	Karyotype							
		EF	ACB	BKH	BKH	ACB	ACB	EF	
		I	II	III	IV	IV	V	VI	
LG007	I.A	++		+	+			+	
PEPCASE	I.A	++							
PRAT	I.B					++			
CNGC4	I.B				++	++			
FIS-1	I.B					+			
LG085	I.B		○	++		++		+	
Viciline	II		++						
Lup242	II		++	○					
mtmt_GEN_00477_04_1	III			++	+	+	○		
Psat_EST_00190_01_1	III			++					
Lup036	V						++		
PERS1	V						++		
tRALs	VI							++	
GLIP265	VI	○					○	++	

(*): Location in Cruz-Izquierdo et al. (2012)

+: PCR products of the expected size (++, strong band; +, weak band); ○ PCR products differing in size

Products of the expected size were also amplified from the expected target chromosome in the case of Lup036, PERS1, tRALs and GLIP265. Thus, Lup036 and PERS1 primers produced strong bands of about 200 and 260 bp, respectively, when the DNA of chromosome V of karyotype ACB was used as template. Bands of about 350 bp were obtained with tRALs and GLIP265 primers and DNA of chromosome VI of karyotype EF. However, as happened with LG085, markers LG007 and mtmt_GEN_00477_04_1 revealed very weak products of the expected size in other chromosomes. Besides, Lup242 and GLIP265 yielded PCR products differing from the expected size (Table 1). As

mentioned above, nonspecific amplification or gene duplication might be among the reasons explaining such an unexpected banding pattern.

In summary, with the unequivocal assignment of linkage group I.B to the chromosome IV, linkage groups are now anchored to all six *V. faba* chromosomes, providing the basis for integration of genetic and physical maps of this crop.


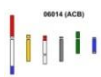
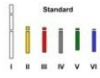
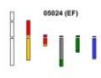
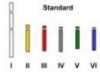

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Katrin Kumke for microdissection of chromosomes. This work was co-financed by the Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (MICINN) projects: AGL2008-02305 and RTA2010-00059, co-financed with FEDER. MD Ruiz-Rodríguez acknowledges the fellowship at IFAPA, Córdoba, Spain belonging to the Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3) and the fellowship at Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) both supported by the MICINN project AGL2008-02305.

Supplementary file 1.

Plant material details

The description of the karyotype reconstructions used in this work have been added as supplementary material 1. This information is available at <http://www.ipk-gatersleben.de/en/databases/plant-genetic-resources/> (see Catalogue of chromosomal and morphological mutants of the broad bean *Vicia faba*).

Running no	Rearrangement	Name	Standard	Mutant
6014	tIS-IIIIL(4-14)/tIL-VIL(8-28)+invVS-L(21-22)	ACB		
5024	tIIS-IIIIL(9-14)+tIVL-VL(20-23)	FE		
5039	tIS-VIL(4-26)+tIIIIL-IVL(16-18)+invVS-L(21-22)	BKH		

Abbreviations:

t=primary reciprocal translocation

inv=inversion

I-VI=symbols for the six pairs of standard chromosomes

S=short arm;

L=long arm;

Arabic numbers in brackets denote chromosomal segments (1-28) involved in chromosomal reconstructions (I:1-8, II:9-12; III:13-16, IV: 17-20, V:21-24, VI:15-28).

For more detailed information see:

http://pgrc-35.ipk-gatersleben.de/pls/htmldb_pgrc/f?p=259:1: (checked 17 of September of 2013).

REFERENCES

- Avila CM, Satovic Z, Sillero JC, Rubiales, D, Moreno, MT, Torres, AM (2004). Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean. *Theoretical Applied Genetics* 108: 1071-1078.
- Cabrera A, Cubero J, Martín A (1989). Genetic mapping using trisomics in *Vicia faba* L. *FABIS Newslett* 23: 5-7.
- Cabrera A, Martín A (1989). Analysis of genetic linkage in faba bean (*Vicia faba* L). *FABIS Newslett* 24: 3-5.
- Cruz-Izquierdo S, Avila CM, Satovic Z, Palomino C, Gutierrez N, Ellwood SR, Phan HTT, Cubero JI, Torres AM (2012). Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theoretical Applied Genetics* 125: 1767-1782.
- Díaz R, Torres AM, Satovic Z, Gutierrez MV, Cubero JI, Roman B (2010). Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L) across environments and generations. *Theoretical Applied Genetics* 120: 909-919.
- Díaz-Ruiz R, Satovic Z, Avila CM, Alfaro CM, Gutierrez MV, Torres AM, Román B (2009). Confirmation of QTLs controlling *Ascochyta fabae* resistance in different generations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop Pasture Science* 60: 353-361.
- Dolezel J, Cihalikova J, Lucretti S (1992). A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. *Planta* 188: 93-98.
- Ellwood SR, Phan HTT, Jordan M, Torres AM, Avila CM, Cruz-Izquierdo S, Oliver RP (2008). Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.) conservation of genome structure with *Lens culinaris*. *BCM Genomics* 9: 380.
- González JA, Martín A (1983). Development, use and handling of trisomics in *Vicia faba* L. *FABIS Newslett* 6: 10-11.
- Macas J, Weschke W, Bäumlein H, Pich U, Houben A, Wobus U, Schubert I (1993a). Localization of vicilin genes via polymerase chain reaction on microisolated field bean chromosomes. *Plant J* 3: 883-886.

- Macas J, Dolezel J, Lucretti S, Pich U, Meister A, Fuchs J, Schubert I (1993b). Localization of seed protein genes on flow-sorted field bean chromosomes. *Chromosome Res* 1: 107-115.
- Martín A, Barceló, P (1984). The cytology and morphology of *Vicia faba* trisomic. In: Chapman GP, Tarawai SA (eds) *Systems for cytogenetic analysis in Vicia faba L.* Martinus Nijhoff, The Hague, pp 63-76.
- Michaelis A, Rieger R, (1959). Strukturheterozygotie bei *Vicia faba*. *Züchter* 29: 354-361.
- Poulsen MH, Martín A, (1977). A reproductive tetraploid *Vicia faba* L. *Hereditas* 87: 123-126.
- Pozarkova D, Koblizkova A, Román B, Torres AM, Lucretti S, Lysak M, Dolezel J, Macas J (2002). Development and characterization of microsatellite markers from chromosome 1-specific DNA libraries of *Vicia faba*. *Biologia Plantarum* 45: 337-345.
- Román B, Satovic Z, Avila CM, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM (2003). Locating genes associated with *Ascochyta fabae* resistance in *Vicia faba* L. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 85-90.
- Román B, Satovic Z, Pozarkova D, Macas J, Dolezel J, Cubero JI, Torres AM (2004). Development of a composite map in *Vicia faba*, Breeding applications and future prospects. *Theoretical Applied Genetics* 108: 1079-1088.
- Román B, Torres AM, Rubiales D, Cubero JI, Satovic Z (2002). Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobanche crenata* Forsk) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome* 45: 1057-1063.
- Satovic Z, Torres AM, Cubero JI (1996). Genetic mapping of new morphological, isozyme and RAPD markers in *Vicia faba* L. using trisomics. *Theoretical Applied Genetics* 93: 1130-1138.
- Schubert I, Rieger R (1991). Catalogue of chromosomal and morphological mutants of Faba bean in the Gatersleben Collection, 1991. *FABIS Newslett* 28/29: 14-22.
- Schubert I, Rieger R, Fuchs J (1995). Alteration of basic chromosome number by fusion-fission cycles. *Genome* 38: 1289-1292.

-
- Schubert I, Rieger R, Michaelis A (1983). A method for direct production of definite aneuploids of *Vicia faba* L. FABIS Newslett 7: 13-18.
- Schubert I, Dolezel J, Houben A, Scherthan H and Wanner G (1993). Refined examination of plant metaphase chromosome structure at different levels made feasible by new isolation methods. Chromosoma 102: 96-101.
- Sjödin J (1971). Induced morphological variation in *Vicia faba* L. Hereditas 67: 155-180.
- Sorokin A, Marthe F, Houben A, Pich U, Graner A and G Künzel (1994). Polymerase chain reaction mediated localization of RFLP clones to microisolated translocation chromosomes of barley. Genome 37: 550-555.
- Torres AM, Avila CM, Gutierrez N, Palomino C, Moreno MT, Cubero JI (2010). Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.) Field Crops Research 115: 243-252.
- Torres AM, Satovic Z, Cánovas J, Cobos S, Cubero JI (1995). Genetics and mapping of new isozyme loci in *Vicia faba* L. using trisomics. Theoretical Applied Genetics 91: 783-789.
- Torres AM, Vaz Patto MC, Satovic Z, Cubero JI (1998). New isozyme loci in faba bean (*Vicia faba* L.): genetic analysis and mapping using trisomics. The Journal of Heredity 89: 271-274.
- Vaz Patto MC, Torres AM, Koblizkova A, Macas J, Cubero JI (1999). Development of genetic composite map of *Vicia faba* using F₂ populations derived from trisomics plants. Theoretical Applied Genetics 98: 736-743.

CAPÍTULO III

Estrategias para el desarrollo de marcadores eficientes en la selección de caracteres agronómicos

INTRODUCCIÓN

Los caracteres analizados en esta tesis son relevantes para los programas de mejora de habas. Sin embargo, su evaluación es complicada y requiere una gran cantidad de recursos, tanto materiales como económicos. De ahí que el desarrollo de una estrategia de selección asistida por marcadores (MAS) resulte interesante al permitir una selección precoz e independiente del ambiente que disminuye el coste de las evaluaciones de campo, sobre todo en las fases iniciales de selección.

La aplicación de marcadores moleculares en habas ha permitido avances en la investigación sobre las bases genéticas de caracteres de interés para la especie. Así, el desarrollo de mapas genéticos ha posibilitado, por ejemplo, la identificación de QTLs de resistencia a las principales enfermedades que afectan al cultivo: jopo, ascoquitosis y mancha chocolate (Roman et al. 2002; 2004; Avila et al. 2004; Diaz-Ruiz et al. 2010; Díaz-Ruiz et al. 2009a, Díaz-Ruiz et al. 2009b; Villegas-Fernández, 2012; Gutiérrez et al. 2013; Kaur et al. 2014a). Del mismo modo, la aplicación de estrategias como el BSA (Bulk Segregant Analysis) ha permitido la identificación de marcadores ligados a la resistencia a roya (Avila et al. 2003) y a caracteres de calidad del grano como la ausencia de taninos (Gutiérrez et al. 2007; 2008) o el bajo contenido en vicina-convicina (Gutiérrez et al. 2006). Todos ellos han sido primeros pasos hacia el desarrollo de marcadores eficientes para la selección y por lo tanto útiles en MAS (Torres et al. 2010)

El siguiente paso necesario para la implantación eficiente de una estrategia de MAS es la validación de los resultados obtenidos. En el caso de los caracteres cuantitativos es necesaria una detección lo más precisa posible de las regiones asociadas a cada carácter. Para ello es necesaria una validación de los QTLs obtenidos, primero en distintos ambientes, lo que permite el estudio de la interacción Genotipo x Ambiente y de la estabilidad de los QTLs en las distintas campañas o condiciones; se precisa,, además, de un segundo tipo de validación en diferentes fondos genéticos. Se considera que la validación en la población inicial permite determinar la estabilidad de los QTLs, mientras que con la validación en distintos fondos genéticos se logra determinar el valor real de los marcadores seleccionados en la mejora ya que se comprueba la utilidad de los mismos más allá de los materiales a partir de los cuales fueron desarrollados (Romagosa et al. 1999; Pinson et al. 2005, Simmonds et al. 2014).

En relación con los caracteres estudiados en esta tesis, el trabajo más completo a nivel molecular, hasta la fecha, es el realizado por Cruz-Izquierdo (2009). En su tesis

doctoral utilizó una población de líneas recombinantes (RIL) derivada del cruzamiento Vf6 × Vf27 para el análisis de QTLs relacionados con la arquitectura, la fenología y el rendimiento de la especie (20 caracteres). De esta manera, identificó 65 QTLs, de los que tan sólo 12 (responsables de 5 caracteres) se mostraron estables en los dos años de estudio (Cruz-Izquierdo et al. 2012). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de realizar ensayos adicionales para intentar validar los QTLs identificados.

La identificación de QTLs realizada por Cruz-Izquierdo (2009) se basó en el mapa desarrollado por Ellwood et al. (2008), que fue construido utilizando marcadores ESTs, derivados de otras leguminosas, relativamente fáciles de transferir a otros fondos genéticos. De hecho, muchos de estos marcadores han sido integrados en los mapas genéticos desarrollados posteriormente (Gutiérrez et al. 2013) y se conoce su posición en uno de los mapas consensos de la especie (Satovic et al. 2013). La disponibilidad de estos marcadores comunes permite el alineamiento de distintos mapas de ligamiento y la comparación de los resultados obtenidos en experimentos distintos.

En el capítulo I se han desarrollado una serie de cruzamientos, y se han obtenido las familias RIL derivadas. El estudio de las correspondientes poblaciones F_2 y $F_{2:3}$ para diferentes caracteres de interés aporta una información preliminar importante respecto a la base genética de los mismos y también se puede emplear para evaluar la posible estabilidad de los QTLs ya detectados en trabajos previos. En concreto, el genotipado de los marcadores flanqueantes de los principales QTLs detectados en la población RIL Vf6 × Vf27 (Cruz-Izquierdo, 2009; Cruz-Izquierdo et al. 2012) en las poblaciones desarrolladas y el estudio de la asociación entre su segregación y el fenotipo de cada familia puede dar una idea de la conservación de estos QTLs en los distintos fondos genéticos y por lo tanto de la utilidad de los marcadores que se identifiquen o desarrollen en el programa de mejora.

Otra ventaja de los marcadores introducidos por Ellwood et al. (2008) es que permitían la comparación del mapa de habas desarrollado con los de otras especies de leguminosas como la lenteja (*Lens culinaris* L.) y la especie modelo *Medicago truncatula*. Con ello, además se abrió la puerta a la transferencia de información desde otras leguminosas a las habas y viceversa (Cruz-Izquierdo et al. 2012). Desde ese trabajo, se han multiplicado los esfuerzos para desarrollar la Genómica de la especie que permitiera, por ejemplo, el descubrimiento de genes candidatos para el control de distintos caracteres basándonos en las relaciones de sintenia entre las distintas especies (Webb et al. 2015). De hecho, en el último año se ha pasado de 5000 ESTs recopilados en el

GeneBank a la obtención de diversos transcriptomas (Kaur et al. 2014a; 2014b; Webb et al. 2015; Ray et al. 2015).

Desde la introducción de los marcadores RAPDs, ampliamente empleados en los principales trabajos de mapeo de la especie (Torres et al. 2010), poco a poco se han ido incorporando estos nuevos tipos marcadores con mayor potencial para la mejora (Cottage et al. 2012; Ellwood et al. 2008; Gong et al. 2011; Kaur et al. 2012; Ma et al. 2011; Wang et al. 2011; Zeid et al. 2009). En la actualidad se cuenta con distintos mapas de densidad más que aceptable basados en secuencias de genes (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Ellwood et al. 2008; Kaur et al. 2014a; Satovic et al. 2013; Webb et al. 2015) que sin duda suponen un salto cualitativo en el estudio de las bases moleculares de muchos procesos biológicos de interés para la mejora de *V. faba* y que desde el punto de vista de la mejora nos van a permitir el establecimiento de estrategias de genes candidatos a través de las relaciones de sintenia que se establezcan entre las distintas leguminosas y sobre todo con la especie modelo. Hasta hace muy poco tan sólo Ávila et al. (2007) habían publicado un gen candidato para un carácter concreto de *V. faba*. En la actualidad, el desarrollo de estas nuevas herramientas han posibilitado la publicación de genes candidatos para diversos caracteres como estreses abióticos (Khazaei et al. 2014) y otros relacionados con la calidad de las semillas (Webb et al. 2015).

Por todo lo expuesto, en este capítulo nos propusimos distintos objetivos encaminados a establecer una estrategia para el desarrollo de marcadores eficientes para facilitar la selección de los caracteres objeto de esta tesis en cualquier programa de mejora. Por una parte se llevo a cabo la validación de los QTLs detectados en la población Vf6 x Vf27 por Cruz Izquierdo (2009) y Cruz-Izquierdo et al. (2012) mediante la evaluación de la población RIL en dos nuevas campañas. En segundo lugar se realizó una primera aproximación al estudio de conservación de estos QTLs en distintos fondos genéticos. Para ello se seleccionaron cuatro cruzamientos, de entre los empleados en el capítulo anterior, que involucraban a cinco de los seis parentales de partida. En todos los casos el parental femenino elegido fue el genotipo Vf937, lo que facilitaría la posibilidad de comparación de los resultados. Dentro del mismo objetivo, también se llevó a cabo la comparación de resultados con los QTLs para caracteres agronómicos de *V. faba*, identificados por Ávila et al. (2005) mediante el alineamiento de los mapas genéticos involucrados. Por último, se usaron las relaciones de sintenia y la información disponible en *M. truncatula* para identificar genes candidatos responsables de caracteres relacionados con la altura de planta y con la altura del primer nudo con flores y el primer nudo con vaina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Identificación y validación de QTLs para arquitectura y rendimiento en la población Vf6×Vf27

1.1.- Material Vegetal

Se utilizó la población RIL derivada del cruzamiento Vf6 × Vf27 y compuesta por 124 líneas (Cruz-Izquierdo, 2009; Cruz-Izquierdo et al. 2012). El parental femenino Vf6 es del tipo *equina* con color de testa beige y ha sido empleada en numerosos trabajos llevados a cabo en el Departamento. El parental masculino Vf27, es del tipo *paucijuga* con color de testa oscuro y características primitivas, lo que aporta al cruzamiento un alto nivel de polimorfismo tanto morfológico como molecular (Vaz Patto, 1997).

1.2.- Evaluación de caracteres

Los ensayos de campo se realizaron en dos campañas consecutivas (2011/2012 y 2012/2013) en el Centro Alameda del Obispo (Córdoba) del IFAPA (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera). La experimentación consistió en un diseño en bloques al azar con 2 repeticiones. Cada familia o parental estuvo representado por un máximo de 10 plantas por repetición, sembradas en surcos de 1 metro separados 70 cm entre sí. Así mismo se empleó la variedad 'Baraca' como control a razón de un testigo cada 21 surcos. En ambas campañas la siembra se realizó en el mes de diciembre y se siguieron las prácticas agrícolas habituales de la región incluyendo los riegos de apoyo necesarios para asegurar el cuajado de vainas.

Los caracteres evaluados fueron agrupados en dos categorías: arquitectura de la planta y caracteres del rendimiento.

• Caracteres relacionados con la arquitectura de la planta:

- Altura del primer nudo con flor (HLF): Número de nudos desde el suelo hasta la primera flor
- Altura del primer nudo con vaina (HLP): Número de nudos desde el suelo hasta la primera vaina.
- Número de ramas (NTP): Número de ramas que presenta cada planta.
- Número de nudos con flor (NF): Número máximo de nudos que poseen flores.
- Flores por inflorescencia (FPI): Valor medio del número de flores presente en cinco nudos de cada planta.

• Caracteres relacionados con el rendimiento y sus componentes:

- Número de óvulos por vaina (NOP): Valor medio de óvulos de cinco vainas de cada planta.
- Número de semillas por vaina (NSP): Valor medio de granos formados en cinco vainas de cada planta.
- Longitud de vaina (PL): Valor medio de la longitud medida en mm de cinco vainas de cada planta.
- Peso de 100 semillas (HSW): Peso en gramos de 100 semillas de cada planta.
- Número de vainas por planta (PPP).

Para cada familia RIL, la evaluación se realizó de forma individual en cada una de las plantas del surco, descartando las de los extremos, y se calculó el valor medio de las plantas evaluadas. Para el análisis de QTLs, a cada RIL se le asignó el valor medio de los valores obtenidos en cada una de las dos repeticiones de campo. Los análisis de estadística descriptiva y las correlaciones se realizaron con el programa Statistix v 9.1.

1.3.- Análisis de QTLs

Se utilizó el mapa de la población Vf6 × Vf27 desarrollado por Cruz-Izquierdo (2009) y Cruz-Izquierdo et al. (2012). Todos los análisis se desarrollaron utilizando el programa MapQTL 5.0 (Van Ooijen et al. 2000). Para cada uno de los caracteres se siguió el siguiente proceso: en primer lugar se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (KW) para detectar asociación entre los caracteres de interés y los marcadores individuales, sin tener en cuenta la información de mapa. A continuación se desarrolló un análisis de Interval Mapping (IM) (Lander y Botstein, 1989; van Ooijen, 1992).

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis KW e IM se seleccionó un conjunto inicial de cofactores y se determinó su significación con MapQTL 5.0 (Automatic Cofactor Selection, ACS) a $P < 0.02$. Sólo los cofactores significativos fueron utilizados en análisis de mapeo múltiple de QTLs (rMQM y MQM) (Jansen, 1993; 1994; Jansen y Stam, 1994). En todos los análisis (IM, rMQM y MQM) se utilizó una ventana de mapeo de 3 cM. Para establecer los niveles de significación de QTLs se realizó un análisis de 1.000 permutaciones (Churchill y Doerge, 1994). Las posiciones de los QTLs se estimaron en el punto de máximo LOD en el grupo de ligamiento. Se determinó el intervalo de confianza en la posición del QTL utilizando el método 2-LOD descrito por van Ooijen (1992). Todas las figuras relacionadas con mapeo de QTLs fueron obtenidas utilizando el programa MapChart v2.2 (Voorrips 2002).

2.- Validación en distintos fondos genéticos

2.1.- Alineación con otros mapas publicados

En trabajos previos se habían identificado QTLs para caracteres agronómicos utilizando una población F_2 derivada del cruzamiento 29H x Vf136 (Ávila et al. 2005). Estudios recientes han desarrollado el mapa de la población RIL obtenida de esta población (Gutiérrez et al. 2013), en la que se han incluido marcadores ESTs presentes en el mapa utilizado por Cruz-Izquierdo (2009). Estos marcadores permiten la comparación de los resultados obtenidos por Ávila et al. (2005) y Cruz-Izquierdo (2009) utilizando el mapa desarrollado por Gutiérrez et al. (2013) como puente.

Para el alineamiento de los 3 mapas se utilizó el programa MapChart v 2.2 (Voorrips, 2002), que permite establecer las relaciones entre grupos de ligamiento de diferentes mapas en función de los marcadores comunes entre ellos.

2.2.- Validación en los materiales en desarrollo

Para la validación de QTLs en distintos fondos genéticos se escogieron cuatro poblaciones F_2 de entre los cruzamientos llevados a RIL. Estas cuatro poblaciones tienen en común el parental femenino Vf937, de tipo *major*.

Tabla 1: Cruzamientos evaluados a nivel molecular para el estudio preliminar de la relación entre distintas regiones del mapa de *V. faba* y los caracteres en estudio

Cruzamiento	Tipos botánicos	Individuos F_2	Individuos $F_{2,3}$
Vf937 x Vf422	<i>major</i> x <i>equina</i>	82	59
Vf937 x Vf417	<i>major</i> x <i>equina-minor</i>	180	165
Vf937 x Vf751	<i>major</i> x <i>minor</i>	105	100
Vf937 x Vf172	<i>major</i> x <i>paucijuga</i>	108	99

2.3.- Extracción de ADN y análisis de marcadores

La extracción de ADN se realizó utilizando hojas jóvenes recogidas en campo y siguiendo el protocolo de Lassner et al. (1989) con las modificaciones propuestas por Torres et al. (1993). Se incluyeron todos los individuos F_2 de los 4 cruzamientos seleccionados junto con los 5 parentales (Tabla 1). La concentración de ADN de cada muestra se determinó con un espectrofotómetro (UV-Visible Spectrophotometer, Model Evolution 500). A partir de ahí se realizó una dilución de trabajo de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

Para el análisis con marcadores moleculares se seleccionaron 97 ESTs distribuidos a lo largo del mapa de la población RIL Vf6×Vf27. La figura con la ubicación y la tabla con la información sobre los cebadores empleados, se recogen en el Anexo III. La mezcla de reacción consistió, en buffer (1x), 0,8 mM de dNTPs, 1,5 – 2 mM de MgCl₂, 0,6 μM de cada uno de los cebadores y Taq polimerasa 0,05 u/μl. En el perfil de amplificación (Tabla 2), la temperatura de hibridación varió dependiendo del cebador, oscilando entre 56 y 60°C (Anexo III).

Tabla 2: Perfil de amplificación empleado para los marcadores ESTs probados en las 4 poblaciones seleccionadas para nuestro estudio.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre calentamiento	95 °C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	1 min	40
Hibridación	56 - 60 °C	1 min	
Extensión	72 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	8 min	
Enfriamiento	4 °C	∞	

En primer lugar se comprobó la amplificación de los marcadores en los parentales y en seis individuos de cada población F₂. Se detectaron dos tipos de polimorfismo. El primero basado en diferencias de tamaño de los amplicones (marcadores ALP, Amplicon Length Polymorphism) y el segundo basado en diferencias de corte con enzimas de restricción (marcadores CAP, Cleaved Amplified Polymorphism). Para el desarrollo de los marcadores CAPs, se probaron un total de 29 enzimas de restricción y se escogió la enzima idónea en cada caso (Anexo IV). En todos los casos se utilizó 1 unidad de enzima de restricción, mientras que las mezclas de reacción y las condiciones de incubación fueron las recomendadas por el fabricante para cada enzima.

2.4.- Asociación entre marcadores y caracteres

Para cada marcador, la relación entre los polimorfismos detectados y los caracteres estudiados se determinó mediante análisis de la varianza utilizando el programa Statistix v 9.1, siendo el carácter fenotípico la variable dependiente y el genotipo del marcador en la población la variable independiente.

En las poblaciones F₂ se consideraron los siguientes caracteres atendiendo a la nomenclatura indicada anteriormente. Caracteres relacionados con la arquitectura de la planta: HLF, HLP, NTP y FPI; caracteres relacionados con el rendimiento y sus componentes: NOP, NSP, PL, HSW y PPP. También se consideraron el número de

semillas por planta (NSP) y el rendimiento, si bien estos caracteres no habían sido contemplados en los análisis de QTLs.

Posteriormente, se analizaron las familias $F_{2:3}$ en campo abierto durante la campaña 2009/2010, tal y como se describe en el capítulo 1. Los caracteres medidos en cada cruzamiento fueron HLF, HLP, NTP, FPI, PPP, PL, NOP, NSP y HSW, con la única excepción del carácter FPI que no fue evaluado en el cruzamiento Vf937xVf172.

2.5.-Estrategia de genes candidatos para el carácter “altura de planta” y relacionados.

Se obtuvo la correspondencia entre los ESTs flaqueantes de los QTLs para altura de planta, HLF y HLP localizados en el cromosoma III de habas con sus homólogos en la especie modelo mediante la contrastación de la información aportada por Ellwood et al. (2008) con la recopilada en la base de datos de *M. truncatula* CDS versión Mt3.5 y Mt4.0 (<http://medtr.comparative-legumes.org/>). Dada la colinealidad observada entre los genomas de las dos especies (Satovic et al. 2013; Webb et al. 2015), de forma paralela se comprobó la posible ubicación de los genes candidatos para altura de planta descritos por Lagunes-Espinoza et al. (2012) con el fin de determinar el posible papel de estos genes en el control de los caracteres considerados en *V. faba*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Evaluación fenotípica de la población RIL Vf6 x Vf27

Se seleccionaron 10 caracteres de los analizados por Cruz-Izquierdo (2009) para su validación. Entre los no considerados se encuentran los 4 caracteres relacionados con la floración ya que este carácter será tratado en profundidad en otro trabajo en el que colabora nuestro grupo (Dra. Torres, comunicación personal).

Los caracteres seleccionados fueron agrupados en 2 categorías: relacionados con la arquitectura de la planta [altura del primer nudo con flor (HLF), altura del primer nudo con vaina (HLP), número de ramas (NTP), número de nudos con flor (NF) y flores por inflorescencia (FPI)]; y los directamente relacionados con el rendimiento: [Número de óvulos por vaina (NOP), número de semillas por vaina (NSP), longitud de vaina (PL), peso en gramos de 100 semillas (HSW) y vainas por planta (PPP)]. Desgraciadamente estos últimos 5 caracteres no se pudieron evaluar en la primera campaña debido a que las plantas no completaron de manera adecuada el ciclo del cultivo.

La Tabla 3 y la Figura 1 muestran los datos y su distribución para cada carácter:

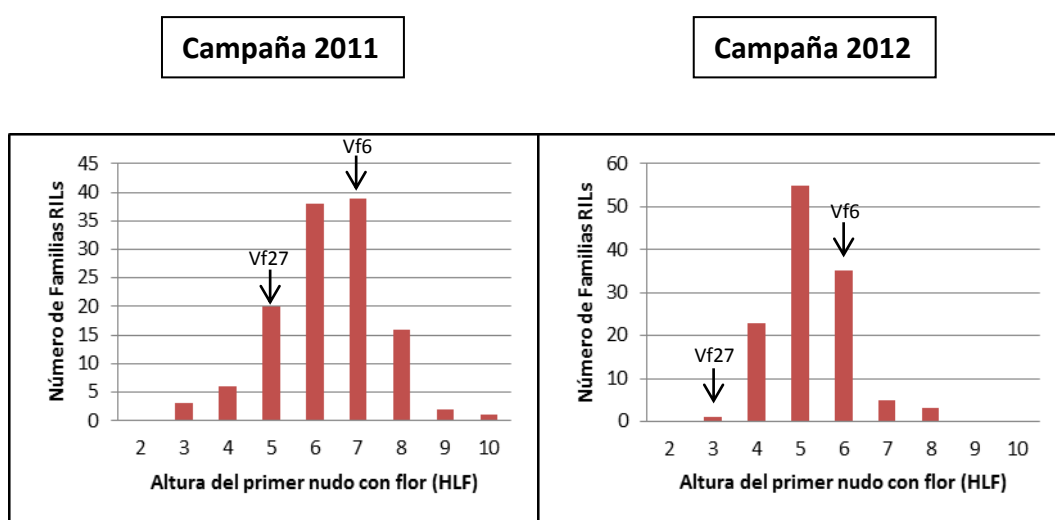


Figura 1: Distribución de los caracteres estudiados en la población RIL del cruzamiento Vf6 x Vf27 en las dos campañas evaluadas. HLF: altura del primer nudo con flor; HLP: Altura del primer nudo con vaina; FPI: Flores por inflorescencia; NF: Número de nudos con flor; NTP: Número de ramas.

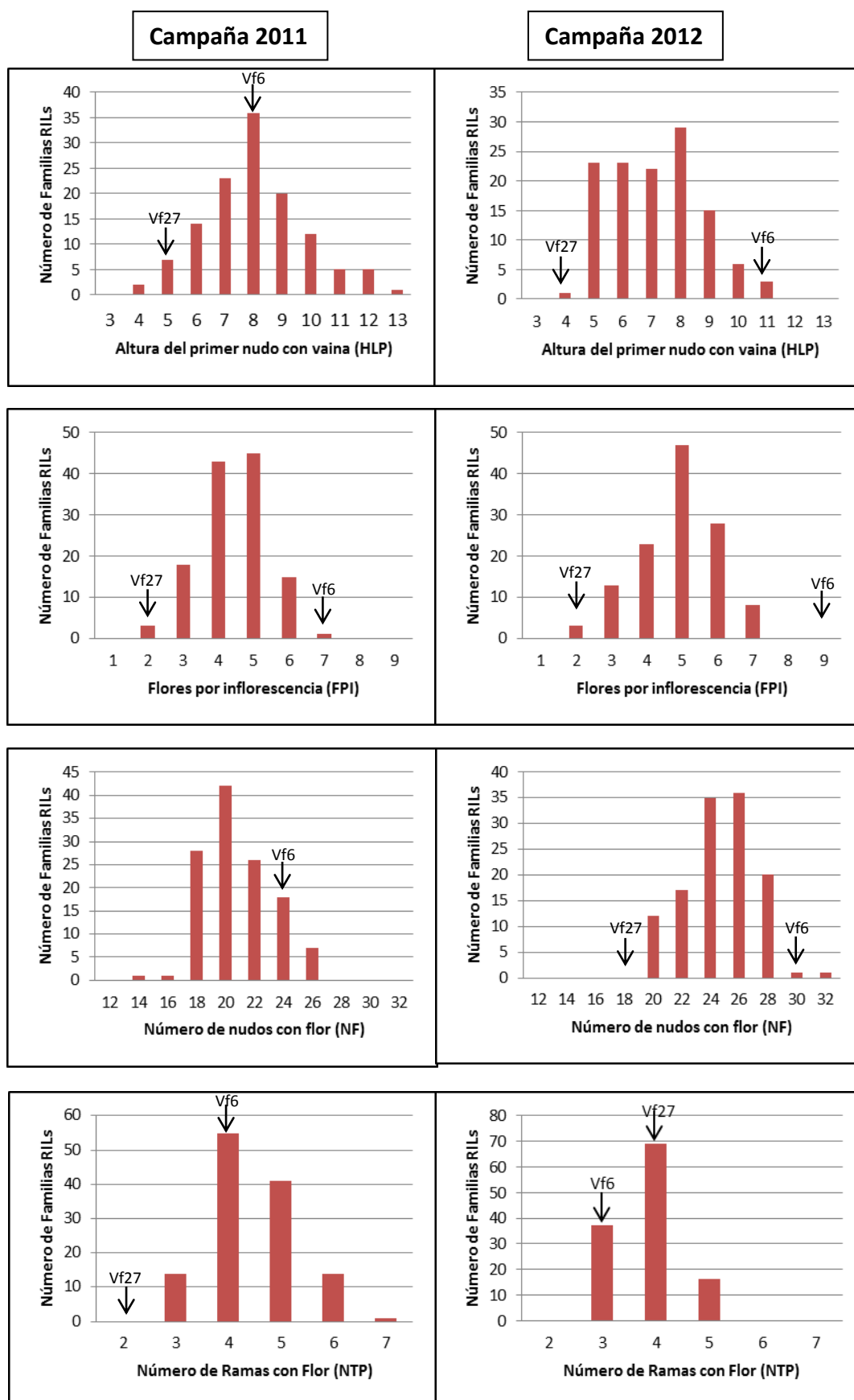


Figura 1 (continuación): Distribución de los caracteres estudiados en la población RIL del cruzamiento Vf6 x Vf27 en las dos campañas evaluadas. HLF: altura del primer nudo con flor; HLP: Altura del primer nudo con vaina; FPI: Flores por inflorescencia; NF: Número de nudos con flor; NTP: Número de ramas.

Campaña 2012

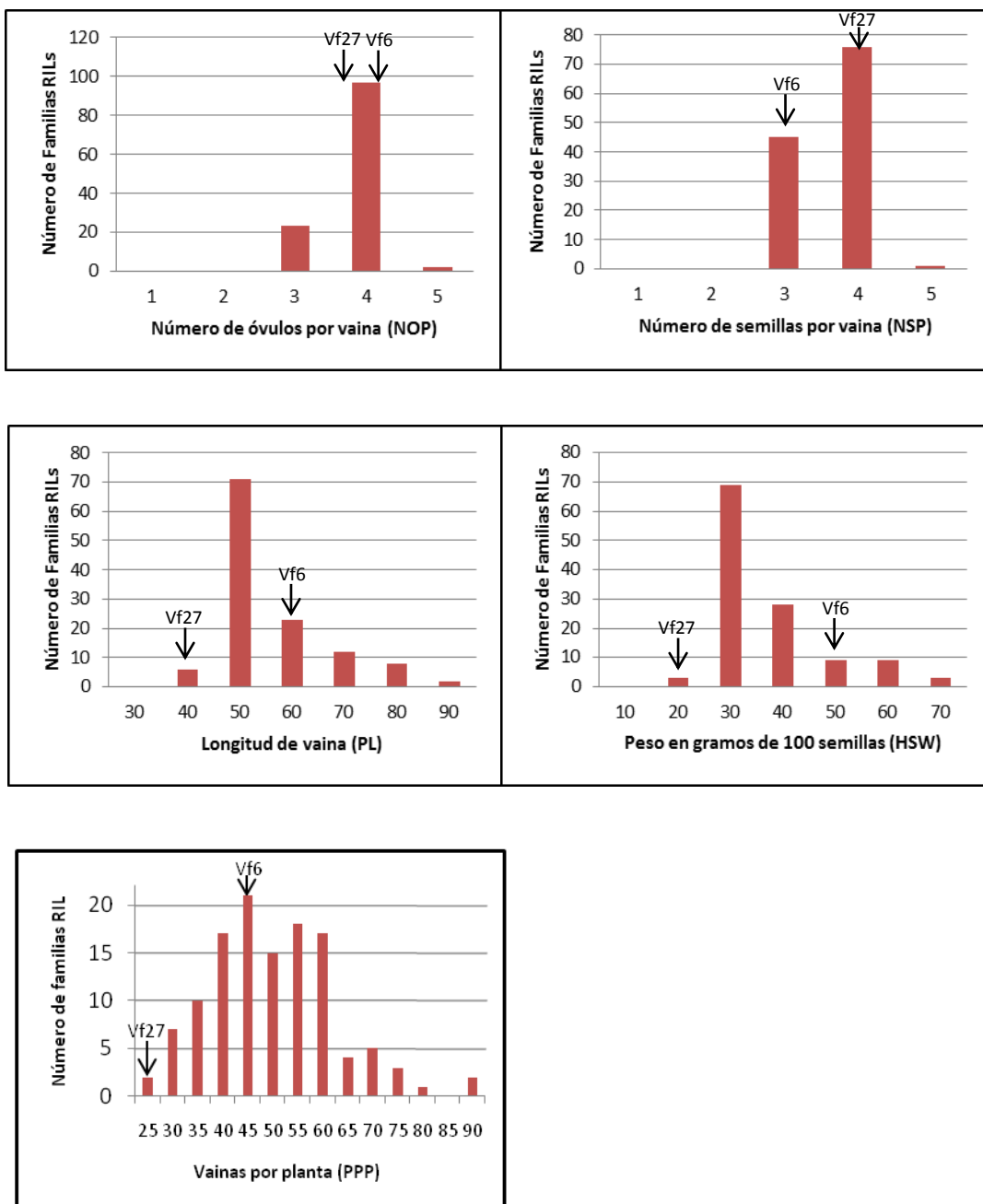


Figura 1 (continuación): Distribución de los caracteres estudiados en la población RIL del cruzamiento Vf6 x Vf27 en las campañas evaluadas. NOP: Número de óvulos por vaina; NSP: Número semillas por vaina; PL: Longitud de vaina; HSW: Peso de 100 semillas; PPP: Vainas por planta.

Tabla 3: Estadísticos descriptivos de los caracteres evaluados en las campañas 2011 y 2012.

Carácter	Año	Parentales		Población RILs									
		Vf27	Vf6	N	Media	DE	Varianza	C.V.	Mínimo	Máximo	Asimetría	Kurtosis	p(W)
HLF	2011	4,55	6,76	123	5,84	1,26	1,59	21,60	2,70	9,10	-0,13	-0,16	ns
	2012	3,06	6,08	122	4,74	0,86	0,73	18,10	2,71	7,31	0,44	0,32	0,004
HLP	2011	4,64	8,00	123	7,61	1,76	3,11	23,18	3,30	12,40	0,15	0,24	ns
	2012	3,56	10,83	122	6,68	1,57	2,46	23,50	3,58	10,50	0,30	-0,66	0,0001
FPI	2011	1,06	6,14	123	3,89	0,89	0,78	22,74	1,80	6,40	-0,05	-0,21	ns
	2012	1,17	8,81	122	4,38	1,04	1,09	23,79	1,74	6,96	-0,25	-0,16	ns
NF	2011	M	23,27	121	19,72	2,63	6,94	13,36	13,60	26,00	0,30	-0,52	ns
	2012	16,79	29,87	122	23,67	2,45	5,98	10,33	18,50	30,88	-0,05	-0,26	ns
NTP	2011	1,60	3,76	123	3,99	0,82	0,67	20,52	2,20	6,90	0,45	0,54	0,0005
	2012	3,73	2,83	122	3,36	0,56	0,31	16,58	2,21	4,70	0,07	-0,58	ns
PL (mm)	2012	37,81	55,11	122	51,38	10,29	105,91	20,03	36,45	87,19	1,48	1,86	0,0000
NOP	2012	3,06	3,15	122	3,31	0,31	0,10	9,33	2,67	4,14	0,15	-0,47	ns
NSP	2012	3,03	2,80	122	3,14	0,35	0,12	11,11	2,20	4,06	-0,04	-0,13	ns
HSW (g)	2012	18,20	44,32	122	32,24	10,99	120,67	34,08	15,48	74,74	1,55	2,11	0,0000
PPP	2012	23,97	42,06	122	47,28	12,68	160,89	26,83	20,88	86,92	0,51	0,34	0,075

HLF: Altura del primer nudo con flor, HLP: Altura del primer nudo con vaina, FPI: Flores por inflorescencia, NF: Número de nudos con flor, NTP: Número de ramas, PL: Longitud de vaina, NOP: Número de óvulos por vaina, NSP: Número de semillas por vaina, HSW: Peso en gramos de 100 semillas, PPP: vainas por planta. N: Número de líneas RILS, DE: Desviación estándar; E: Error estándar; CV: Coeficiente de variación (%), P(W): Valor de probabilidad de la prueba de normalidad de Shapiro Wilk.

Al igual que en el trabajo previo de Cruz-Izquierdo (2009), los caracteres estudiados presentan una variación continua lo que justifica el análisis de QTL para el estudio de la base genética de los mismos. Los análisis de la varianza (ANOVA) se han realizado teniendo en cuenta 3 ó 4 campañas de campo dependiendo del carácter, es decir, se han tenido en cuenta los datos analizados por Cruz-Izquierdo (2009) y los obtenidos en nuestro trabajo (Tabla 4). Las líneas Vf27 (*paucijuga*) y Vf6 (*equina*) son muy diferentes como corresponde a sus tipos botánicos, por lo que se esperaba un alto nivel de polimorfismo tanto a nivel fenotípico como molecular. De hecho, el factor Genotipo mostró una alta significación en los ANOVA al igual que ocurrió en los estudios previos de Cruz-Izquierdo (2009) (Tabla 4).

La interacción Genotipo×Ambiente fue significativa en todos los caracteres estudiados (Tabla 4), lo que pone de manifiesto la importancia de validar los QTLs obtenidos en un número suficiente de campañas para obtener información útil para el programa de mejora de la especie. Resultados similares fueron encontrados por Cruz-Izquierdo (2009), si bien, en su caso, esta interacción no fue significativa para NF y HSW.

Tabla 4: ANOVA de los caracteres evaluados en la población RIL del cruzamiento Vf6 x Vf27 en dos campañas en Córdoba, España.

Carácter	Fuente de Variación			h ²
	Año	Genotipo	Año*Genotipo	
NTP	44,16***	4,46***	1,6***	0,65
FPI	32,48**	23,94***	2,25***	0,91
NF	8,25 ns	3,65***	1,27*	0,67
HLF	115,6**	3,34***	1,53***	0,55
HLP	4,7 ns	4,86***	1,61**	0,68
PL	29,48*	19,5***	3,42***	0,83
NOP	83,65**	5,67***	1,46***	0,67
NSP	93,66**	7,32***	2,32***	0,70
HSW	102,29**	27,05***	3,43***	0,88

NTP: Número de ramas, **FPI:** Número de flores por inflorescencia, **NF:** Número de nudos con flor, **HLF:** Altura del primer nudo con flor, **HLP:** Altura del primer nudo con vaina, **PL:** Longitud de vaina, **NOP:** Número de óvulos por vaina, **NSP:** Número de semillas por vaina, **HSW:** Peso en gramos de 100 semillas, **h²:** Heredabilidad.

*,**,***: Significativo al 5%, 1% y 0,1% de probabilidad respectivamente, **ns:** No significativo.

Los valores de heredabilidad oscilaron entre 0,55 (HLF) y 0,91 (FPI) (Tabla 4). En general los valores determinados son similares a los descritos en trabajos previos (Ghandorah y El'Shawaf, 1993; Toker, 2004; Kalia y Pathania, 2007; Cruz-Izquierdo,

2009). Los valores más altos fueron obtenidos para FPI (0,91), HSW (0,88) y PL (0,83) y el menor lo mostró HLF.

En cada campaña se determinó la correlación entre caracteres (Tablas 5 y 6). En la campaña de 2011, la mayor correlación se dio entre HLP y HLF ($r = 0,73$), valor que descendió ligeramente en la siguiente campaña ($r = 0,64$) (Tablas 5 y 6). Estos valores son comparables a los obtenidos en la campaña 2008 por Cruz-Izquierdo (2009) y superiores a los obtenidos por el mismo autor en el año 2007.

Tabla 5: **Coefficientes de correlación (r) de Pearson para los caracteres evaluados en la población RIL de Vf6 x Vf27 en la campaña 2011.**

	FPI_2011	HLF_2011	HLP_2011	NF_2011
HLF_2011	0,28			
p-value	0,000			
HLP_2011	0,41	0,73		
	0,000	0,000		
NF_2011	0,38	-0,06	0,12	
	0,000	0,541	0,173	
NTP_2011	-0,16	0,15	0,03	-0,17
	0,079	0,099	0,750	0,062

Valor de coeficiente de correlación (r) de **FPI**: Número de flores por inflorescencia; **HLF**: Número de nudos hasta la primera flor; **HLP**: Número de nudos hasta la primera vaina; **NF**: Número máximo de inflorescencias; **NTP**: Número de ramas. **p-value**: Nivel de significación. Valor significativo <0,05.

En la campaña 2012 se obtuvieron datos de los caracteres rendimiento, lo que nos permitió corroborar la fuerte correlación entre NSP y NOP ($r=0,93$) ya descrita en el trabajo de Cruz-Izquierdo (2009). Este autor obtuvo correlaciones de 0,95 y 0,91 para estos caracteres en las campañas 2007 y 2008, respectivamente. También se conserva la alta correlación entre PL y HSW (Tabla 6). Sin embargo los valores de correlación obtenidos en nuestro trabajo son más altos que los obtenidos por Cruz-Izquierdo (2009). De hecho, nuestros datos indican una correlación de 0,92 (Tabla 6), superiores a los valores en torno a 0,70 descritos por Cruz-Izquierdo (2009) en las dos campañas evaluadas.

PL mostró correlaciones significativas con otros 5 caracteres (FPI, HLF, HLP, NOP, NSP) pero con valores inferiores a 0,4 (Tabla 6). La baja correlación de PL con NOP y NSP concuerda con los resultados previos (Cruz-Izquierdo, 2009).

FPI también mostró correlaciones significativas superiores a 0,5 con HLP y NF, que a su vez presentaron una correlación de 0,5 entre ellos (Tabla 6). La mayoría de estas correlaciones también resultaron significativas en la campaña anterior si bien los valores de r fueron inferiores a 0,5 (Tabla 5).

Tabla 6. Coeficientes de correlación (r) de Pearson para los caracteres evaluados en la población RIL de Vf6 x Vf27 en la campaña 2012

	FPI_2012	HLF_2012	HLP_2012	HSW_2012	NF_2012	NOP_2012	NSP_2012	NTP_2012	PL_2012
HLF_2012	0,28								
p-value	0,000								
HLP_2012	0,53	0,64							
p-value	0,000	0,000							
HSW_2012	0,21	0,26	0,33						
p-value	0,018	0,003	0,000						
NF_2012	0,52	0,25	0,50	0,15					
p-value	0,000	0,006	0,000	0,110					
NOP_2012	0,04	0,04	0,06	0,14	-0,12				
p-value	0,644	0,659	0,494	0,134	0,194				
NSP_2012	-0,04	0,04	0,02	0,13	-0,13	0,93			
p-value	0,665	0,654	0,805	0,148	0,141	0,000			
NTP_2012	-0,08	-0,14	-0,05	0,06	-0,21	-0,01	0,02		
p-value	0,353	0,113	0,570	0,486	0,019	0,943	0,866		
PL_2012	0,21	0,25	0,28	0,92	0,09	0,34	0,36	0,07	
p-value	0,020	0,005	0,002	0,000	0,326	0,000	0,000	0,458	
PPP_2012	0,10	-0,05	-0,15	-0,31	0,15	-0,24	-0,28	0,33	-0,30
p-value	0,283	0,582	0,101	0,001	0,100	0,008	0,002	0,000	0,001

Valor de coeficiente de correlación (r) entre los caracteres evaluados en la campaña 2012. **FPI**: Número de flores por inflorescencia; **HLF**: Número de nudos hasta la primera flor; **HLP**: Número de nudos hasta la primera vaina; **HSW**: Peso de 100 semillas; **NF**: Número máximo de inflorescencias; **NOP**: Número de óvulos por vaina; **NSP**: Número de semillas por vaina; **NTP**: Número de ramas; **PL**: Longitud de la vaina; **PPP**: Número de vainas por planta. **p-value**: Nivel de significación. Valor significativo $p < 0,05$.

2. Identificación y validación de QTLs para arquitectura y rendimiento en la población Vf6×Vf27

Los resultados del análisis de QTLs en las dos campañas estudiadas se muestran en la Tabla 7. En general, la presencia de un QTL se ha considerado atendiendo al límite establecido mediante permutaciones. Sin embargo, en algunos casos que se irán indicando, se han aceptado QTLs cuyo LOD máximo era inferior al nivel crítico determinado.

Para mayor claridad hemos unificado la nomenclatura de los QTLs obtenidos en nuestro trabajo y en los estudios previos de nuestro de grupo (Cruz-Izquierdo, 2009; Cruz-Izquierdo et al. 2012). De este modo, un hipotético QTL denominado HLF-7-2018 indicaría que es el séptimo QTL identificado para HLF (altura del primer nudo con flores) y que fue detectado con los datos de la campaña 2018.

2.1.-Caracteres relacionados con la arquitectura de la planta

2.1.1.- Altura del primer nudo con flor (HLF)

Se detectaron dos QTLs significativos para este carácter, uno en cada campaña evaluada, situados respectivamente en los cromosomas III y V (Tabla 7; Figura 2). El primero de ellos (HLF-1-2011) explicó el 27,1% de la variación fenotípica del carácter en el año 2011. En la misma región, en la siguiente campaña se observó un posible QTL (HLF-1-2012*) que, si bien no superó el valor crítico establecido mediante permutaciones, quedó muy próximo al mismo. (Tabla 7; Figura 2). En esa zona, además, Cruz-Izquierdo (2009) ya había detectado otro máximo de LOD para el mismo carácter (HLF-1-2008; Figura 2). La detección de estos máximos de LOD, en la misma región y en varias campañas indica la estabilidad de HLF-1, por lo que este QTL puede ser un buen candidato para su uso en los programas de mejora para este carácter.

En el año 2012 se detectó un segundo QTL (HLF-3-2012) en el LG07 del cromosoma V que explicaba el 11,8% de la variación del carácter (Tabla 7; Figura 2). En el mismo cromosoma ya se había detectado un QTL para este carácter (HLF-4_2008, Figura 2). Sin embargo, HLF-3 y HLF-4 se encuentran demasiado distantes por lo que, de momento, han sido considerados distintos a la espera de posteriores estudios. Cruz-Izquierdo (2009) describió un QTLs adicional (HLF-2-2008) en el cromosoma I (LG04) (Figura 2). Sin embargo, este QTL no ha podido ser confirmado en nuestro trabajo.

2.1.2.- Altura del primer nudo con vaina (HLP)

Para este carácter se identificaron dos QTLs (Tabla 7; Figura 2). En el año 2011, detectamos HLP-1-2011, que explicó el 15% de la variabilidad fenotípica y se situó en el cromosoma III (grupo GL01) en una región muy próxima a HLP-1-2008 descrito por Cruz-Izquierdo (2009) (Figura 2). En esta región también se había identificado un máximo relativo en la curva de LOD cercano al valor crítico de permutaciones (HLP-1-2007*). En conjunto, estos datos indican la existencia de un QTL para HLP en esta zona, en la que además también se han detectado consistentemente un QTL para HLF (Figura 2). Los valores de aditividad de HLP-1 fueron positivos en las tres campañas en las que fue detectado, lo que indica que el aumento del valor del carácter proviene del alelo materno, es decir de Vf6.

El segundo QTL fue detectado en la siguiente campaña (HLP-2-2012) en el cromosoma I, muy cerca de la posición descrita por Cruz-Izquierdo (2009) para HLP-2-2008, lo que sugiere que se trata del mismo QTL (Figura 2). HLP-2-2012 explicó el 16,9% de la variabilidad total y también presentó aditividad positiva (Tabla 7).

La validación de HLP-1 y HLP-2 en distintas campañas indica que ambos QTLs presentan una buena estabilidad. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para HLF y HLP, parece que la región asociada en el cromosoma III puede ser bastante importante en el control genético de ambos caracteres. Este hecho, junto con la alta correlación encontrada entre ellos (Tablas 5 y 6) podría indicar la existencia de genes pleiotrópicos para el control de estos caracteres, si bien esta hipótesis tendrá que ser confirmada en futuros estudios. En trabajos previos ya se había observado co-localización de QTLs para ambos caracteres (Ávila et al. 2005), lo que refuerza la hipótesis de un control genético común para ambos caracteres. Del mismo modo, las regiones del cromosoma I, y en menor medida del cromosoma V, también tienen potencial para la selección de estos caracteres.

Tabla 7: QTLs detectados para caracteres agronómicos en la población RIL Vf6x Vf27

Carácter	Grupo ^a	Crom	Posición	LOD	Marcador 1	Otro nombre	Marcador 2	Otro nombre	% Expl.	Aditividad	LOD threshold ^b
HLF-1-2011	GL01	III	226,1	4,56	M1U046	Lup328	M1U047	GLIP651a	27,1	0,663521	3,13
HLF-1-2012 [*]	GL01	III	241,2	2,72	M1U047	GLIP651a	M1U224	mt_1090_01	19,9	0,592328	3,04
HLF3-2012	GL07	V	21,8	3,09	M1U085	GLIP099	MCo048	Pis_GEN_6_3_1	11,8	0,428146	3,04
HLP-1-2011	GL01	III	223,1	3,02	M1U044	PTSS4a	M1U047	GLIP651a	15	0,692344	2,98
HLP-2-2012	GL04	I	93,4	5,18	M1U230	GAI68	M1U144	OPC14_894	16,9	0,641501	3,2
FPI-1-2011	GL04	I	143	7,48	M1U058	Lup91	M1U061	FENR	29,9	0,488053	3,03
FPI-1-2012	GL04	I	146	8,29	M1U058	Lup91	M1U061	FENR	31,7	0,584105	3,16
FPI-2-2011	GL06	I	13,4	4,56	M1U092	LG23	MCo027	Pis_GEN_7_1_2_1	15,3	0,355318	3,03
FPI-2-2012	GL06	I	10,4	5,65	M1U091	LG18	MCo027	Pis_GEN_7_1_2_1	15,3	0,42998	3,16
FPI-5-2011	GL02	II	297,4	3,42	M1U072	Lup123	M1U074	AnMtL6	15,8	0,347103	3,03
NF-4-2011	GL02	II	306,4	3,62	M1U072	Lup123	M1U075	AnMtL8	17,3	1,10581	3,04
NF-5-2012	GL06	I	19,7	5,8	M1U093	Lup52	M1U094	PEPCASE	16,5	1,01495	3,08
NF-6-2012	GL08	I	81,7	3,93	MCo045	GAI30	M1U182	OPJ10_3	12,1	0,858177	3,08
NF-7-2012	GL14	S/A	9	3,12	M1U120	PGDHb	MCo035	psmt_EST_00196_01_1	9,7	0,753202	3,08
NTP-1-2012 [*]	GL01	III	77,7	2,84	M1U237	SM4	M1U032	MMK1b	10,6	-0,183078	3,13
PL-5-2012	GL05	VI	112,2	4,55	M1U055	GLIP429a	MCo052	GLIP081	17	4,39149	3,76
NOP-1-2012	GL05	VI	68,1	2,71	M1U163	OPI16_395	MCo007	mtmt_GEN_01109_01_1	10,7	-0,100846	3,16
NSP-1-2012	GL05	VI	74,8	3,65	MCo007	mtmt_GEN_01109_01_1	M1U135	OPA11_664	14,4	-0,139431	3,07
HSW-5-2012	GL03	IV	222,9	4,53	M1U028	GLIP169	MCo053	mtmt_GEN_00861_03_1	13,5	4,0402	2,8
HSW-1-2012	GL05	VI	115,1	3,57	MCo056	MMK1a	MCo052	mtmt_GEN_00510_01_1	10,6	3,67514	2,8

HLF: Altura de la primera flor, **HLP:** Altura de la primera vaina, **FPI:** Flores por inflorescencia, **NF:** Número máximo de inflorescencia, **NTP:** Número de ramas, **PL:** Longitud de vaina, **NOP:** Número de óvulos por vaina, **NSP:** Número de semillas por vaina, **HSW:** Peso de 100 semillas. **a:** GL14 no está asignado a ningún cromosoma. **b:** LOD threshold determinado usando el sistema de 1000 permutaciones. () QTLs que pese a no superar el valor crítico de LOD, hemos tenido en cuenta en la descripción de los resultados

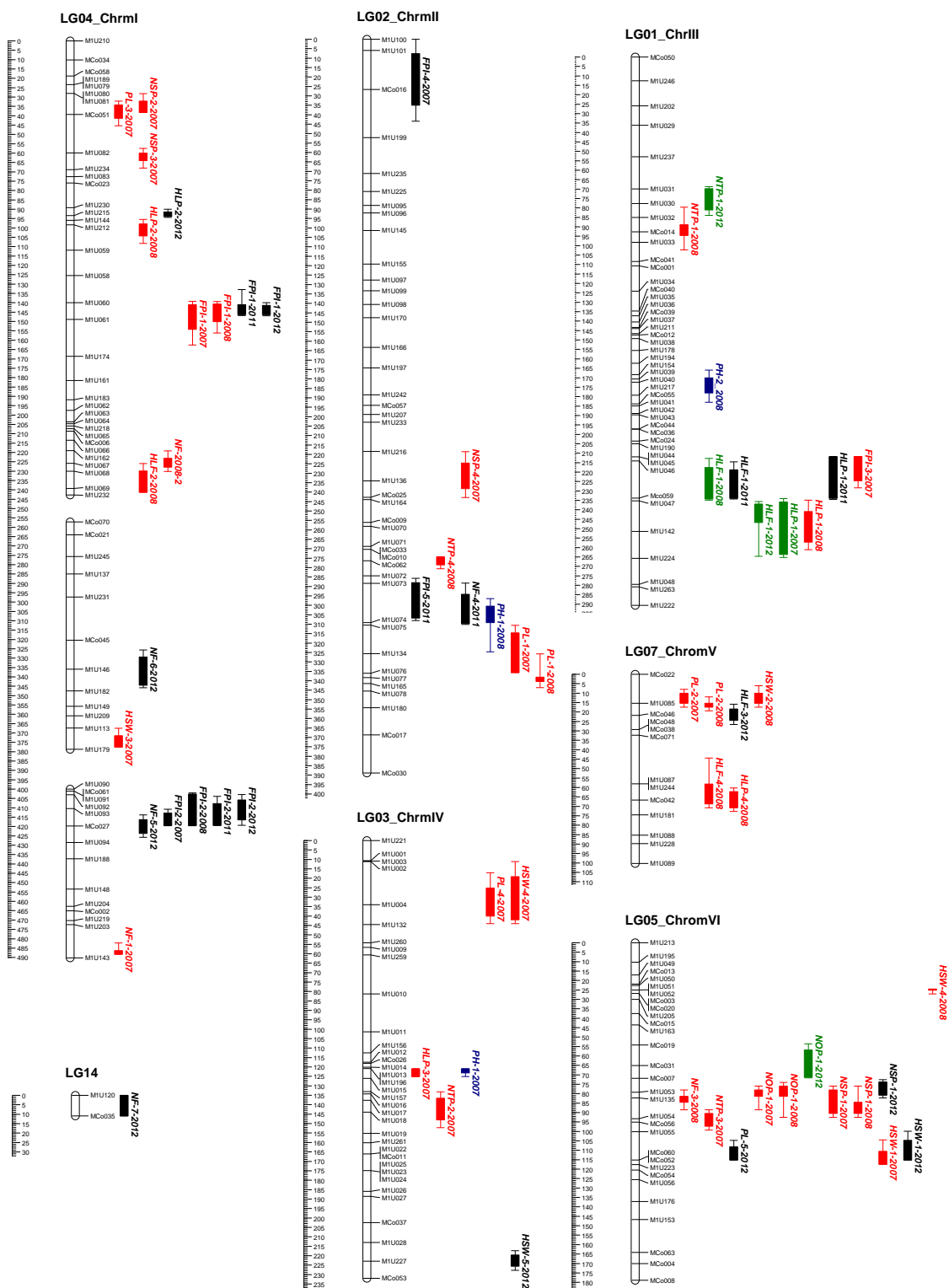


Figura 2: Identificación de QTLs para caracteres agronómicos en la población RIL derivada del cruzamiento Vf6xVf27. **HLF:** Número de nudos hasta la primera flor; **HLP:** Altura del primer nudo con vaina; **NTP:** Número de ramas/planta; **NF:** Nudos con flores; **FPI:** Flores por inflorescencia; **NOF:** Número de óvulos por vaina; **NSP:** Número de semillas por vaina; **PL:** Longitud de vaina; **HSW:** Peso de 100 semillas; La posición de los QTLs se representa considerando intervalos de 1-LOD (cajas) y 2-LOD (intervalos). Código de colores: Negro: QTLs identificados en este trabajo; Rojo: QTLs identificados por Cruz-Izquierdo (2009); Verde: QTLs cuyo LOD máximo no superó el LOD crítico establecido mediante permutaciones; Azul: QTLs para el carácter “altura de planta” (PH) calculados por Cruz-Izquierdo (2009).

2.1.3.- Flores por inflorescencia (FPI)

El análisis de QTLs permitió la identificación de 3 QTLs para este carácter. El primero de ellos fue detectado en los dos años en estudio (FPI-1-2011; FPI-1-2012) (Tabla 7; Figura 2), explicando el 29,9 y el 31,7% de la variación fenotípica en sus respectivas campañas y con valores de aditividad positiva. La posición de estos QTLs en el cromosoma I (GL04) coincidió plenamente con los resultados obtenidos por Cruz-Izquierdo (2009) (Figura 2).

Del mismo modo, los análisis de QTLs de las dos campañas permitieron determinar la estabilidad del QTL FPI-2, que fue localizado de forma consistente en ambas campañas (FPI-2-2011; FPI-2-2012) (Tabla 7; Figura 2). Al igual que en el caso anterior, la posición de este QTL coincidía totalmente con los resultados obtenidos por Cruz-Izquierdo (2009) para este QTL (FPI-2-2007; FPI-2-2008) (Figura 2), situándose en el GL06 del cromosoma I. Tanto en la campaña 2011, como en la de 2012, FPI-2 explicó un 15,3% de la varianza fenotípica y presentó valores de aditividad positivos.

Por último, se identificó un nuevo QTL (FPI-5-2011) en el cromosoma II (Tabla 7; Figura 2), muy alejado del QTL identificado por Cruz-Izquierdo (2009) en este cromosoma (FPI-4-2007; Figura 2). Por tanto, ambos QTLs se caracterizan por una escasa estabilidad ya que sólo han sido detectados en una campaña de las cuatro analizadas.

Los resultados obtenidos para FPI-1 y FPI-2 son relevantes, ya que se ha comprobado la estabilidad de ambos QTLs en 4 campañas distintas, lo que los convierte en idóneos para la identificación de genes candidatos responsables del carácter. Para ello deberíamos explotar la información ofrecida por los marcadores flanqueantes de los intervalos de confianza calculados para cada QTL. Se trata de marcadores ESTs originados a partir de otras especies de leguminosas, entre ellas la especie modelo *M. truncatula*. El establecimiento de las relaciones de sintenia entre nuestro mapa y la secuencia y/o mapa de esta especie nos puede permitir la saturación dirigida de las áreas de interés y por tanto una mejor acotación de los QTLs y de los genes candidatos responsables del carácter.

2.1.4.- Número de nudos con flor (NF)

El trabajo de Cruz-Izquierdo (2009) había permitido la identificación de 2 QTLs para este carácter en el cromosoma I (NF-1-2007 y NF-2-2008) (Figura 2). Nuestros resultados no permitieron validar ninguno de ellos, pero identificaron 4 QTLs adicionales, 1 en la

campana 2011 (NF-4-2011) y 3 en la 2012 (NF-5-2012, NF-6-2012, NF-7-2012) (Tabla 7; Figura 2). La falta de estabilidad en todos los casos sugiere que ninguno de estos QTLs es un buen candidato para el desarrollo de una estrategia de MAS en los programas de mejora de habas, ya que la validación de los QTLs es un requisito previo imprescindible.

2.1.5.- Número de ramas (NTP)

Para este carácter tampoco se identificaron QTLs significativos. Tan sólo cabe reseñar un máximo relativo en la curva de LOD, NTP-1-2012* detectado en el GL01 del cromosoma III, muy cercano al valor crítico de LOD establecido por permutaciones (2,83 vs 3,13) (Tabla 7). Se ha considerado este posible QTL porque su posición solapa con la descrita por Cruz-Izquierdo (2009) para NTP-1-2008 (Figura 2), lo que sugiere la conservación del QTL en dos de las campañas ensayadas. Ambos QTLs presentan una aditividad negativa y explican porcentajes parecidos de la variación fenotípica del carácter (13,5% y 10,6% para NTP-1-2008 y NTP-1-2012, respectivamente).

Cruz-Izquierdo (2009) ya destacaba en su trabajo la gran influencia del ambiente sobre este carácter. De hecho sus resultados permitieron identificar 4 QTLs, dos en cada campaña evaluada, pero sin que se pudiera validar ninguno de ellos. Además, los QTLs identificados en el año 2007 mostraron una aditividad positiva, mientras que los de 2008 la presentaron negativa.

2.2.-Caracteres relacionados con el rendimiento

Como se explicó en los materiales y métodos, sólo disponemos de datos de la campaña 2012 para estos caracteres.

2.2.1.- Longitud de vaina (PL)

En el trabajo previo de Cruz-Izquierdo (2009) se describieron varios QTLs asociados a la longitud de vaina, pero sólo dos, situados en los cromosomas II y V, se mantuvieron estables en las dos campañas de evaluación (Cruz-Izquierdo et al. 2012) (Figura 2). En nuestro trabajo hemos obtenido un único QTL significativo, (PL-5-2012) cuyo máximo de LOD se situó a 112,2 cM del origen del grupo de ligamiento asignado en el mapa al cromosoma VI. Este QTL explicó el 17% de la variación fenotípica y mostró una aditividad positiva (Tabla 7). Hasta el momento esta región no se había asociado con el carácter PL. Sin embargo, PL-5-2012 se encuentra en una región donde se co-

localizan QTLs para caracteres correlacionados como HSW, NOP o NSP (Tabla 6; Figura 2) como se discutirá en siguientes apartados.

2.2.2.- Número de óvulos por vaina (NOP)

Nuestros datos no permitieron la identificación de QTLs que superasen el nivel de LOD establecido mediante permutaciones. Sin embargo, se detectó una región (NOP-1-2012*) con un máximo relativo en la curva de LOD en el GL05, asignado al cromosoma VI de *V. faba*, a 68,1 cM de su origen (Tabla 7). Esta región coincide con los resultados de Cruz-Izquierdo et al. (2012) (Figura 2), por lo que nuestros resultados sugieren que se trata del mismo QTL y refuerzan su estabilidad. De hecho, la localización de NOP-1 en tres campañas indica que este QTL es un buen candidato para la saturación y desarrollo de marcadores útiles para la selección. NOP-1-2012* explicó un 10,7% de la variación fenotípica, y como en las campañas anteriores presentó aditividad negativa (Tabla 7).

En cualquier caso, este cruzamiento presenta poca variabilidad para este carácter, como se puede observar en el histograma correspondiente (Figura 1). De ahí que se recomiende el uso de un material más extremo para profundizar en la determinación de su base genética, como paso previo al desarrollo de estrategias de MAS.

2.2.3.-Número de semillas por vaina (NSP)

Se identificó un único QTL (NSP-1-2012) en la misma región del cromosoma VI donde se ubica NOP-1-2012 (Figura 2). Este QTL explicó un 14,4% de la variación fenotípica encontrada y presentó aditividad negativa (Tabla 7). Su posición coincide con los resultados previos de Cruz-Izquierdo et al. (2012) en 2 campañas sucesivas (NSP-1-2007; NSP-1-2008) (Figura 2). De ahí que este QTL sea un buen candidato para la obtención de marcadores útiles para la selección. Este hecho es relevante ya que NSP es uno de los principales componentes del rendimiento. La co-localización de QTLs para NOP y NSP sugiere de nuevo la posibilidad de que haya genes distintos, situados físicamente cerca, responsables de la base genética de los dos caracteres o bien, la existencia de un único gen con efecto pleiotrópico sobre ambos. La alta correlación existente entre ambos caracteres (Tabla 6) apunta hacia esta última posibilidad.

2.2.4.- Peso en gramos de 100 semillas (HSW)

Se detectaron dos QTLs significativos para HSW. El primero fue HSW-1-2012, localizado en el cromosoma VI (GL05) en concordancia con los resultados de Cruz-Izquierdo (2009) (HSW-1-2007; Figura 2). En ambos casos los valores de aditividad fueron positivos y explicaron porcentajes similares de la variación observada (12,3% en 2007 y 10,6% en 2012). También se identificó HSW-5-2012 en la parte distal del GL03 adscrito al cromosoma IV (Tabla 7; Figura 2). Este QTL también mostró aditividad positiva y explicó el 13,5% de la variación fenotípica, pero su interés es menor al no haber sido validado en diferentes campañas.

2.2.5.- Número de vainas por planta (PPP)

Nuestros resultados no han permitido identificar ningún QTL significativo para este carácter. Por tanto, el único QTL identificado para este carácter en el cromosoma VI por Cruz-Izquierdo (2009) permanece sin validar, ya que fue detectado sólo con los datos de su segunda campaña.

2.3. Resumen de los resultados obtenidos en este apartado

Después de dos nuevos años de experimentación hemos podido validar QTLs identificados previamente en el trabajo de Cruz-Izquierdo (2009). Algunos de ellos se habían mostrado estables en las dos primeras campañas de evaluación, con lo que nuestros resultados refuerzan los allí obtenidos y confirman la posibilidad de usar la información obtenida en los programas de mejora y también en el desarrollo de herramientas moleculares que faciliten el proceso de selección. En este caso se encuentran QTLs para HLP (HLP1-2007; 2008; 2012 en el cromosoma III), FPI (FPI1-2007; 2008; 2011; 2012 y FPI-2 2007; 2008; 2011; 2012, ambos identificados en el cromosoma I), NOP (NOP1-2007; 2008; 2012 en el cromosoma VI) y NSP (NSP1-2007; 2008; 2012). En los últimos dos casos el carácter no fue medido en la campaña 2011 por lo que no se puede asegurar que estos QTLs fueran también estables en la campaña 2011.

Así mismo, se han validado otros QTLs que se habían detectado con los datos de una única campaña. De esta forma, para la altura de primera flor se ha validado un QTL en el cromosoma III (HLF1-2008; 2011; 2012). De la misma forma se ha validado otro para HLP (HLP-2-2008 y 2012) y para NTP (NTP1-2008 y 2012 en el cromosoma III) y HSW (HSW1-2007 y 2012).

Si consideramos todos los resultados en conjunto, se constata la acumulación de QTLs en determinadas áreas del mapa de ligamiento. Cruz-Izquierdo (2009) y Cruz-Izquierdo et al. (2012) describieron acumulación de QTLs responsables de caracteres de arquitectura y rendimiento de las plantas en distintas regiones genómicas. En concreto, en el GL05 del cromosoma VI reportaron la colocalización de QTLs para número de óvulos y granos por vaina, caracteres muy correlacionados. Además, también se situaron en la misma región otros de caracteres no correlacionados como eran HSW, NF y NTP. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo validan éstos previos. Como ya hemos mencionado, los QTLs para NOP y NSP han sido estables en las condiciones dadas en la campaña 2012. Además, en la misma región se ha validado un QTL para peso en gramos de 100 semillas al resultar estable con los datos de 2007 y 2012 (Figura 2). Al mismo tiempo y en la misma región en la campaña 2012 se identificó, un QTL para longitud de vaina. Estos dos caracteres mostraron en nuestra evaluación una alta correlación entre sí ($r=0,92$). A su vez, ambos caracteres mostraron una moderada aunque significativa correlación con NSP y NOP ($r < 0,35$). En resumen queda clara la gran influencia que esta región tiene sobre los caracteres de rendimiento, queda por determinar si se trata de un único gen con influencia en todos los caracteres correlacionados o distintos genes muy cercanos responsables de los distintos caracteres. La mayor saturación de la región y la información obtenida de otras especies relacionadas puede ayudar, en primer lugar, a una determinación más eficiente de los distintos caracteres y en segundo a la determinación de genes candidatos responsables de los caracteres en estudio.

Similares reflexiones se pueden realizar para otras regiones del mapa. En el GL07 del cromosoma V, también se describió una acumulación de QTLs relacionados principalmente con caracteres de floración no evaluados en nuestro trabajo (Cruz-Izquierdo et al. 2012). También se detectaron en la misma posición QTLs para dos caracteres muy correlacionados entre sí como son HSW y PL (Figura 2). Nuestros resultados no han permitido validar estos QTLs, no obstante, en la misma región se ha identificado un QTL para HLF. Para este carácter no se había detectado ningún QTL en el cromosoma V que, además, no coincide en posición con el obtenido por Cruz-Izquierdo (2009) para HLP, carácter muy correlacionado con el anterior.

Aparte de estas regiones, en el GL01 asignado al cromosoma III, también se puede observar una región asociada a caracteres correlacionados entre sí que tienen que ver con la altura de la planta, como son la propia altura de la planta (PH), la altura de del primer nudo con flores (HLF) o del primer nudo con vaina (HLP) (Figura 2). Nuevamente,

una mayor saturación de la región o la información disponible en otras especies nos puede ayudar a discernir la existencia de un sólo gen relacionado con todos los caracteres considerados o la de varios situados muy próximos en el mapa de ligamiento. De hecho, en la especie modelo *M. truncatula* se han identificado genes candidatos relacionados con la altura de planta en el cromosoma I de la especie, que resulta ser homólogo del III de habas (Lagunes Espinoza et al. 2012). La introducción de estos genes en el mapa ayudaría a clarificar esta situación.

La acumulación de QTLs de caracteres de interés agronómico tales como el desarrollo de la planta o el rendimiento en regiones concretas del genoma ha sido descrita en distintas especies leguminosas como las modelo *M. truncatula* (Julier et al. 2007) o *Lotus japonicus* (Gondo et al. 2007) o los cultivos *Phaseolus vulgaris* (Koinage et al. 1996; Li et al. 2006) o *Pisum sativum* (Burstin et al. 2007; Weeden, 2007). En estos trabajos se ha sugerido que la colocalización de QTLs de caracteres correlacionados y de efectos acordes con el sentido de esa correlación podría apuntar al control de un gen con efectos pleiotropicos (Gondo et al. 2007, Julier et al. 2007). En guisante, donde la genética de muchos caracteres es bien conocida, se ha podido confirmar que la acumulación se debe en muchos casos a estos efectos pleiotrópicos de un mismo gen sobre varios caracteres (Burstin et al. 2007; Weeden, 2007). No obstante, siempre conviene contemplar la posibilidad de varios genes físicamente próximos como los responsables del control de los QTLs identificados en cada región.

3. Validación de QTLs en distintos fondos genéticos

3.1.- Alineación con otros mapas publicados

Como ya se ha dicho, la validación de QTLs en distintos fondos genéticos es importante para su uso en programas de mejora. Sin embargo, la ausencia de marcadores moleculares comunes en los distintos mapas de ligamiento ha dificultado el estudio comparativo de los resultados obtenidos hasta el momento en habas. De hecho, el primer trabajo sobre detección de QTLs para los caracteres que nos ocupan fue el publicado por Ramsey et al. en 1995. Sin embargo, la comparación de sus resultados con los obtenidos en sucesivos trabajos (Ávila et al. 2005; Cruz-Izquierdo, 2009) ha resultado imposible dada la inexistencia de marcadores comunes entre los mismos.

Del mismo modo, nuestro grupo había identificado QTLs para caracteres agronómicos en la población F_2 derivada del cruzamiento 29H x Vf136 (Ávila et al. 2005).

Sin embargo, la comparación de estos resultados con los obtenidos por Cruz-Izquierdo et al. (2012) resultaba muy complicada debido al bajo número de marcadores comunes. A pesar de todo se pudieron validar algunos QTLs.

El primer QTL relacionado con un carácter de rendimiento en habas que parecía mostrar estabilidad en distintos fondos genéticos fue publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). En su trabajo detectó un QTL para el carácter longitud de vaina (PL), estable en las dos campañas (PL-2-2007, PL-2-2008, Figura 3), en el cromosoma V de la especie, en una posición muy cercana al marcador isoenzimático *Prx-1*. Dicho marcador también estaba presente en el mapa utilizado por Ávila et al. (2005), dentro del intervalo de confianza de un QTL para longitud de vaina (pl-4, Figura 3), por lo que los autores sugirieron la posible conservación de este QTL en distintos fondos genéticos.

El número de marcadores comunes era muy limitado por lo que no se pudieron establecer muchas más relaciones. Recientemente, se ha publicado el mapa de ligamiento de la población RIL derivada de la F_2 utilizada por Ávila et al. (2005) (Gutiérrez et al. 2013). En este mapa se han incluido, además de marcadores RAPD y microsatélites comunes con la F_2 , marcadores ESTs comunes con mapas de otras poblaciones RIL de habas, entre ellas, la Vf6 x Vf27. En la Figura 3 se muestra el alineamiento entre los tres mapas de tal manera que se pueden relacionar los QTLs detectados en la población 29H x Vf136 (F_2), con los de la población RIL Vf6 x Vf27, utilizando el mapa RIL de 29H x Vf136 como puente.

Se mantiene la validación del QTL de longitud de vaina descrita por Cruz-Izquierdo et al. (2012) en el cromosoma V. Además, en la misma región, Ávila et al. (2005) detectaron un QTL para HLF cuya posición se mantiene en el mapa RIL Vf6 x Vf27. De hecho, en nuestro trabajo se ha identificado HLF-3-2012, cercano a *Prx-1* y también al marcador MCo048 (Pis_GEN_6_3_1) que en la población 29H x Vf136 ligó a marcadores RAPDs que, a su vez, están en el intervalo de confianza del Hlf-1 de la F_2 analizada (Figura 3).

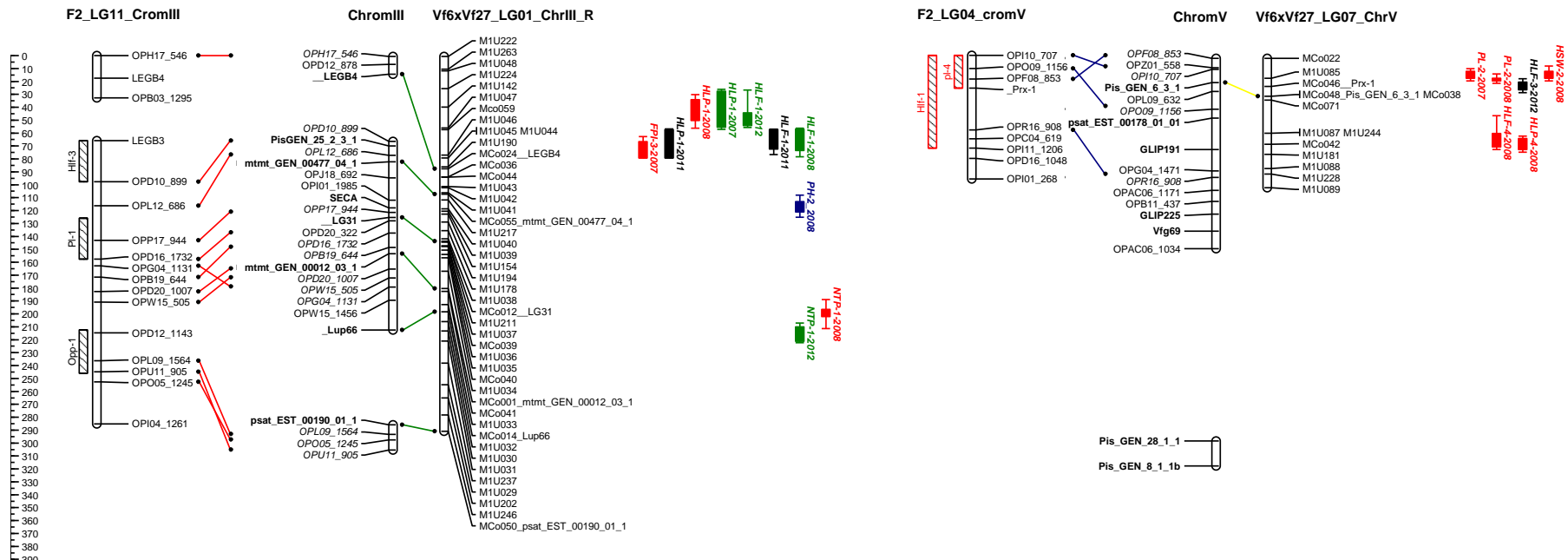


Figura 3 (Continuación): Análisis comparativo de QTLs para caracteres agronómicos en distintos fondos genéticos.

Para cada cromosoma se muestran 3 mapas. A la izquierda se muestra el mapa F_2 de la población 29H x Vf136 con los QTLs identificados por Ávila et al. (2005). En el centro aparece el mapa RIL de la población 29H x Vf136 utilizado por Gutiérrez et al. (2013). A la derecha aparece el mapa utilizado en la presente tesis con los QTLs descritos en la Figura 2. Las relaciones entre los distintos mapas se indican utilizando los marcadores comunes entre mapas adyacentes.

De la misma manera, en un grupo de ligamiento adscrito al cromosoma II del mapa RIL Vf6 × Vf27 se ha identificado un QTL para longitud de vaina, estable en dos de las campañas consideradas (PL-1-2007, PL-1-2008). En la F₂ se detectó otro QTL para el mismo carácter en un grupo de ligamiento asignado al mismo cromosoma a través del ligamiento de marcadores RAPDs comunes con el mapa RIL y ligados a ESTs físicamente ubicados en el citado cromosoma. Sin embargo, en la Figura 3 se puede observar que ambos QTLs parecen estar en posiciones diferentes del cromosoma y por tanto de momento debemos considerarlos como distintos.

En el cromosoma III sí hay indicios de la validación de un QTL para altura del primer nudo con flores (HLF). De hecho, en la población F₂ se detectó el QTL Hlf-3, con el marcador LEG B3 como flanqueante del intervalo de confianza (Figura 3). En la población RIL Vf6 × Vf27, este marcador se situó en una región muy cercana al QTL HLF-1 que resultó estable en tres de las campañas estudiadas (Figura 3). Esta zona ya la hemos discutido como una buena candidata para continuar estudiando este carácter y para el diseño de una estrategia de selección asistida por marcadores. La posible validación de la región en distintos fondos genéticos reforzaría esta conclusión.

Por último en el cromosoma I de ambos trabajos se han identificado QTLs para HLF, HLP y FPI, sin embargo, no se ha podido establecer relación entre ninguno de ellos con la comparación de mapas realizada (Figura 3).

En resumen, gracias al análisis comparativo realizado, se ha podido validar de forma preliminar en distintos fondos genéticos dos QTLs para HLF en los cromosomas III y V de *V. faba* y otro para PL, también en el cromosoma V. Estos datos habrá que tenerlos en cuenta en futuros trabajos ya que son importantes para la elección de regiones en las que continuar con el refinamiento de la posición de genes/QTLs relacionados con los caracteres y para el desarrollo de MAS con mayor probabilidad de éxito.

En el trabajo de Ávila et al. (2005) no se analizó el carácter de peso de grano; sin embargo, este carácter ha sido objeto de estudio en otros trabajos, en concreto en el publicado por Vaz Patto et al. (1999) y más recientemente por Khazaei et al. (2014). En el primero, se describe un QTL responsable de hasta un 30% de la variabilidad del carácter en el cromosoma VI de *V. faba*. Para ello emplearon el mapa de ligamiento y la evaluación de la población F₂ que dio origen a la RIL empleada en nuestro trabajo. Cruz-Izquierdo (2009) comparó su posición con la posición del QTL identificado en su trabajo en el mismo cromosoma. Dado que no se ha modificado el mapa y que el nuevo QTL

identificado, HSW-1-2012, valida otro previo (HSW-1-2007), las conclusiones son las mismas expuestas por Cruz-Izquierdo (2009), esto es, en principio se descarta la conservación de los QTLs en las distintas generaciones, situación que podría cambiar con la inclusión de nuevos marcadores para refinar las posiciones de los QTLs implicados.

En el caso del trabajo de Khazaei et al. (2014), los autores describen QTLs para peso de grano en los cromosomas II y IV de la especie. En la RIL Vf6 x Vf27 no se han detectado QTLs para este carácter en el cromosoma II, pero sí en el IV, por lo que es posible la validación de este QTL en fondos genéticos distintos. Uno de los marcadores flanqueantes del QTL descrito por Khazaei et al. (2014) fue el EST CNGC4, que en nuestro mapa recibe el nombre de M1U010. Este marcador se situó en el LG03 de nuestro mapa que a su vez fue asignado al cromosoma IV de la especie, en concreto en la posición a 81,3 cM desde el origen del grupo (Figura 2). En el mismo grupo se detectaron dos QTLs para HSW. El máximo de LOD de uno de ellos, HSW-4-2007, se situó a 50cM de este marcador y el límite inferior de su intervalo de confianza, lo hizo a 38 cM del mismo. Nuevamente, con estos datos no se puede descartar la validación del QTL en distintos fondos genéticos, pero tampoco confirmarla. La introducción de nuevos marcadores para saturar la región y refinar la posición del QTL podrá determinar la validación o no del citado QTL.

3.2.- Validación en el material desarrollado

En el transcurso de nuestro trabajo se ha desarrollado un material de gran utilidad para el estudio detallado de muchos de los caracteres agronómicos y de rendimiento de interés para los programas de mejora de habas. Partimos de poblaciones F_2 que fueron evaluadas para todos estos caracteres. Esta información podría ser utilizada para la validación preliminar de QTLs en distintos fondos genéticos. Al disponer de la evaluación fenotípica en F_2 e incluso, para algunos caracteres, en la generación F_3 , nos hacía falta información genotípica de las poblaciones para poder establecer la asociación entre genotipo y fenotipo. Para la realización de este apartado, se seleccionaron 4 de los cruzamientos evaluados en el capítulo I: Vf937xVf172, Vf937xVf751, Vf937xVf417 y Vf937xVf422. De esta manera conseguíamos que estuvieran representados todos los tipos botánicos de habas con los que hemos trabajado; además, la utilización del mismo parental femenino facilitaba la comparación de resultados.

Para la caracterización genotípica se seleccionaron marcadores ESTs utilizados en trabajos anteriores de nuestro grupo, incluyendo los marcadores cercanos a los QTLs identificados por Cruz-Izquierdo (2009) y en este trabajo, además de otros distribuidos a lo largo del genoma de habas y recogidos en el mapa consenso publicado por Satovic et al. (2013). El tipo de polimorfismo obtenido para cada marcador y en cada cruzamiento se recoge en el Anexo IV. En el Anexo III se puede ver la distribución de los marcadores seleccionados, así como los marcadores para los que se obtuvo polimorfismo en los distintos cruzamientos estudiados. Del total de 96 marcadores ESTs probados, se pudieron analizar 33 en la población Vf937 × Vf172, 31 en el cruzamiento Vf937 × Vf751 y 42 y 27 en las poblaciones Vf937 × Vf417 y Vf937 × Vf422, respectivamente.

Se ha obtenido polimorfismo para el 65% de los marcadores ensayados, sin embargo su distribución no ha sido del todo homogénea, quedando algunas regiones sin representación o con una representación muy limitada en el estudio. Entre estas regiones cabe destacar la zona central de LG04 y LG08 en el cromosoma I, las regiones distales del LG02, asignado al cromosoma II o la parte superior de los LG03 y LG05 ubicados, respectivamente, en los cromosomas IV y VI de la especie (Anexo III). A este hecho hay que sumar la distribución desigual según el cruzamiento que se considere. Todo ello ha imposibilitado el desarrollo de mapas de ligamiento que, aunque preliminares, hubieran permitido el análisis de QTLs. No obstante, con los datos obtenidos, se ha estudiado la asociación de cada marcador polimórfico con los datos fenotípicos de los cuatro cruzamientos seleccionados, mediante análisis de la varianza (ANOVA). La información obtenida aporta indicios acerca de la validación de regiones asociadas a la genética de algunos caracteres e incluso, sobre nuevas regiones que podrían estar relacionadas y que habría que corroborar en el futuro.

Los resultados detallados de los marcadores asociados significativamente a los distintos caracteres se han recopilado en las tablas de 8 a 18. Así mismo, para una mejor visualización de estos resultados, se han representado estas asociaciones de forma independiente para cada carácter junto con los QTLs descritos anteriormente en este capítulo (Figuras 4A a 4K). Es importante destacar que estos estudios constituyen una aproximación preliminar, pero útil para la planificación de futuros estudios. En determinados casos, como veremos, se intuyen nuevas regiones asociadas a algunos de los caracteres estudiados. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran la necesidad de nuevos trabajos de validación para poder utilizar esta información en el programa de mejora.

3.2.1.- Altura del primer nudo con flores (HLF) y del primer nudo con vainas (HLP)

Los resultados obtenidos en la población RIL Vf6 × Vf27 demostraban la idoneidad de una región del cromosoma III, asociada a ambos caracteres, para estudiar posibles candidatos en la zona y para el desarrollo de marcadores moleculares para la selección en los programas de mejora de habas. Los resultados obtenidos en las poblaciones F₂ parecen corroborar la importancia de esta zona en distintos fondos genéticos, sobre todo para HLF (Tablas 8A y 8B). Los 4 marcadores asociados a HLF en este cromosoma (1 en el cruzamiento Vf937×Vf172, 1 en el Vf937×Vf751 y dos en la población Vf937×Vf417) se encuentran situados en torno a los intervalos de confianza de los QTLs identificados en el cruzamiento Vf6×Vf27 (Figura 4A). Los intervalos abarcan desde los 212cM aproximadamente hasta los 265 cM mientras que los marcadores se situaron a 183,8, 211,9, 280,8 y 290,6, respectivamente, del origen del grupo de ligamiento (Figura 4A).

En el cromosoma V también se detectaron asociaciones significativas de marcadores cercanos al intervalo de confianza de uno de los QTLs para HLF. El intervalo de confianza de HLF-2012-3 se situó entre los 15,9 y los 26,6 cM mientras que el marcador asociado con el carácter en tres poblaciones se situó a 29,3 cM del origen del grupo de ligamiento (Figura 4A). En ese mismo intervalo se colocarían otros dos marcadores también asociados con el carácter, MCo067 y M2U307 (Tabla 8B; Figura 4A). Estos últimos ESTs no forman parte del mapa RIL Vf6 × Vf27 por lo que su posición aproximada en el mismo se ha determinado teniendo en cuenta el mapa compuesto (Satovic et al. 2013).

Tabla 8A. Marcadores asociados al carácter Altura de Primera Flor incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
M1U093	Lup52	Vf937xVf417	I	10,4 GL06		0,0391*
MCo027	Pis_GEN_7_1_2_1	Vf937xVf417	I	19,7 GL06	0,0264*	
MCo009	6DCS	Vf937xVf422	II	256		0,0012**
M1U071	Glip337	Vf937xVf422	II	268,7		0,0156*
M1U072	Lup123	Vf937xVf417	II	284,4	0,0069**	
MCo055	mtmt_GEN_00477_04_1	Vf937xVf172	III	183,8	0,0388*	0,0049**
M1U044	PTSS4a	Vf937xVf751	III	211,9	0,0178*	
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937xVf417	III	280,8	0,0068**	
M1U222	mt_914_02	Vf937xVf417	III	290,6		0,0116*
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	Vf937xVf751	IV	118	0,0333*	
M1U016	Lup210	Vf937xVf751	IV	134,3	0,0233*	
MCo011	mtmt_GEN_01951_11_1a	Vf937xVf417	IV	166,1		0,001**
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf751	IV	166,1	0,0253*	
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf422	V	29,3		0,0064**
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf417	V	29,3	0,0496*	0,0003***
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf751	V	29,3	0,0008***	
M1U223	mt_1121_09	Vf937xVf417	VI	117,6		0,0465*
M1U105	Lup142	Vf937xVf751	GL11	43	0,0232*	
M3U057	mtmt_GEN_00768_01_1	Vf937xVf172	S/A	no ligado	0,023*	

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento. S/A: Sin asignar.

³ Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6xVf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo.

Tabla 8B. Marcadores asociados al carácter Altura de Primera Flor no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
M2U345	PRCE	Vf937xVf422	I	145, 77		0,0187*
MCo066	mtmt_GEN_00022_02_1	Vf937xVf172	II	104,0*		0,021*
M2U307	Pis_GEN_9_3_1	Vf937xVf422	V	122,18		0,0383*
M2U307	Pis_GEN_9_3_1	Vf937xVf417	V	122,18	0,0022**	0,0072**
MCo067	mtmt_GEN_00866_02_1	Vf937xVf172	V	236,77		0,0382*
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937xVf417	GL12	10,75		0,0003***
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937xVf751	GL12	10,75		0,0302*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento

³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013). En el caso de MCo066, la posición se refiere al mapa de Gutiérrez et al. (2013).

Como veremos a lo largo de este apartado, los marcadores ubicados en esta región del cromosoma V muestran relación con gran parte de los caracteres evaluados. Este hecho indica la importancia de la zona y justifica un estudio en profundidad de la misma. Cruz-Izquierdo et al. (2012) ya destacaron la importancia de esta región en relación a caracteres de floración, reforzando aún más su importancia en la genética de los caracteres con los que estamos trabajando.

Aparte de las regiones mencionadas en los cromosomas III y V, cabría destacar sendas regiones en los cromosomas II y IV. En la Figura 4A se puede observar varios marcadores asociados con HLF que se sitúan relativamente cerca en el mapa de la población Vf6 × Vf27. Aunque para esas regiones, hasta el momento, no se han detectado QTLs para el carácter, son regiones que convendría tener en cuenta en futuros trabajos.

Hemos detectado menos marcadores asociados al carácter HLP (Tablas 9A, 9B), siendo muchos de ellos comunes a los indicados para HLF, como cabía esperar por la alta correlación entre ambos caracteres. No obstante no se puede sugerir la validación de QTLs en distintos fondos genéticos, ni la participación de nuevas regiones en la genética del carácter. Sí cabe destacar, como ya hemos mencionado, la relación, nuevamente, de marcadores del cromosoma V con el carácter (Tablas 9A, 9B; Figura 4B). Así, MCo048 y M2U307 resultaron asociados tanto a HLF como a HLP.

Tabla 9A. Marcadores asociados al carácter Altura de Primera Vaina incluidos en el mapa Vf6 × Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo027	Pis_GEN_7_1_2_1	Vf937×Vf417	I	19,7 GL06	0,0077**	
MCo009	6DCS	Vf937×Vf422	II	256		0,012*
M1U072	Lup123	Vf937×Vf417	II	284,4	0,011*	
MCo050	psat_EST_00190_01_1	Vf937×Vf172	III	0	0,04*	
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937×Vf417	III	280,8	0,0095**	
M1U004	PRAT	Vf937×Vf751	IV	34	0,0228*	0,0338*
MCo011	mtmt_GEN_01951_11_1a	Vf937×Vf417	IV	166,1		0,001**
M1U024	LG85	Vf937×Vf417	IV	174,9		0,0232*
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937×Vf417	V	29,3	0,0367*	
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937×Vf751	V	29,3	0,0191*	
M1U053	Lup280	Vf937×Vf417	VI	79,2		0,0286*
M1U223	mt_1121_09	Vf937×Vf417	VI	117,6	0,0491*	
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937×Vf417	GL12	10,75		0,0005***

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento.

³ Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6×Vf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo.

Tabla 9B. Marcadores asociados al carácter Altura de Primera Vaina no incluidos en el mapa Vf6 × Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
M2U345	PRCE	Vf937×Vf422	I	145,77		0,0174*
MCo028	Pis_GEN_23_5_6_1	Vf937×Vf417	II	233,03	0,0463*	
M2U307	Pis_GEN_9_3_1	Vf937×Vf417	V	122,18	0,0027**	
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937×Vf172	GL01	57,51		0,0329*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento.

³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013).

3.2.2.- Flores por inflorescencia (FPI)

Quizás por los buenos resultados obtenidos en el apartado anterior para FPI, en cuanto a estabilidad de QTLs en distintas campañas, esperábamos poder validar las mismas regiones del cromosoma I en distintos fondos genéticos. Sin embargo, los resultados no confirman los obtenidos tras el análisis de QTLs (Tablas 10A y 10B). En el caso del QTL detectado en el LG04 del mapa Vf6 × Vf27, no se podía confirmar la validación ya que pese a haberse probado marcadores en el entorno de los intervalos de confianza obtenidos en las 4 campañas evaluadas, ninguno resultó polimórfico en las poblaciones evaluadas (Figura 4C). No ocurre lo mismo para el QTL detectado en el LG06 ya que de los 4 marcadores seleccionados en el entorno de los intervalos de confianza calculados, tres fueron polimórficos y se genotiparon en distintas poblaciones sin que se hallara relación con el carácter en el ANOVA.

El marcador M1U044 se sitúa en el LG01 del mapa Vf6 × Vf27 y mostró asociación significativa con el carácter en la población Vf937 × Vf417 (Tabla 10A). Este marcador es flanqueante del QTL FPI-3-2007, lo que sugiere la validación de la región. Desafortunadamente, esta zona está poco representada en el estudio porque hay pocos marcadores polimórficos en las 4 poblaciones (Figura 4C; Anexo IV). Por este motivo, el hecho de que los tres marcadores polimórficos en la región cercana al QTL tengan, en alguna medida, asociación con el carácter, indican que esta zona debería ser considerada en futuros estudios.

Tabla 10A. Marcadores asociados al carácter Flores por Inflorescencia incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo051	mtmt_GEN_00447_04 2	Vf937xVf42 2	I	39,3 GL04	0,0484*	0,0277*
MCo025	Pis_GEN_20_1_1 1	Vf937xVf75 1	II	242,8		0,0443*
MCo050	psat_EST_00190_01_	Vf937xVf41	III	0	0,0310*	
MCo055	mtmt_GEN_00477_04 1	Vf937xVf41 7	III	183,8	0,0363*	
M1U044	PTSS4a	Vf937xVf41 7	III	211,9		0,0205*
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a 2	Vf937xVf17 2	III	280,8	0,0202*	
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf42 2	IV	166,1		0,0251*
M1U004	PRAT	Vf937xVf75 1	IV	34	0,0195*	
MCo053	mt_861_03 1	Vf937xVf75 1	IV	232	0,0198*	
MCo042	UNK28	Vf937xVf41 7	V	66,6	0,0140*	
MCo054	GLIP265	Vf937xVf41 7	VI	120,5	0,0132*	
M1U105	Lup172	Vf937xVf41 7	GL11	43	0,0376*	
M3U057	mtmt_GEN_00768_01 1	Vf937xVf17 2	S/A	No ligado	0,0496*	

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento. S/A: Sin asignar

³ Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6xVf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo.

Tabla 10B. Marcadores asociados al carácter Flores por Inflorescencia no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo028	Pis_GEN_23_5_6_1	Vf937xVf417	II	233,03	0,0176*	
M3U007	mtca_EST_00216_01_1	Vf937xVf172	GL03	x	0,0044**	
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937xVf417	GL01	57,51		0,0067**
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937xVf422	GL01	57,51	0,0231*	

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento. S/A: Sin asignar

³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013).

3.2.3.- Número de ramas (NTP)

Se habían detectado 4 QTLs para este carácter en la población Vf6 × Vf27 pero sólo uno, situado en el cromosoma III, había sido validado en dos campañas, lo que indica que este carácter es muy dependiente del ambiente. En el presente apartado no se han obtenido resultados robustos que permitan sugerir la validación de las regiones ya detectadas (Tablas 11A y 11B). Se han obtenido marcadores asociados pero dispersos en casi todos los grupos de ligamiento asignados a cromosomas del mapa de referencia considerado. Algunos de ellos se localizan muy cercanos a intervalos de confianza de QTLs ya detectados. Como ejemplo, los marcadores M1U019 y M1U022 que se situarían en el LG03 asignado al cromosoma IV, muy próximos al QTL NTP-2-2007 o MCo001, cercano a NTP-1-2008 y NTP-1-2012 (Figura 4D). Sin embargo, en esta última región hay muchos más marcadores polimórficos que no presentaron asociación con el carácter (Figura 4D) por lo que la asociación de MCo001 al número de ramas no se ha considerado para la validación de la zona.

En el cromosoma V, se identificaron dos marcadores asociados a NTP en la población Vf937 × Vf751, uno en cada generación tenida en cuenta. Nuevamente el marcador MCo048 resultó asociado con el carácter en estudio. En este caso, no se había detectado ninguna región asociada al carácter en el cromosoma V.

Tabla 11A. Marcadores asociados al carácter Número de Ramas incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo034	psat_EST_00180_01_2	Vf937xVf172	I	10,2 GL04		0,0307*
M1U093	Lup52	Vf937xVf417	I	10,4 GL06	0,0213*	
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_3	Vf937xVf422	I	39,3 GL04	0,014*	
M1U029	ATCP	Vf937xVf417	III	36,2		0,0271*
MCo001	mtmt_GEN_00012_03_1	Vf937xVf417	III	110,7	0,0087**	
MCo055	mtmt_GEN_00477_04_1	Vf937xVf417	III	183,8	0,0007***	
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937xVf172	III	280,8	0,0051**	
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	Vf937xVf417	IV	118	0,0054**	
M1U019	FIS1	Vf937xVf172	IV	155,2		0,0421*
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf417	IV	166,1	0,0231*	
MCo053	mt_861_03	Vf937xVf422	IV	232	0,007**	
M1U085	GLIP099	Vf937xVf751	V	15,4	0,0343*	
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf751	V	29,3		0,0042**
MCo054	GLIP265	Vf937xVf417	VI	120,5		0,0179*
MCo035	psmt_EST_00196_01_1	Vf937xVf422	GL14	10,9	0,0132*	
M3U057	mtmt_GEN_00768_01_1	Vf937xVf751	S/A	no ligado		0,0296*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento. S/A: Sin asignar.

³ Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6xVf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo.

Tabla 11B. Marcadores asociados al carácter Número de Ramas no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	Vf937xVf417	I	1033	0,0225*	
M2U345	PRCE	Vf937xVf422	I	145,77		0,0215*
M2U306	Pis_GEN_58_3_4_1	Vf937xVf751	II	347,27	0,0154*	0,0267*
M3U006	psat_EST_000161_01_1	Vf937xVf417	II	93,96	0,0155*	
M3U059	SECA	Vf937xVf417	III	294,93	0,0019**	
M3U058	mtmt_GEN_01149_03_1	Vf937xVf172	GL12	18,75	0,0495*	
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937xVf417	GL01	57,51		0,0337*
M3U007	mtca_EST_00216_01_1	Vf937xVf172	GL03	x	0,0379*	
M3U007	mtca_EST_00216_01_1	Vf937xVf751	GL03	x		0,0037**

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento.

³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013).

3.2.4.- Longitud de vaina (PL)

Tres de los cruzamientos tenidos en cuenta en este apartado (Vf937 × Vf172, Vf937 × Vf751 y Vf937 × Vf417) ya fueron indicados como los más adecuados para el estudio de este carácter (Capítulo I), dada la gran variabilidad encontrada en las generaciones F_2 y $F_{2:3}$. Al estudiar la asociación de marcadores polimórficos en estas poblaciones con PL, se detectaron marcadores ubicados en el entorno e incluso dentro de los intervalos de confianza de los 5 QTLs descritos hasta el momento (Figura 4E; Tablas 12A y 12B). Por ejemplo se detectaron asociación significativa de 3 marcadores en el entorno de PL-2 en el cromosoma V. PL-2 había sido validado en 2 campañas en el mapa Vf6 × Vf27 (PL-2-2007, PL-2-2008).

En el cromosoma II, Cruz-Izquierdo (2009) había validado el QTL PL-1 en distintas campañas (Figura 2). En nuestro trabajo, pese al bajo número de marcadores polimórficos en esta zona se detectó asociación significativa de los dos más próximos a la región del QTL (Figura 4E; Tablas 12A). En la población Vf937 × Vf172, esta asociación fue para los dos marcadores y en las dos generaciones evaluadas. En el mismo sentido, los dos marcadores polimórficos en el cruzamiento Vf937 × Vf751 y flanqueantes del QTL PL-5-2012 en el mapa Vf6 × Vf27 (cromosoma VI) mostraron asociación con este carácter.

El marcador polimórfico en el entorno de PL-4-2007 en el cromosoma IV (Figura 4E) también mostró asociación con el carácter en las dos generaciones evaluadas del cruzamiento Vf937 × Vf422. Por último, en el cromosoma I (LG04), el marcador MCo051 resultó asociado a PL en el mismo cruzamiento (Figura 4E; Tabla12A). Este marcador está incluido en el intervalo de confianza de PL-3-2007. MCo051 también fue polimórfico en el resto de cruzamientos, pero en esos casos no se observó asociación con el carácter.

En resumen, hemos encontrado marcadores asociados al carácter longitud de vaina en todas las regiones detectadas con anterioridad en los trabajos de Cruz-Izquierdo (2009) y de la presente tesis. Este hecho sugiere fuertemente la confirmación de las regiones ya descritas y apoya un estudio más detallado de las mismas en futuros trabajos.

Tabla 12A. Marcadores asociados al carácter Longitud de Vaina incluidos en el mapa Vf6 × Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo034	psat_EST_00180_01_2	Vf937×Vf172	I	10,2 GL04	0,0028**	
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_ 3	Vf937×Vf422	I	39,3 GL04		0,0206*
M1U093	Lup52	Vf937×Vf417	I	10,4 GL06		0,006**
MCo025	Pis_GEN_20_1_1	Vf937×Vf417	II	242,8	0,0408*	
MCo033	mtmt_GEN_00103_01_ 1	Vf937×Vf422	II	270,3		0,0495*
M1U072	Lup123	Vf937×Vf172	II	284,4	0,0096**	0,0087**
MCo030	Pis_GEN_57_1_2_1	Vf937×Vf751	II	388,9		0,0184*
MCo030	Pis_GEN_57_1_2_1	Vf937×Vf172	II	388,9	0,0003***	0,0003***
MCo050	psat_EST_00190_01_1	Vf937×Vf172	III	0		0,0438*
M1U029	ATCP	Vf937×Vf417	III	36,2		0,0073**
M1U030	LSSR9b	Vf937×Vf422	III	77,7		0,0117*
M1U004	PRAT	Vf937×Vf422	IV	34	0,0122*	0,0036**
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	Vf937×Vf417	IV	118		0,0008***
M1U022	Ms_U182	Vf937×Vf422	IV	166,1		0,0151*
M1U022	Ms_U182	Vf937×Vf417	IV	166,1		0,0253*
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937×Vf422	V	29,3		0,0378*
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937×Vf751	V	29,3	0,0038**	
MCo013	LG068	Vf937×Vf417	VI	21,9	0,0404*	
MCo060	HBP2	Vf937×Vf751	VI	115,1	0,0324*	
M1U223	mt_1121_09	Vf937×Vf751	VI	117,6	0,0026**	
M1U105	Lup172	Vf937×Vf751	GL11	43	0,0384*	

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)² GL: Grupo de ligamiento³ Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6×Vf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo.

Tabla 12B.- Marcadores asociados al carácter longitud de vaina no incluidos en el mapa Vf6 × Vf27

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
M2U345	PRCE	Vf937xVf422	I	145,77		0,0416*
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	Vf937xVf417	I	1033	0,0005***	
M3U002	Pis_GEN_21_1_1	Vf937xVf172	II	122,49	0,0490	
MCo028	Pis_GEN_23_5_6_1	Vf937xVf417	II	233,03		0,0101*
MCo066	mtmt_GEN_00022_02_1	Vf937xVf172	II	104,0*		0,0165*
M2U307	Pis_GEN_9_3_1	Vf937xVf417	V	122,18	0,0344*	
MCo067	mtmt_GEN_00866_02_1	Vf937xVf172	V	236,77	0,0318*	
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937xVf422	LG01	57,51		0,0434*
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937xVf417	LG01	57,51		0,0300
M3U058	mtmt_GEN_01149_03_1	Vf937xVf172	LG12	18,75		0,0371*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento.

³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013). En el caso MCo066, la posición se refiere al mapa Gutiérrez et al. (2013)

3.2.5.- Número de óvulos por vaina (NOP) y número de granos por vaina (NSP)

Teniendo en cuenta la alta correlación existente entre ambos caracteres, haremos su análisis de forma conjunta. Los resultados de ANOVA se detallan en las Tablas 13A y 13B para NOP y en las Tablas 14A y 14B para NSP, mientras que la representación gráfica de estos resultados se muestra en las Figuras 4F y 4G para NOP y NSP, respectivamente. Los resultados parecen confirmar la importancia de las regiones del cromosoma I y del cromosoma VI donde se localizaron QTLs para estos caracteres en la población Vf6 × Vf27. De hecho, Cruz-Izquierdo (2009) identificó 2 QTLs para NSP en el grupo de ligamiento 4 asignado al cromosoma I (Figura 2; Figura 4G), aunque sólo MCo034 mostró asociación con este carácter (Tabla 14A). Los resultados de ANOVA para NOP podrían indicar la importancia de esta zona pues 4 marcadores estuvieron relacionados con la variación del número de óvulos por vaina en la población Vf937 × Vf172 (Tabla 13A, Figura 4F).

Por otra parte, en el cromosoma VI se observó asociación del marcador M1U053 con NOP en la población Vf937 × Vf422, mientras que para NSP se vio asociación con los marcadores MCo060 y M1U223 en el cruzamiento Vf937 × Vf751. En el mapa Vf6 × Vf27, los marcadores citados se situaron en las proximidades de los intervalos de confianza calculados para los QTLs detectados para estos caracteres, sugiriendo la validación de la

región. No obstante, el número de marcadores polimórficos en la región ha sido muy limitado (Anexo IV), lo que ha podido disminuir la consistencia de los resultados.

Cabe destacar una región del cromosoma IV, situada entre los 155,2 y los 166,1 cM, que parece estar relacionada con el control genético de ambos caracteres (Tablas 13A, 14A; Figuras 4F, 4G). En efecto, los marcadores MCo011 y M1U022 que mapean en el mismo sitio y que han sido polimórficos en distintas poblaciones, muestran relación con NOP y con NSP en 2 cruzamientos (Vf937 × Vf417 y Vf937 × Vf751), confirmando la asociación de la región en distintos fondos genéticos. Hasta el momento no se habían detectados QTLs para estos caracteres en el cromosoma IV; nuestros resultados pueden justificar la introducción de esta región en futuros estudios sobre los mismos.

Tabla 13A. - Marcadores asociados al carácter Número de Óvulos por Vaina incluidos en el mapa Vf6 × Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma	Posición cM ²	F ₂	F _{2:3}
MCo034	psat_EST_00180_01_2	Vf937×Vf172	I	10,2 GL04	0,0243*	
MCo058	BGAL	Vf937×Vf172	I	18,7 GL04		0,0248*
M1U079	ASNEP	Vf937×Vf172	I	23,3 GL04		0,0129*
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_3	Vf937×Vf172	I	39,3 GL04	0,0438*	
M1U072	Lup123	Vf937×Vf172	II	284,4		0,0182*
MCo050	psat_EST_00190_01_1	Vf937×Vf417	III	0	0,023*	0,0014**
M1U004	PRAT	Vf937×Vf422	IV	34		0,0166*
M1U004	PRAT	Vf937×Vf417	IV	34	0,024*	
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	Vf937×Vf417	IV	118		0,0009***
M1U019	FIS1	Vf937×Vf422	IV	155,2	0,0257*	
MCo011	mtmt_GEN_01951_11_1a	Vf937×Vf417	IV	166,1	0,0309*	0,0358*
M1U022	Ms_U182	Vf937×Vf751	IV	166,1		0,0213*
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937×Vf172	V	29,3		0,0009***
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937×Vf751	V	29,3	0,0406*	
M1U053	Lup280	Vf937×Vf422	VI	79,2		0,0221*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6×Vf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo (GL).

Tabla 13B. Marcadores asociados al carácter Número de Óvulos por Vaina no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	Vf937xVf417	I	1033	0,0468*	
M3U006	psat_EST_000161_01_1	Vf937xVf417	II	93,96	0,0019**	
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937xVf417	GL12	10,75		0,0093**
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937xVf751	GL12	10,75	0,0288*	

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)
² GL: Grupo de ligamiento.
³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013).

Tabla 14A. - Marcadores asociados al carácter Número de Semillas por Vaina incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma	Posición cM ²	F ₂	F _{2:3}
MCo034	psat_EST_00180_01_2	Vf937xVf172	I	10,2 GL04	0,0046**	
MCo002	mtmt_GEN_00036_02_1/a	Vf937xVf751	I	65,1 GL06		0,0062**
M1U072	Lup123	Vf937xVf417	II	284,4	0,0249*	
MCo050	psat_EST_00190_01_1	Vf937xVf417	III	0		0,0009***
MCo055	mtmt_GEN_00477_04_1	Vf937xVf417	III	183,8		0,021*
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937xVf422	III	280,8		0,0306*
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937xVf417	III	280,8		0,0425*
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937xVf751	III	280,8		0,0268*
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf417	IV	166,1	0,0195*	
MCo011	mtmt_GEN_01951_11_1a	Vf937xVf751	IV	166,1		0,0431*
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf172	V	29,3		0,0048**
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf751	V	29,3	0,0058**	
MCo013	LG068	Vf937xVf417	VI	21,9	0,0202*	
MCo060	HBP2	Vf937xVf751	VI	115,1	0,0074**	
M1U223	mt_1121_09	Vf937xVf751	VI	117,6	0,0173*	

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)
² Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6xVf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012).

Tabla 14B. Marcadores asociados al carácter Número de Semillas por Vaina no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27

Marcador	Otro nombre ¹	Poblaciones	Cromosoma ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
M2U307	Pis_GEN_9_3_1	Vf937xVf422	V	122,18		0,0254*
MCo067	mtmt_GEN_00866_02_1	Vf937xVf172	V	236,77		0,0151*
M3U007	mtca_EST_00216_01_1	Vf937xVf751	GL03	x		0,0486*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)
² GL: Grupo de ligamiento.
³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013).

3.2.6.- Peso de 100 semillas (HSW)

El peso de 100 semillas (HSW) es uno de los principales componentes del rendimiento, por lo que la validación de QTLs en distintos fondos genéticos resulta crucial para su posible uso en mejora. El único QTL validado en diferentes campañas en la población Vf6 x Vf27 se situó en el cromosoma VI. Sin embargo, estos resultados no han podido ser validados en otros fondos genéticos (Tablas 15A, 15B; Figura 4H). La región más importante en cuanto al control de este carácter en distintos fondos genéticos se situó en la parte proximal del cromosoma III de la especie, como se observa por la acumulación de marcadores relacionados con el carácter en distintas poblaciones (Figura 4H). En esta región no se habían identificado QTLs para HSW, ni para otros componentes de rendimiento. Sin embargo, sí se han encontrado algunos marcadores relacionados con la longitud de vaina (PL) (Figura 4E), por lo que habría que tener en cuenta esta región en futuros estudios.

El resto de marcadores asociados con el carácter mostraron una dispersión a lo largo del mapa de ligamiento. Como casos relevantes cabe destacar, en el cromosoma V, la asociación de los marcadores M1U085 y MCo048 (Tabla 15A; Figura 4H) y MCo067 (Tabla 15B; Figura 4H), ya que en esta región fue localizado un QTL para peso de 100 semillas (HSW-2-2008) y otro para longitud de vaina (PL-2-2007; PL-2-2008; Figura 2; Figura 4E).

Tabla 15A. Marcadores asociados al carácter Peso de 100 Semillas incluidos en el mapa Vf6 × Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma	Posición cM ²	F ₂	F _{2:3}
M1U093	Lup52	Vf937×Vf417	I	10,4 GL06		0,0358*
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_3	Vf937×Vf422	I	39,3 GL04		0,0359*
MCo025	Pis_GEN_20_1_1	Vf937×Vf422	II	242,8	0,0275*	
M1U072	Lup123	Vf937×Vf172	II	284,4	0,001**	0,018*
MCo030	Pis_GEN_57_1_2_1	Vf937×Vf172	II	388,9	0,0227*	0,0357*
MCo030	Pis_GEN_57_1_2_1	Vf937×Vf751	II	388,9	0,0167*	
MCo050	psat_EST_00190_01_1	Vf937×Vf172	III	0		0,0069**
M1U029	ATCP	Vf937×Vf417	III	36,2	0,0036**	
M1U029	ATCP	Vf937×Vf751	III	36,2	0,0275*	
M1U031	Lup185	Vf937×Vf417	III	69,9	0,0364*	
MCo001	mtmt_GEN_00012_03_1	Vf937×Vf172	III	110,7	0,0015**	
MCo001	mtmt_GEN_00012_03_1	Vf937×Vf417	III	110,7	0,0166*	
M1U222	mt_914_02	Vf937×Vf172	III	290,6		0,0429*
M1U004	PRAT	Vf937×Vf422	IV	34		0,0066**
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	Vf937×Vf417	IV	118	0,0044**	0,0094**
M1U022	Ms_U182	Vf937×Vf422	IV	166,1	0,0094**	
MCo011	mtmt_GEN_01951_11_1a	Vf937×Vf751	IV	166,1		0,0261*
M1U227	1947_02	Vf937×Vf751	IV	222,9		0,0071**
M1U085	GLIP099	Vf937×Vf751	V	15,4	0,0372*	
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937×Vf751	V	29,3	0,0022**	

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6×Vf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo (GL).

Tabla 15B.- Marcadores asociados al carácter Peso de 100 semillas no incluidos en el mapa Vf6 × Vf27

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	Vf937×Vf417	I	1033	0,0215*	
M3U059	SECA	Vf937×Vf172	III	294,93	0,03*	
MCo067	mtmt_GEN_00866_02_1	Vf937×Vf172	V	236,77	0,0153*	
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937×Vf417	GL12	10,75	0,0071**	
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937×Vf751	GL12	10,75		0,006**
M3U058	mtmt_GEN_01149_03_1	Vf937×Vf172	GL12	18,75		0,0304*
MCo066	mtmt_GEN_00022_02_1	Vf937×Vf172	GL11	19,77		0,0112*
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937×Vf172	GL01	57,51	0,0428*	
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	Vf937×Vf417	GL01	57,51		0,0458*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento.

³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013).

3.2.7.- Vainas por planta (PPP), granos totales por planta (SPP) y rendimiento (YIELD)

Como ya se describió en el apartado correspondiente, nuestros resultados no han permitido validar el único QTL para PPP descrito por Cruz-Izquierdo (2009), ubicado en su trabajo en el cromosoma VI de la especie. Tampoco se llevaron a cabo análisis de QTLs para SPP o rendimiento, pero sí se han considerado en este apartado por su importancia.

Aunque la discusión de estos caracteres va a ser conjunta, los resultados se presentan de forma independiente para cada uno de ellos para facilitar su visualización: PPP (Tablas 16A, 16B, Figura 4I); SSP (Tablas 17A, 17B, Figura 4J); Rendimiento (Tablas 18A, 18B, Figura 4K).

Tanto para SPP como para rendimiento, el número de marcadores asociados fue bajo y su ubicación muy dispersa en el mapa genético, si bien la mayoría de los marcadores que resultaron significativos para este carácter también lo fueron para diferentes componentes del rendimiento. Estos resultados sugieren que resultaría más conveniente realizar la selección para rendimiento considerando sus componentes, como PL, HSW etc., ya que al ser caracteres más estables la determinación de los QTLs es más fiable. De hecho, los componentes del rendimiento son muy importantes en la selección de los programas de mejora, sobre todo en las fases iniciales que no permiten la selección por rendimiento.

En cuanto al número de vainas por planta, este carácter está también muy influenciado por el ambiente, como se pone de manifiesto por la falta de validación del único QTL identificado para este carácter por Cruz-Izquierdo (2009). Sin embargo, sí resulta de interés la relación inversa que se aprecia en algunos casos entre HSW y PPP. De hecho, hay marcadores asociados a ambos caracteres como M1U029, M1U031 y MCo001 (cromosoma III) o MCo026 (cromosoma IV) (Figuras 4H, 4I) en la población Vf937 x Vf417. Sin embargo, en todos estos casos, cuando el alelo materno incrementa el HSW, es el alelo paterno el que incrementa el PPP y viceversa, como se puede apreciar por el sentido opuesto de las flechas mostradas en las figuras 4H y 4I. Esto significa que una selección para incrementar el peso de 100 semillas utilizando estos marcadores podría llevar aparejada una disminución en el número de vainas por planta y viceversa, algo que todos los mejoradores saben por experiencia, justificada así por nuestros resultados. Estos datos concuerdan con los datos obtenidos en la campaña

2012 para la población Vf6 x Vf27, donde se encontró una correlación negativa (-0,31) para ambos caracteres (Tabla 6).

Tabla 16A: Marcadores asociados al carácter Número de vainas por planta incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
MCo058	BGAL	Vf937xVf422	I	18,7 GL04		0,0144*
MCo058	BGAL	Vf937xVf172	I	18,7 GL04		0,0181*
M1U079	ASNEP	Vf937xVf172	I	23,3 GL04		0,0023**
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_3	Vf937xVf417	I	39,3 GL04	0,0185*	0,0485*
MCo025	Pis_GEN_20_1_1	Vf937xVf417	II	242,8	0,0276*	
M1U071	Glip337	Vf937xVf422	II	268,7	0,0153*	
MCo050	psat_EST_00190_01_1	Vf937xVf172	III	0		0,0041**
M1U029	ATCP	Vf937xVf417	III	36,2	0,0485*	
M1U031	Lup185	Vf937xVf417	III	69,9		0,035*
MCo001	mtmt_GEN_00012_03_1	Vf937xVf417	III	110,7	0,0499*	
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937xVf172	III	280,8	0,0428*	
M1U263	Pis_GEN_8_1_1a	Vf937xVf417	III	280,8	0,0337*	
M1U004	PRAT	Vf937xVf751	IV	34	0,0285*	0,0496*
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	Vf937xVf417	IV	118	0,0038**	
M1U019	FIS1	Vf937xVf417	IV	155,2		0,0038**
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf172	IV	166,1		0,0025**
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf417	IV	166,1	0,0217*	
M1U085	GLIP099	Vf937xVf751	V	15,4	0,0128*	
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf172	V	29,3	0,0276*	
MCo042	UNK28	Vf937xVf417	V	66,6		0,0175*
MCo060	HBP2	Vf937xVf422	VI	115,1	0,0208*	
M1U105	Lup172	Vf937xVf417	GL11	43		0,044*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento.

³ Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6xVf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo (GL).

Tabla 16B: Marcadores asociados al carácter Número de vainas por planta no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/ GL ²	Posición cM ³	F ₂	F _{2:3}
M3U006	psat_EST_000161_01_1	Vf937xVf417	II	93,96	0,0017**	
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937xVf417	GL12	10,75	0,0063**	0,0128*
M3U058	mtmt_GEN_01149_03_1	Vf937xVf172	GL12	18,75	0,0071**	0,0368*
MCo066	mtmt_GEN_00022_02_1	Vf937xVf172	GL11	19,77	0,0227*	0,005**

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento

³ Ubicación del marcador en el mapa consenso de la especie publicado por Satovic et al. (2013).

Tabla 17A. Marcadores asociados al carácter Granos Totales incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma	Posición cM ²	F ₂
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_3	Vf937xVf417	I	39,3 GL04	0,0370*
M1U071	Glip337	Vf937xVf422	II	268,7	0,0167*
MCo025	Pis_GEN_20_1_1	Vf937xVf751	II	242,8	0,0404*
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	Vf937xVf417	IV	118	0,0335*
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf417	IV	166,1	0,0070**
MCo053	mt_861_03	Vf937xVf422	IV	232	0,0051**
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf172	V	29,3	0,0020**
M1U053	Lup280	Vf937xVf422	VI	79,2	0,0264*
MCo060	HBP2	Vf937xVf422	VI	115,1	0,0120*
M1U223	mt_1121_09	Vf937xVf422	VI	117,6	0,0341*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6xVf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo (GL).

Tabla 17B: Marcadores asociados al carácter Granos Totales no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/GL ²	Posición cM ³	F ₂
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	Vf937xVf172	I	1033	0,0168*
M3U006	psat_EST_000161_01_1	Vf937xVf417	II	93,96	0,0054**
MCo066	mtmt_GEN_00022_02_1	Vf937xVf172	II	104,0*	0,0155*
M3U009	psat_EST_00191_01_1	Vf937xVf417	GL12	10,75	0,0358*
M3U058	mtmt_GEN_01149_03_1	Vf937xVf172	GL12	18,75	0,0016**

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² GL: Grupo de ligamiento

³ Ubicación del marcador en el mapa compuesto de *V. faba* publicado por Satovic et al. (2013). En el caso de MCo066, la posición se refiere al mapa de Gutiérrez et al. (2013)

Tabla 18A. Marcadores asociados al carácter Rendimiento incluidos en el mapa Vf6 x Vf27.

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma	Posición cM ²	F ₂
M1U079	ASNEP	Vf937xVf172	I	23,3 GL04	0,0226*
M1U071	Glip337	Vf937xVf422	II	268,7	0,0109*
M1U022	Ms_U182	Vf937xVf417	IV	166,1	0,0299*
MCo053	mt_861_03	Vf937xVf422	IV	232	0,0418*
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	Vf937xVf172	V	29,3	0,0030**
MCo060	HBP2	Vf937xVf422	VI	115,1	0,0235*

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)

² Ubicación del marcador en el mapa de la población RIL Vf6 x Vf27 publicado por Cruz-Izquierdo et al. (2012). Cuando en el cromosoma se ubicaron físicamente más de un grupo de ligamiento, aquel al que pertenecía el marcador asociado se indicó junto con la posición del mismo.

Tabla 18B. Marcadores asociados al carácter Rendimiento no incluidos en el mapa Vf6 x Vf27

Marcador	Otro nombre ¹	Población	Cromosoma/GL ²	Posición cM ³	F ₂
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	Vf937xVf172	I	1033	0,0065**
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	Vf937xVf417	I	1033	0,0421*
M3U006	psat_EST_000161_01 _1	Vf937xVf417	II	93,96	0,0399*
MCo066	mtmt_GEN_00022_02 _1	Vf937xVf172	II	104,0*	0,0358*
M3U058	mtmt_GEN_01149_03 _1	Vf937xVf172	GL12	18,75	0,0083**

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013)
² GL: Grupo de ligamiento
³ Ubicación del marcador en el mapa compuesto de *V. faba* publicado por Satovic et al. (2013). En el caso de MCo066, la posición se refiere al mapa de Gutierrez et al. (2013)

3.3. Consideraciones finales sobre la validación en distintos fondos genéticos

En este último apartado hemos dado otro paso hacia el desarrollo eficiente de herramientas moleculares que nos faciliten la selección dentro de los programas de mejora. Para ello hemos intentado validar los QTLs ya detectados para los caracteres en estudio en distintos fondos genéticos. Con ello conseguiríamos que los marcadores que obtuviéramos sirvieran para un mayor número de materiales, distintos de los utilizados para su desarrollo.

En primer lugar, la mera comparación de los resultados publicados en la bibliografía nos ha permitido sugerir la validación de QTLs para longitud de vaina en el cromosoma V y para altura de primera flor en el III y en el V. Para ello ha sido necesaria la existencia de marcadores comunes en los distintos mapas empleados en los distintos estudios. La posibilidad de este tipo de aproximaciones va a ser cada vez más frecuente ya que en la actualidad se están desarrollando nuevos mapas de habas y la tendencia general es la aplicación de marcadores derivados de genes secuenciados en la especie *M. truncatula* u otras especies de leguminosas (Satovic et al. 2013; Webb et al. 2015) facilitando la coincidencia de marcadores y por lo tanto los trabajos de comparación.

En segundo lugar, hemos usado parte del material desarrollado en el Capítulo 1 para validar los QTLs detectados en la población Vf6 x Vf27. Para ello se han genotipado cuatro poblaciones con marcadores cercanos a los mismos o incluso en otras regiones del mapa RIL de referencia. Aunque los resultados obtenidos son preliminares, el estudio de asociación entre estos y el fenotipo de los individuos sugiere la conservación de algunas regiones en el control de varios caracteres e incluso en algunos casos se llega a

intuir nuevas regiones no descritas hasta el momento. La información generada será valiosa a la hora de acometer futuros trabajos sobre el control genético y las bases moleculares de cada uno de los caracteres considerados, ya que unida a la obtenida en otras especies y en especial a la modelo *M. truncatula* nos puede ayudar a diseñar las estrategias que nos lleven de una manera eficiente a la obtención de marcadores en mejora y a la identificación de genes candidatos responsables de cada carácter.

Si consideramos en su conjunto todos los resultados obtenidos, llama la atención una región del cromosoma V por su asociación con distintos caracteres. En concreto, el marcador MCo048 (Pis_GEN_6_3_1) ha resultado asociado significativamente a la mayoría de los caracteres estudiados en nuestro trabajo (HLF, HLP, NTP, PL, NOP, NSP, HSW, PPP, SPP Y YIELD). En general, la región parece ser importante para gran parte de ellos. Tales resultados refuerzan los obtenidos por Cruz-Izquierdo et al. (2012) y justifican un estudio en profundidad de la región en futuros estudios.

Apoyando esta hipótesis, Julier et al. 2007 describieron un gran QTL para el carácter fecha de floración en el cromosoma VII de *M. truncatula* y junto a él, otro más pequeño para crecimiento del tallo. Estos dos caracteres estaban muy correlacionados entre sí, estableciéndose la hipótesis de un único gen con efectos pleiotrópicos. Este tipo de regulación génica ya fue estudiada con anterioridad pues la ruta de la giberelina ejerce efecto sobre la floración y el crecimiento (Komeda, 2004). En el cromosoma V de *V. faba* se podría establecer la misma hipótesis. De hecho, este cromosoma es sinténico con el VII de *Medicago* con lo que incluso podría tratarse de regiones homólogas en las dos especies como ya habían apuntado Cruz-Izquierdo et al. (2012) en su trabajo. Si buscamos en la base de datos Mt3.5 de *Medicago* los genes incluidos en el QTL descrito por Julier et al. (2007) y el marcador MCo048 (Pis_GEN_6_3_1) comprobamos como todos ellos se sitúan físicamente muy cerca en la secuencia del cromosoma. Incluso comprobamos como el marcador mapeado en nuestro trabajo se sitúa entre los genes mencionados por los otros autores en el trabajo de *M. truncatula*. En la Tabla 19 se detalla la información necesaria para esta comparación y por la que podemos concluir que ambas regiones son homólogas, reforzando aún más el interés de la zona para futuros estudios.

Tabla 19: Genes en los intervalos de confianza de QTLs de floración y crecimiento identificados en los cromosomas V y 7 de habas y Medicago, respectivamente. Se indica el nombre en la base datos Mt3.5, inicio y fin de la secuencia del gen en el cromosoma 7 de *M. truncatula*, así como la anotación.

Marcador	Gen/Homólogo <i>M. truncatula</i>	Inicio Mt3.5	Final Mt3.5	Anotación
CO	Medtr7g083540	24687756	24692195	Description=Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 14
Pis_GEN_6_3_1^a	Medtr7g084800	25318058	25321507	Description=Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A chloroplastic
FTa	Medtr7g084970	25432978	25435370	Description=FTa (Fragment)
FTb	Medtr7g085020	25453016	25453604	Description=FTb (Fragment)
FTa	Medtr7g085030	25454471	25455236	Description=FTa (Fragment)
FTc	Medtr7g085040	25463178	25466505	Description=FTc (Fragment)

^a Marcador incluido en el grupo de ligamiento asignado al cromosoma V de *Vicia faba*. El resto de nombre son los empleados por Julier et al. (2007) en su trabajo.

4.- Estrategias para la saturación de regiones portadoras de QTLs: sintenia y bibliografía

A lo largo de este capítulo se ha mencionado en repetidas ocasiones que la inclusión de marcadores informativos en los mapas de ligamiento, que a su vez son comunes con los de otros trabajos o que provienen de los desarrollados para otras especies, puede facilitar la comparación de resultados y la transferencia de información entre distintas poblaciones de la misma especie o entre especies relacionadas. En este último caso es fundamental el establecimiento de las relaciones de sintenia entre ellas. A partir del trabajo de Ellwood et al. (2008), mejorado por Cruz-Izquierdo et al. (2012), se pudo establecer las relaciones de macrosintenia entre las habas y leguminosas como las lentejas o *M. truncatula*. Así mismo, tras la publicación de la asignación de grupos de ligamiento de los mapas de *V. faba* al cromosoma IV (Ruiz-Rodríguez et al. 2014) y del mapa consenso de Satovic et al. (2013) se obtuvo un esquema más claro y completo de la homología entre las distintas regiones cromosómicas de las habas con las leguminosas comerciales más importantes y las distintas especies modelo. Estas relaciones han sido corroboradas y completadas recientemente en el trabajo publicado por Webb et al. (2015).

La información generada por todos estos trabajos puede ser utilizada en nuestro beneficio. Paralelamente se han publicado estudios sobre regiones genómicas asociadas a caracteres que también son de interés en nuestra especie o incluso se ha llegado a la designación de genes candidatos para algunos de ellos. Comprobar si estas regiones/genes son homólogos de los detectados en nuestros estudios puede agilizar el

proceso de saturación de regiones portadoras de genes/QTLs y por lo tanto el desarrollo de marcadores eficientes para la selección.

Un ejemplo de integración de la información disponible lo constituye el ejercicio realizado en el apartado anterior para comprobar la homología entre la región asociada a floración y crecimiento en el cromosoma V de habas y el 7 de *M. truncatula*. Siguiendo el mismo proceso, podemos aplicar lo expuesto para los caracteres de altura de planta (PH) y otros relacionados con él, como son la altura del primer nudo con flores y del primer nudo con vainas.

Cruz-Izquierdo (2009) estudió la correlación entre PH y las otras dos alturas en el año 2008 obteniendo valores de r significativos y superiores a 0,5 en ambos casos. También encontró valores de correlación superiores a 0,5 entre HLF y HLP, resultados confirmados en nuestro trabajo donde en las dos campañas evaluadas se obtuvieron valores de 0,7 y 0,6, respectivamente (Tablas 5 y 6).

En el cromosoma III de habas hemos identificado una región en la que se concentran QTLs para HLF y HLP validados en distintas campañas (este capítulo; Figura 2). En una región contigua, Cruz-Izquierdo (2009) identificó un QTL para altura de planta con los datos de la campaña 2008 (Figura 2). Por otra parte, Lagunes-Espinoza et al. (2012) hicieron un estudio para detectar regiones genómicas asociadas a la morfogénesis aérea en la especie *M. truncatula*. Entre los caracteres evaluados se encuentran algunos similares a los estudiados en la RIL Vf6 x Vf27, utilizada en nuestro trabajo. Caracteres como longitud del tallo principal (LMS-Length of Main Stem), número de ramas primarias (NPB-Number of Primary Branches), floración (FT-Flowering Time) y otros fueron evaluados en diferentes poblaciones para la detección de QTLs responsables de cada uno de ellos. En el cromosoma I de *M. truncatula* detectaron el principal QTL para LMS a través de la evaluación y análisis de tres poblaciones distintas. Para este QTL además propusieron una serie de genes candidatos recogidos en su publicación (Tabla 20).

Tabla 20: Posibles genes candidatos en el intervalo de confianza de QTL principal para longitud del tallo principal (LMS) (Tabla original parcialmente traducida de Lagunes-Espinoza et al. 2012)

Carácter	Cromosoma	Posición e IC	Entrada	Nombre del gen	Locus TAIR9	Anotación
LMS	1	62,5 (55-64)	AC158374	Medtr1g090940.1	At5g43310.1	COP1 (Constitutive photomorphogenic 1)
				Medtr1g094070.1	At1g08590.1	CLAVATA1 receptor kinase (CLV1)
				Medtr1g105980.1	At2g47070.1	SBP (Squamosa promoter binding protein, SBL in Arabidopsis)
				Medtr1g106180.1.2	At1g10630.1	ARF/SAR superfamily
				Medtr1g111460.1	At4g02980.1	Auxin-binding protein
				Medtr1g111940.1	At5g51230.3	EMBRYONIC FLOWER 2
				Medtr1g117980.1	At5g51230.3	
				Medtr1g117600.1	At4g14550.1	Aux/IAA protein
				Medtr1g117720.1	At1g04240.1	
				Medtr1g118000.1	At1g25580.1	NAM (No apical meristem protein)

El cromosoma I de la modelo es homólogo del III de habas por lo que sería posible que los QTLs localizados en ambos cromosomas fueran también homólogos y que por lo tanto los candidatos seleccionados por Lagunes-Espinoza et al. (2012) también sirvieran para *V. faba*.

Para poder proponer esta hipótesis, el primer requisito es confirmar que realmente las dos regiones mencionadas son homólogas. Para ello, identificamos los homólogos de *M. truncatula* que corresponden con los marcadores flanqueantes de los QTLs de altura identificados en el cromosoma III de habas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21: Homología de los ESTs cercanos a los QTLs de altura de plata (PH), altura del primer nudo con flores (HLF) y del primero con vainas (HLP) detectados en el grupo de ligamiento asignado al cromosoma III del mapa de habas Vf6 x Vf27 con los genes de la especie modelo *M. truncatula*.

QTL ^a	ESTs ^b	Otra nomenclatura	Pocisión (cM) ^c	Homólogo <i>M. truncatula</i>
PH-2-2008 (165,96-182,96)	M1U039	GLIP133	170,7	Medtr1g086340
	M1U040	CALTL	172,4	Medtr1g083960
	MCo055	mtmt_GEN_00477_04_1	183,8	Medtr1g075610
HLF-1 (212,8-264)	M1U044	PTSS4a	211,9	Medtr1g069105
	M1U045	PTSS4b	211,9	
HLP-1 (211,9-265,2)	MCo059	cgP137F	214,1	Medtr1g056180
	M1U047	GLIP651a	235,2	
	M1U224	mtmt_GEN_001090	265,7	Medtr1g050520
	M1U048	Lup011	279,5	Medtr1g043040

^a Además del nombre de los distintos QTLs, se indica la posición de su intervalos de confianza (IC). Cuando como para HLF y HLP el QTL se ha validado en distintas campañas, se presenta el IC teniendo en cuenta en conjunto los resultados obtenidos en todas las campañas.

^b Marcadores ESTs flanqueantes de los QTLs considerados o más cercanos a los mismos. La nomenclatura de esta columna es la utilizada en este trabajo para designar a los marcadores del mapa.

^c Distancia en centiMorgans desde el origen del grupo de ligamiento a los marcadores seleccionados

Lo primero que llama la atención es la buena conservación de la colinealidad en la región del grupo de ligamiento considerado con respecto a *M. truncatula*. Sabiendo que la nomenclatura en la base de datos Mt3.5 indica el orden físico de los genes, se puede ver que no hay discordancias, si bien nuestro mapa está invertido con respecto a la modelo.

En cuanto a la colocación de los genes candidatos propuestos con los QTLs detectados, a simple vista parece que no se produce (Tablas 20 y 21). El gen candidato que estaría más cerca de los intervalos de confianza de los QTLs considerados (Medtr1g090940.1, Tabla 20) estaría en una región contigua a los marcadores ligados en el mapa en la región de interés (Medtr1g043040-Medtr1g086340, Tabla 21) y por los tanto, a priori, fuera de los intervalos de confianza calculados para los QTLs. Si hacemos caso de la colinealidad observada, habría que buscar otros candidatos en la zona.

Para confirmar nuestras conclusiones y comprobar que para los candidatos propuestos no hubiera más copias en otras regiones del genoma que pudieran explicar otros QTLs, decidimos buscar homólogos de los genes de *Arabidopsis thaliana* L. observando que se cumpliera la anotación aportada por Lagunes-Espinoza et al. (2012). De esta forma detectamos lo que creemos un error en la nomenclatura empleada en el artículo y que hemos reproducido en la Tabla 20. En la Tabla 22 se recogen los

genes de *Medicago* homólogos a los de *Arabidopsis* y con la anotación aportada por los autores.

Si agrupamos la información de los genes flanqueantes y los mapeados en el intervalo de confianza del QTL PH-2-2008 con la de algunos de los candidatos propuestos por Lagunes-Espinoza et al. (2012) obtenemos la Tabla 23. En ella podemos ver que los candidatos para LMS estarían incluidos en el intervalo de confianza del QTL para altura de planta obtenido por Cruz-Izquierdo (2009).

Tabla 22: Revisión de los genes candidatos publicados por Lagunes-Espinoza et al. (2012). A partir del gen de la especie *Arabidopsis thaliana* L. y de su anotación, se ha buscado en las bases de datos el homólogo en *M. truncatula* que coincidiera con esta última.

Nomenclatura publicada	Locus TAIR9	Gen homólogo	Anotación
Medtr1g090940.1	At5g43310.1	Medtr1g075740	COP1 (Constitutive photomorphogenic 1)
Medtr1g094070.1	At1g08590.1	Medtr1g080440	CLAVATA1 receptor kinase (CLV1)
Medtr1g105980.1	At2g47070.1	Medtr1g086270	SBP (Squamosa promoter binding protein, SBL in Arabidopsis)
Medtr1g106180.1.2	At1g10630.1	Medtr1g086480	ARF/SAR superfamily
Medtr1g111460.1	At4g02980.1	Medtr1g089810	Auxin-binding protein
Medtr1g111940.1	At5g51230.3	Medtr1g090240	EMBRYONIC FLOWER 2
Medtr1g117980.1	At5g51230.3		
Medtr1g117600.1	At4g14550.1	Medtr1g093240	Aux/IAA protein
Medtr1g117720.1	At1g04240.1	Medtr1g070830	
Medtr1g118000.1	At1g25580.1	Medtr1g093680	NAM (No apical meristem protein)

Desgraciadamente, este QTL no ha sido validado al no ser incluido entre los caracteres de nuestro estudio, pero este nuevo resultado hace imprescindible su evaluación en nuevas campañas. De igual manera, la información obtenida en un excelente punto de partida para la saturación de la región portadora del QTL. El diseño de cebadores de los genes propuestos como candidatos y la búsqueda de polimorfismo para los mismos, podría determinar una mayor precisión en la identificación del QTL responsable del carácter y con ello un desarrollo más eficiente de marcadores para la selección.

En el intervalo de confianza considerado, Webb et al. (2015) han publicado en su mapa hasta 16 marcadores en una distancia de algo más de 20 cM que hay entre los marcadores Vf_Mt1g075610 que corresponde con nuestro marcador MCo055 o mtmt_GEN_00477_04_1 y el marcador GLIP133 que también está incluido en su mapa. El polimorfismo de estos 16 marcadores podría estudiarse directamente a través de la

plataforma de genotipado masivo KASP que comercializa LGC Genomics y que fue la usada por los autores en su trabajo.

Acotar con más precisión el intervalo de confianza nos dará, además, la oportunidad de seguir buscando el gen candidato responsable del QTL en estudio. La anotación de los genes de *Medicago* y los nuevos hallazgos que se vayan publicando, sobre todo, en las especies modelo nos pueden dar indicios a este respecto.

Tabla 23: Tabla conjunta de marcadores flanqueantes y en el intervalo de confianza del QYT PH-2-2008 (verde) y de los genes candidatos propuestos por Lagunes-Espinoza et al. (2012) (amarillo).

Cromosoma	Inicio ^a	Fin ^b	Identificación	Anotación
Mt1	33481869	33484141	ID=Medtr1g075610	Note=cyclin-dependent kinase
Mt1	33556117	33565362	ID=Medtr1g075740	Note=COP1-interacting-like protein
Mt1	35780478	35784001	ID=Medtr1g080440	Note=LRR receptor-like kinase family protein
Mt1	37414042	37417653	ID=Medtr1g083960	Note=calreticulin
Mt1	38604282	38611936	ID=Medtr1g086250	Note=squamosa promoter-binding-like protein
Mt1	38635190	38640245	ID=Medtr1g086340	Note=polyketide cyclase%2Fdehydrase and lipid transporter
Mt1	38692650	38695229	ID=Medtr1g086480	Note=ADP-ribosylation factor-like protein A1D

^a Punto de inicio de cada gen en la secuencia completa del cromosoma 1 de *Medicago truncatula* (base de datos Mt4.0)

^b Idem para el punto final de cada gen considerado

Prueba empírica sobre la responsabilidad real de los genes que se propongan tendría que venir dada por estudios de expresión o por otros de silenciamiento genético para estudiar cual es el efecto de ausencia de expresión del gen candidato. La realización de este tipo de pruebas deberá ser evaluada y considerada para cada QTL y carácter porque en muchos casos son difíciles de llevar a cabo. Lo que sí es cierto es que si el QTL se valida en distintos ambientes y en distintos fondos genéticos y además, la región portadora se satura adecuadamente, la probabilidad de obtener marcadores eficientes para la selección aumentaría enormemente.

Lo ideal sería el marcador perfecto, también llamado diagnóstico, que es el diseñado sobre el gen directamente responsable. Un marcador así fue diseñado en habas para el carácter inflorescencia terminal (Avila et al. 2006; 2007). Se identificó el homólogo de *Medicago* y se diseñaron cebadores para su amplificación en habas, obteniéndose la secuencia del gen y un polimorfismo que estaba presente en todas los genotipos de inflorescencia terminal probados y que los diferenciaba de los de crecimiento indeterminado (Avila et al. 2007). En los mismos trabajos, también se puso de manifiesto la necesidad de comprobar la eficiencia de los marcadores en la selección aunque hayan sido desarrollados sobre el gen responsable del carácter. Si la secuencia

elegida para la determinación del polimorfismo no es la responsable del cambio del fenotipo, el marcador no tiene por qué servir en todos los materiales. Incluso, aunque se haya desarrollado sobre ella, no hay garantías de que haya un nuevo alelo que precise de nuevos cebadores para evaluar el polimorfismo (Avila et al. 2007). En definitiva, la recomendación debería ser probar cada marcador desarrollado en los nuevos materiales que pretenda evaluar para tener la certeza de que van a ser útiles en la selección de un determinado fenotipo.

En cuanto a los QTLs para HLF y HLP parece confirmarse que ningún candidato de los propuestos co-localiza con los intervalos de confianza calculados. No obstante, también podemos obtener información a partir de la sintenia y la colinealidad observada. Nuevamente podemos obtener genes de *Medicago* en el intervalo de confianza que podemos emplear para saturar la región portadora e incluso para buscar genes candidatos entre los genes anotados. Igual que en el caso anterior, Webb et al. (2015) han desarrollado marcadores polimórficos provenientes de los genes de *Medicago* por lo que el uso de la plataforma de genotipado masivo también sería posible.

A lo largo de este capítulo hemos puesto ejemplos de cómo podemos emplear la información disponible en las habas y en *M. truncatula* para seguir avanzando en nuestros estudios. Son muchos los caracteres estudiados en nuestro trabajo y para todos se podría proceder de la misma manera. Existen numerosos estudios en la bibliografía, tanto en la especie modelo (Julier et al. 2007; Lagunes-Espinoza et al. 2012; Pierre et al. 2011; Stanton-Geddes et al. 2013; Yeoh et al. 2013) como en otras leguminosas (Bordat et al. 2011; Burstin et al. 2007; Chen et al. 2015; Gujaria-Verma et al. 2015; Kujur et al. 2015a; 2015b; Saxena et al. 2014; Varshney et al. 2015; Weeden et al. 2007; Ali et al. 2014; 2015) en los que se han estudiado los mismos caracteres u otros relacionados que pueden ser el punto de partida para la saturación de regiones portadoras de QTLs o para la designación de genes candidatos.

Con toda seguridad las herramientas y los conocimientos irán avanzando y será cada día más precisos en todas estas especies y también en *Vicia faba*. La integración de toda la información generada y que se genere precisará de un material vegetal adecuado que creemos que hemos conseguido en el primer capítulo de esta Tesis, al menos para una buena parte de los caracteres. A partir de aquí será necesaria una evaluación de cuáles son de mayor interés en un programa de mejora y centrarse en cada uno de ellos para profundizar en los mismos y optimizar la selección.

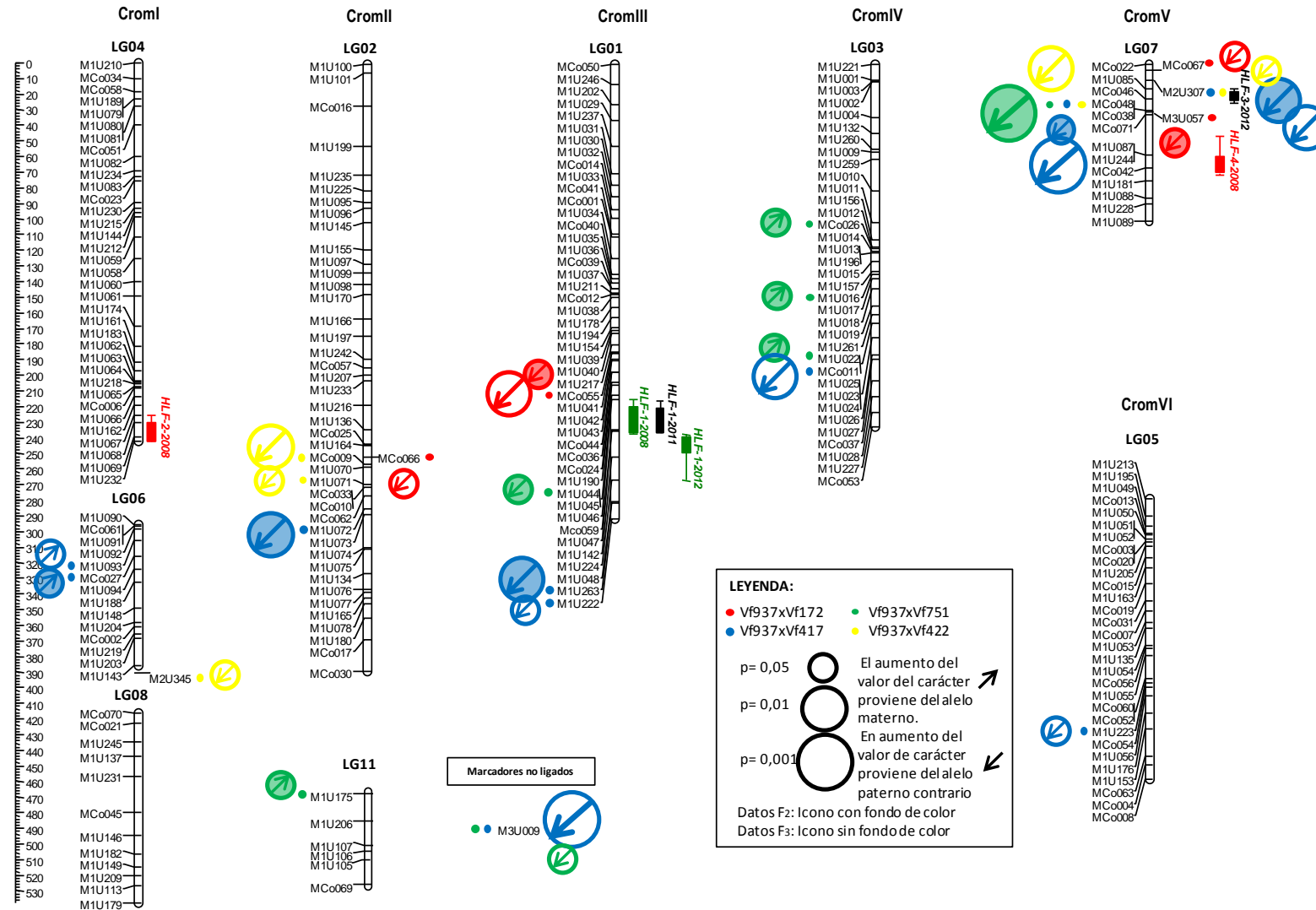


Fig 4A: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Altura de la primera Flor (HLF)

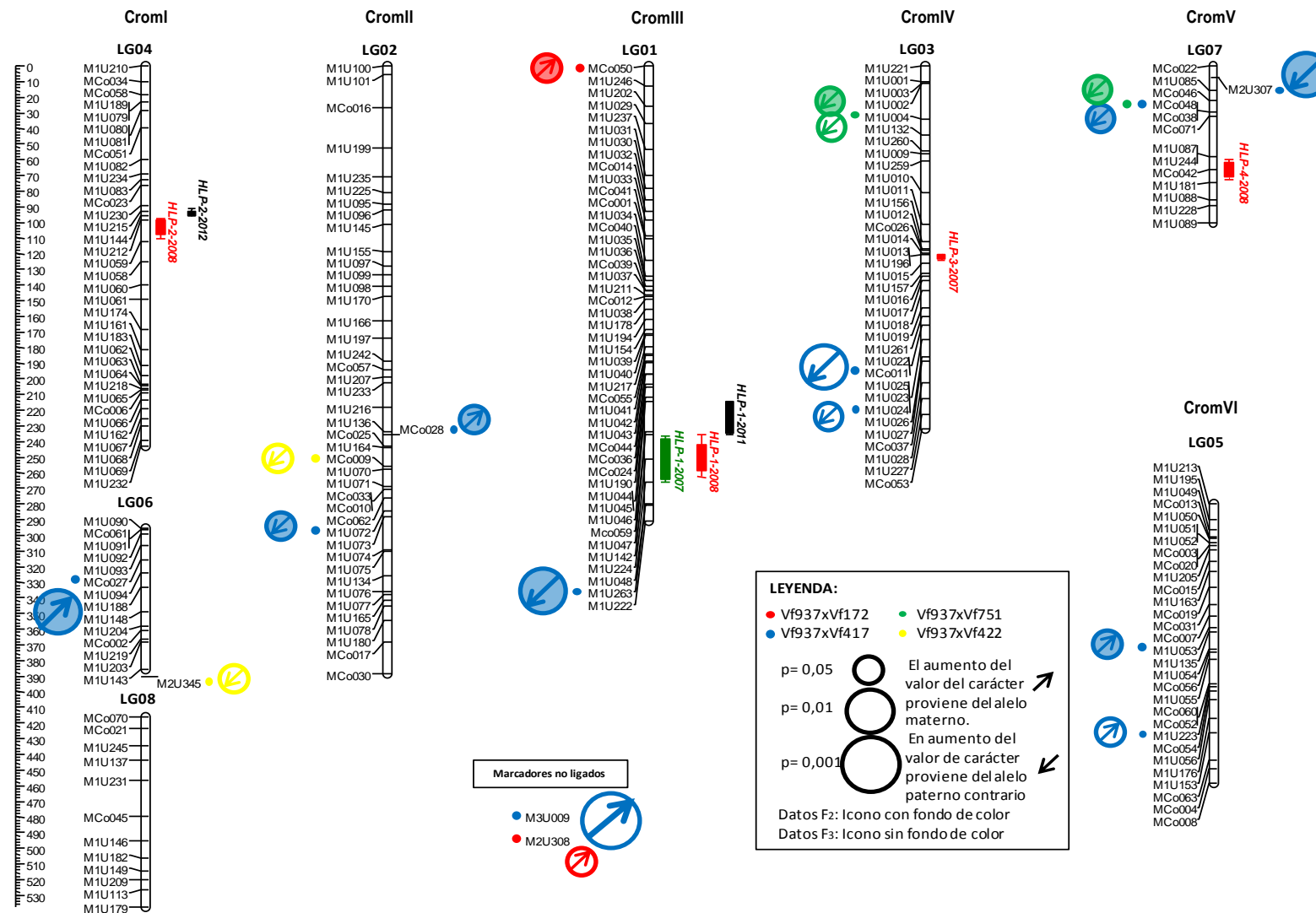


Fig 4B: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Altura de la primera vaina (HLP)

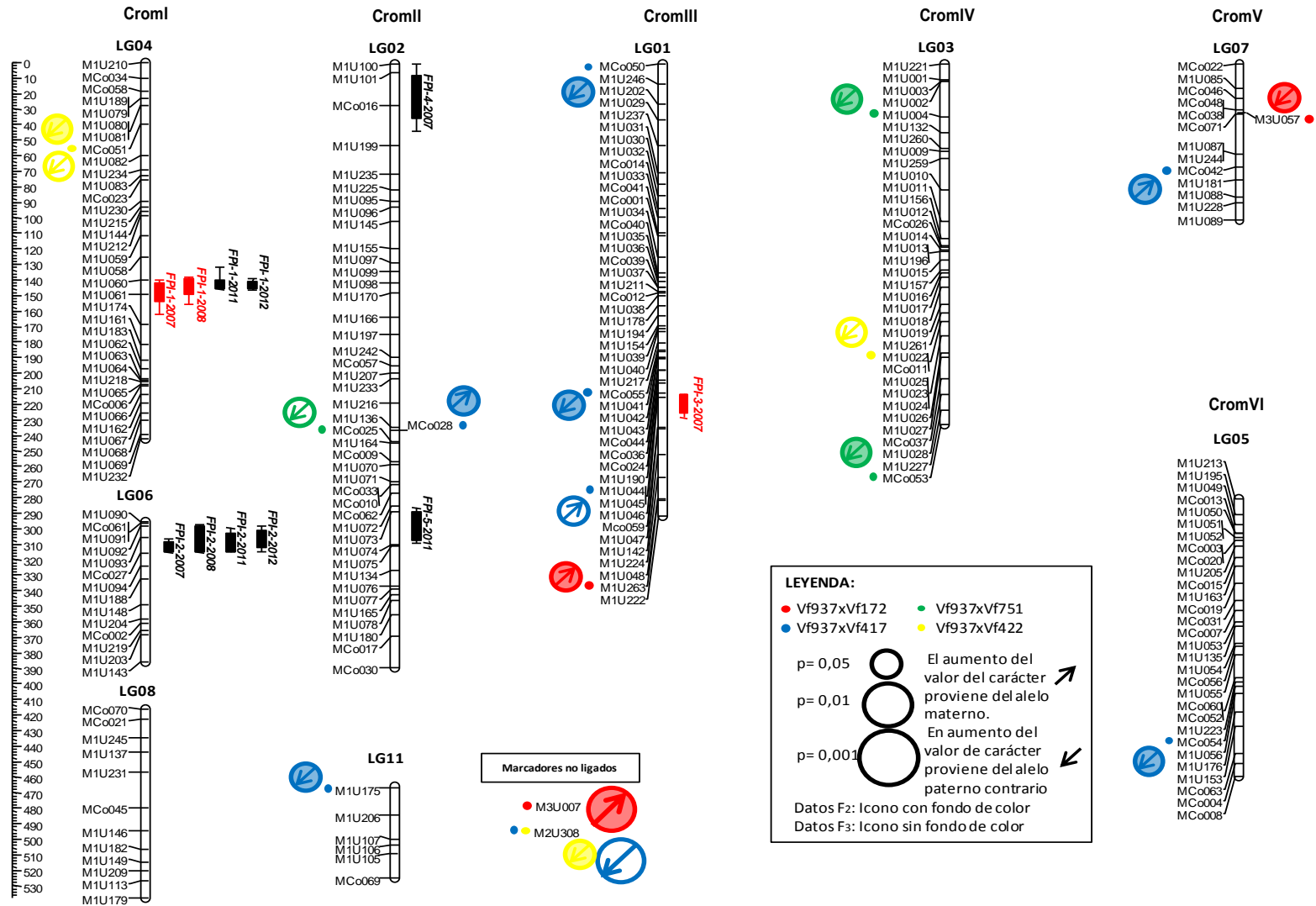


Fig 4C: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Flores por inflorescencia (FPI)

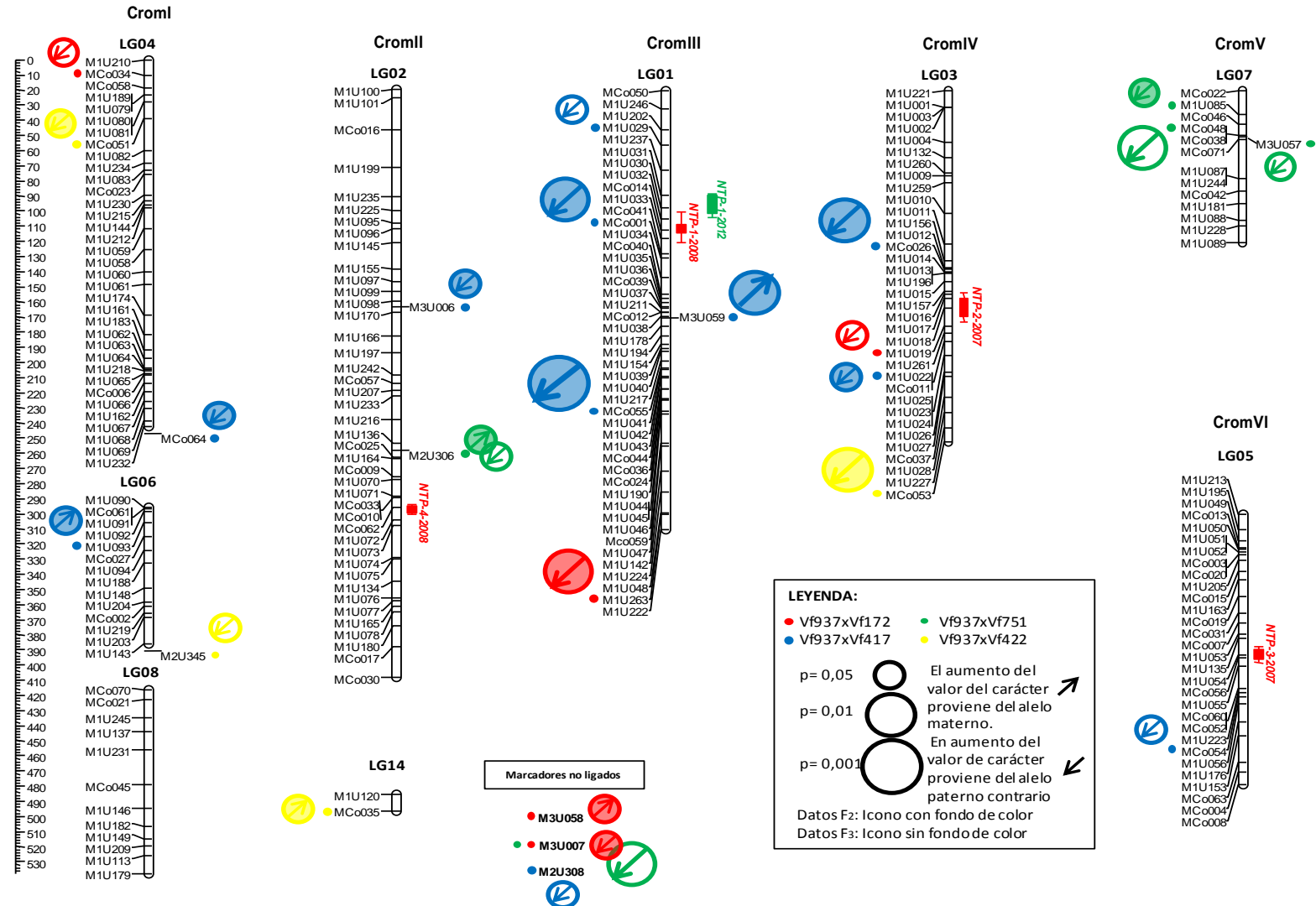


Fig 4D: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Número de Ramas (NTP)

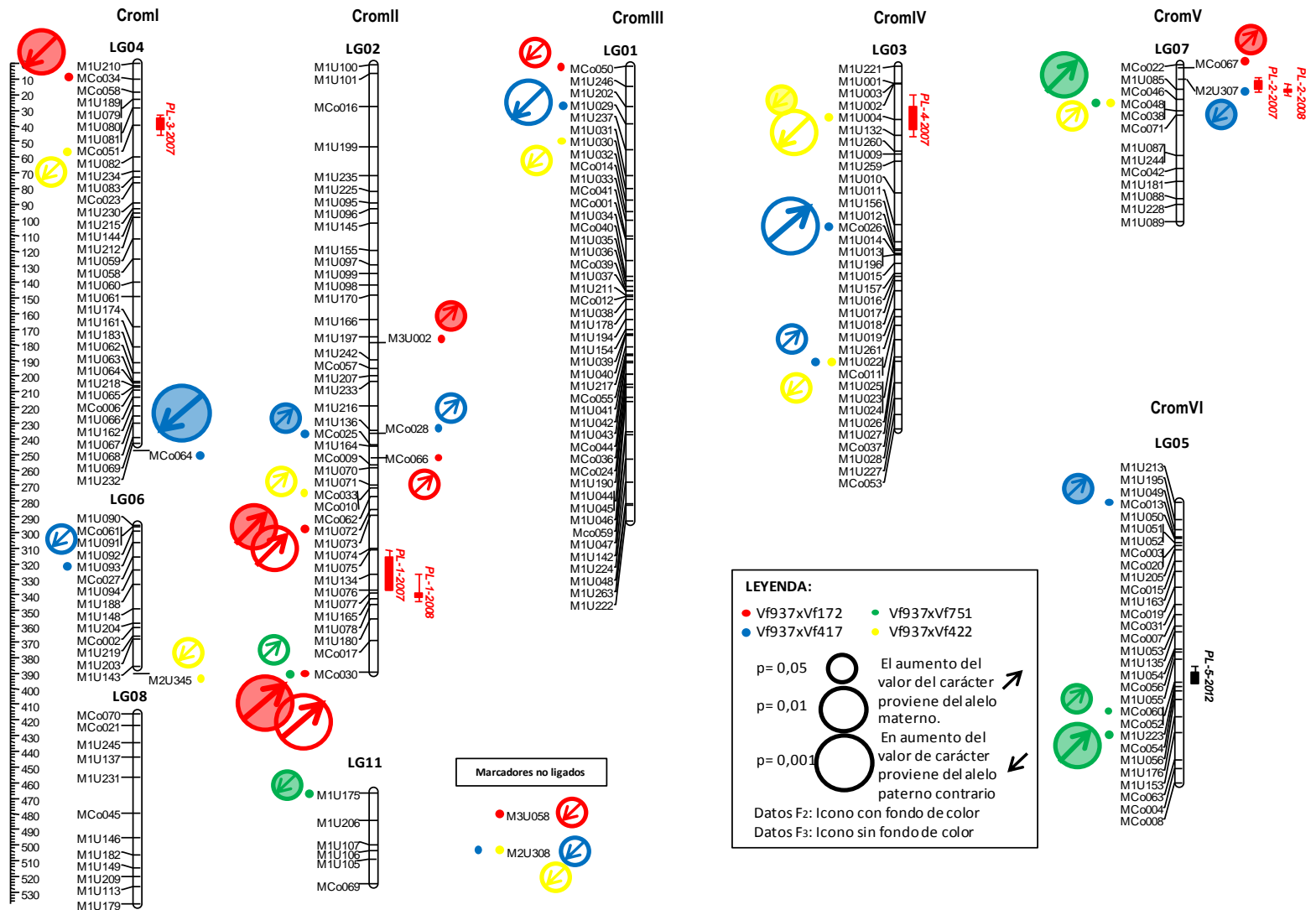


Fig 4E: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Longitud de vaina (PL)

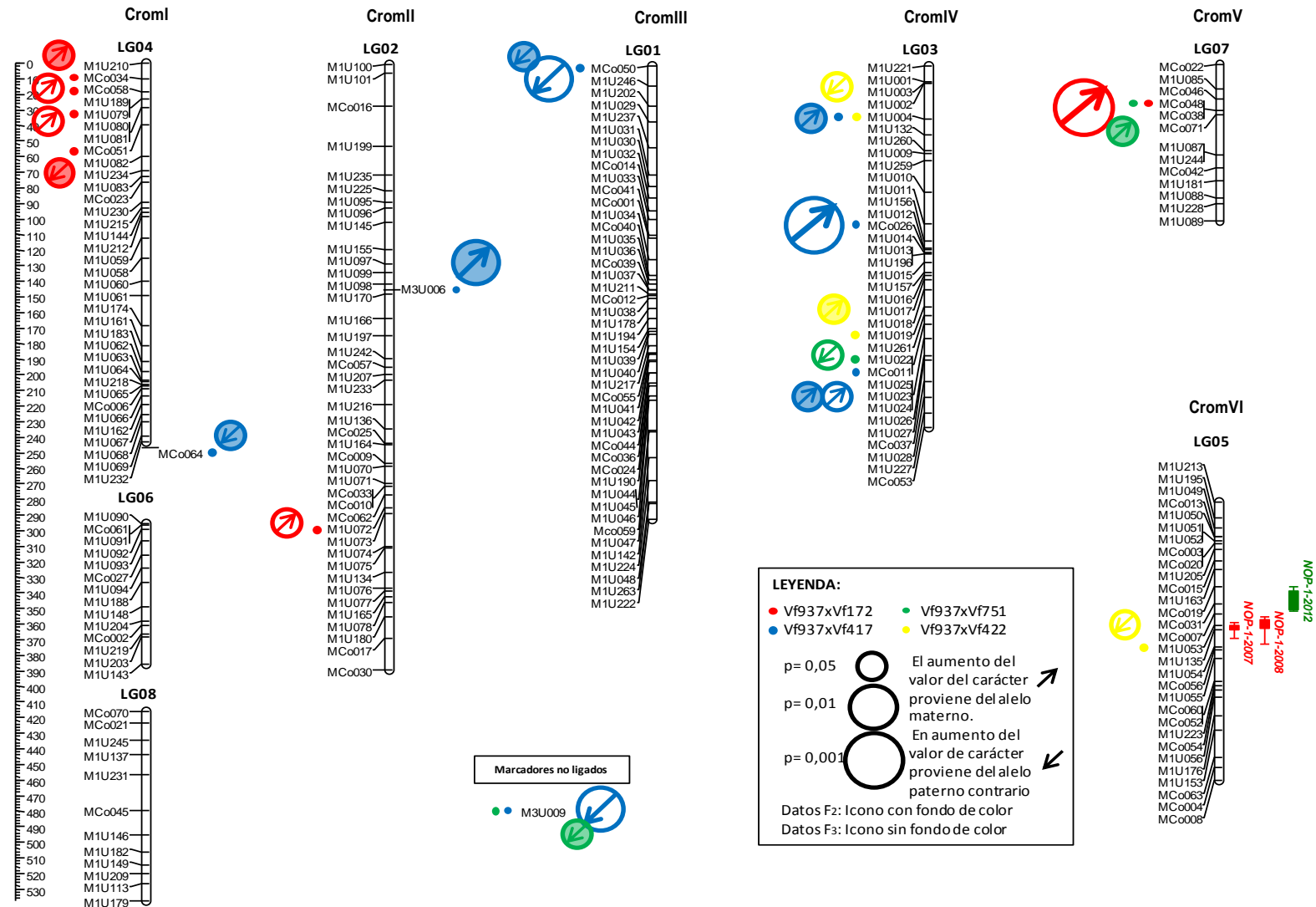


Fig 4F: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Número de Óvulos por Vaina (NOP)

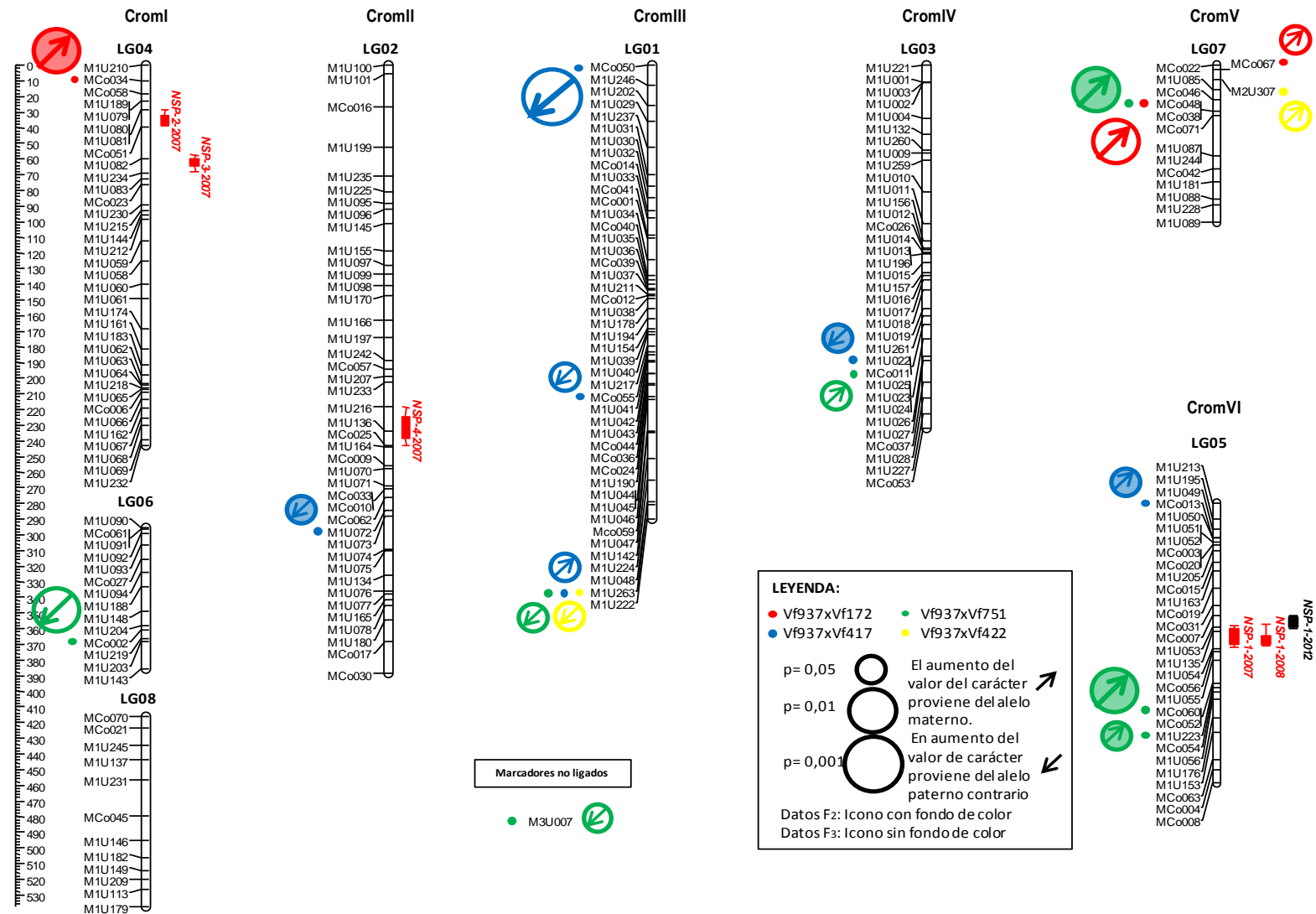


Fig 4G: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Número de Semillas por Vaina (NSP)

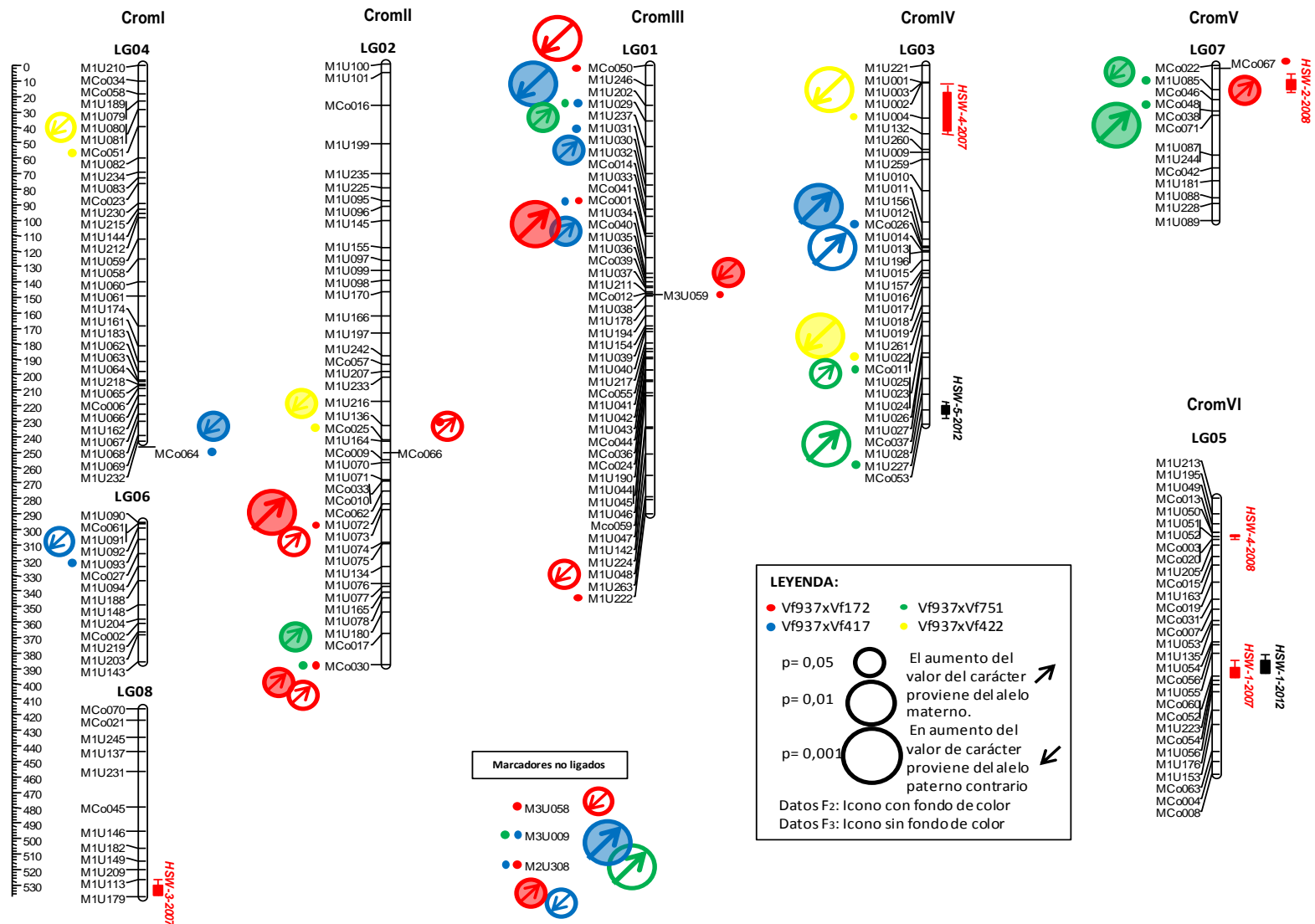


Fig 4H: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Peso de 100 Semillas (HSW)

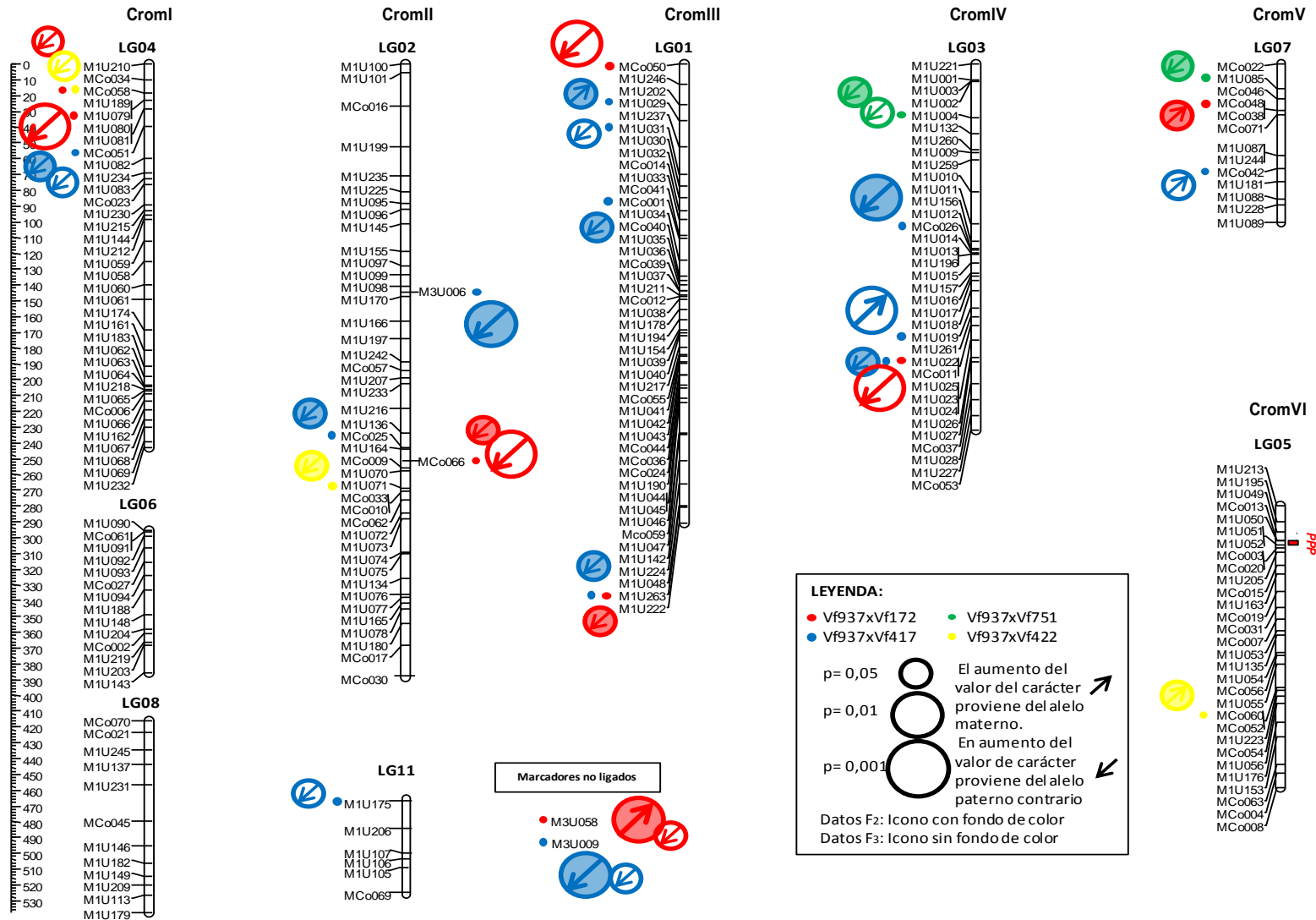


Fig 4I: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Vainas por Planta (PPP)

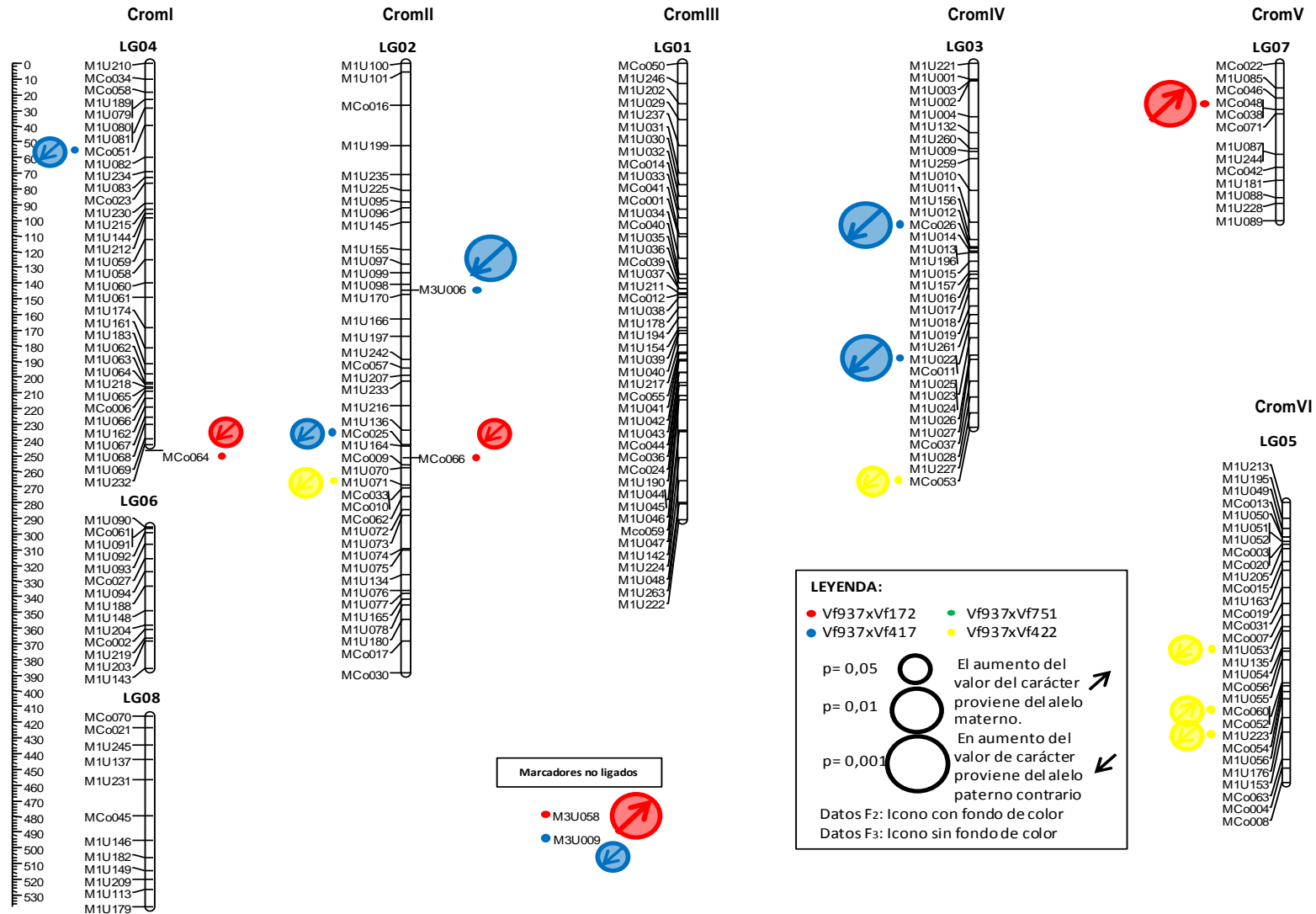


Fig 4J: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Granos Totales (SPP)

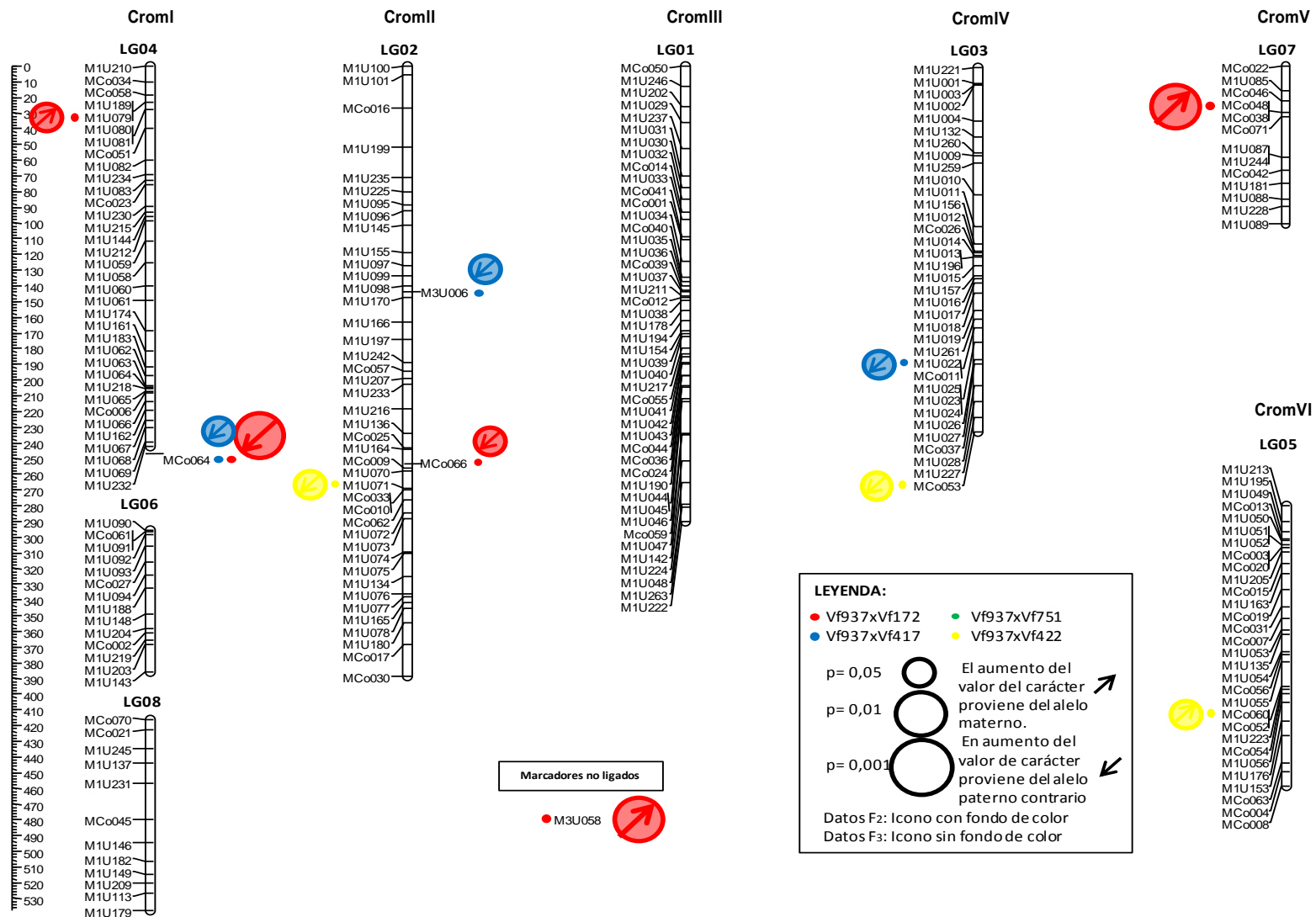


Fig 4K: Marcadores significativos y su relación con las poblaciones para el carácter Rendimiento (YIELD)

BIBLIOGRAFÍA

- Ali L, Azam S, Rubio J, Kudapa H, Madrid E, Varshney RK, Castro P, Chen W, Gil J, Millan T (2015). Detection of a new QTL/gene for growth habit in chickpea CaLG1 using wide and narrow crosses. *Euphytica*. DOI: 10.1007/s10681-015-1369-4.
- Ali L, Madrid E, Varshney RK, Azam S, Millan T, Rubio J, Gil J (2014). Mapping and identification of a *Cicer arietinum* NSP2 gene involved in nodulation pathway. *Theoretical and Applied Genetics* 127(2): 481-488.
- Avila CM, Atienza SG, Moreno MT, Torres AM (2007). Development of a new diagnostic marker for growth habit selection in faba bean (*Vicia faba* L.) breeding. *Theoretical and Applied Genetics*. 115(8): 1075-82.
- Avila CM, Nadal S, Moreno MT, Torres AM (2006). Development of a simple PCR-based marker for determination of growth habit in *Vicia faba* L. using a candidate gene approach. *Molecular Breeding* 17: 185-190.
- Avila CM, Satovic Z, Sillero JC, Rubiales D, Moreno MT and Torres AM (2004). Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theoretical and Applied Genetic* 108: 1071-1078.
- Avila CM, Satovic, Z, Sillero JC, Nadal S, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM (2005). QTL detection for agronomic traits in faba bean (*Vicia faba* L.) *Agriculturae Conspectus Scientificus* 70: 65-73.
- Avila CM, Sillero JC, Moreno MT, and Torres AM (2003). Identification of RADP markers linked to the Uvf-1 gene conferring hypersensitive resistance against rust (*Uromyces viciae-fabae*) in *Vicia faba* L. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 353-358.
- Bordat A, Savoie V, Nicolas M, Salse J, Chauveau A, Bourgeois M, Potier J, Houtin H, Ron C, Murat F, Marget P, Aubert G, Burstin J (2011). Translational Genomics in Legumes Allowed Placing *In Silico* 5460 Unigenes on the Pea Functional map and Identified Candidate Genes in *Pisum sativum* L. *Genes Genomes Genetics* 1: 93-103.
- Burstin J, Marget P, Huart M, Moessner A, Mangin B, Duchene C, Desprez B, Munier-Jolain N, Duc G (2007). Developmental genes have pleiotropic effects on plant

- morphology and source capacity, eventually impacting on seed protein content and productivity in pea. *Plant Physiology* 144: 768-781.
- Cheng P, Holdsworth W, Ma Y, Coyne CJ, Mazaurek M, Grusak MA, Fuchs S, McGee RJ (2015). Association mapping of agronomic traits in USDA pea single-plant collection. *Molecular Breeding* 35(2): 75.
- Churchill GA and Doerge RW (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Cottage A, Gostkiewicz K, Thomas J, Borrows R, Torres AM, O'Sullivan D (2012). Heterozygosity and diversity analysis using mapped single nucleotide polymorphisms in a faba bean in breeding programme. *Molecular Breeding*, 30, 1799–1809.
- Cruz-Izquierdo S (2009). Identificación de genes y QTLs relacionados con la domesticación y el rendimiento en la especie *Vicia faba*. Relaciones de sintenia con otros cultivos relacionados. Tesis doctoral. Departamento de Genética. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes. Universidad de Córdoba.
- Cruz-Izquierdo S, Avila CM, Satovic Z, Palomino C, Gutierrez N, Ellwood SR, Phan HTT, Cubero JI and Torres AM (2012). Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theoretical and Applied Genetics*: 1-16.
- Díaz-Ruiz R, Satovic Z, Ávila CM, Alfaro CM, Gutiérrez MV, Torres AM, Román B (2009a) Confirmation of QTLs controlling *Ascochyta fabae* resistance in different generations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop & Pasture Science* 60: 353-361.
- Díaz-Ruiz R, Torres A, Gutierrez MV, Rubiales D, Cubero JI, Kharrat M, Satovic Z, Román B. (2009b) Mapping of quantitative trait loci controlling *Orobanche foetida* Poir. resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *African Journal Biotechnol* 8:2718–2724.
- Díaz-Ruiz R, Torres AM, Satovic Z, Gutierrez MV, Cubero JI, Román B. (2010) Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) across environments and generations. *Theoretical and Applied Genetics*: 120:909–919.
- Ellwood SR, Phan HTT, Jordan M, Hanes J, Torres AM, Ávila CM, Cruz-Izquierdo S, Oliver RP (2008) Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia*

- faba* L.); conservation or genoma structure with *Lens culinaris*. BMC Genomics 9:380.
- Ghandorah MO, El-Shawaf IIS (1993). Genetic variability, heritability estimates, and predicted genetic advance for some characters in faba bean (*Vicia faba* L.). Journal of King Saud University-Agricultural Sciences 5: 207–218.
- Gondo T, Sato S, Okumura K, Tabata S, Akashi R, Isobe S (2007). Quantitative trait locus analysis of multiple agronomic traits in the model legume *Lotus japonicus*. Genome 50: 627-637.
- Gong YM, Xu SC, Mao WH, Hu QZ, Zhang GW, Ding J, Li ZY (2011). Generation and characterization of 11 novel EST derived microsatellites from *Vicia faba* (Fabaceae). American Journal of Botany. 98, e22–e24.
- Gujaria-Verma N, Vail SL, carrasquilla-García N, Penmetsa RV, Cook DR, Farmer AD, Vanderverg A, Bett KE (2015). genetic mapping of legume orthologs reveals high conservation in synteny between lentil species and the sequenced genomes of Medicago and chickpea. Frontiers in Plant Science 5: 676.
- Gutierrez N, Avila CM, Duc G, Marget P, Suso MJ, Moreno MT, and Torres AM (2006). CAPs markers to assist selection for low vicine and convicine content in faba bean (*Vicia faba* L.). Theoretical and Applied Genetics. 114:59–66.
- Gutierrez N, Avila CM, Moreno MT, and Torres AM (2008). Development of SCAR markers linked to *zt-2*, one of the genes controlling absence of tannins in faba bean. Australian Journal of Agricultural Research. 59(1):62- 68.
- Gutierrez N, Avila CM, Rodriguez-Suarez C, Moreno MT, and Torres AM (2007). Development of SCAR markers linked to a gene controlling absence of tannins in faba bean. Molecular Breeding. 19:305-314.
- Gutierrez N, Palomino C, Satovic Z, Ruiz-Rodriguez MD, Vitale S, Gutierrez MV, Rubiales D, Kharrat M, Amri M, Emeran AA, Cubero JI, Atienza SG, Torres AM, Avila CM (2013). QTLs for *Orobanche spp.* resistance in faba bean: identification and validation across different enviroment. Molecular Breeding 32: 909-922.
- Jansen RC (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. Genetics 135, 205-211.

- Jansen RC (1994). Controlling the Type I and Type II Errors in Mapping Quantitative trait loci. *Genetics* 138(3): 871-881.
- Jansen RC, Stam P (1994). High resolution of quantitative trait into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136, 1447-1455.
- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre JB, Prosperi JM, Barre P, Huyghe C (2007) Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphology in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical Applied Genetics* 114: 1391-1406.
- Kalia P, Pathania NK (2007). Genetic variability and trait relationships for quantitative and quality characters in winter bean (*Vicia faba* L.) *ISHS Acta horticulturae*, 752: 405-409.
- Kaur S, Pembleton L, Cogan N, Savin K, Leonforte T, Paull J, Materne M, Foster J (2012). Transcriptome sequencing of field pea and faba bean for discovery and validation of SSR genetics markers. *BCM Genomics* 13, 104.
- Kaur S, Kimber RBE, Cogan NOI, Materne M, Forster JW, Paull JG (2014a). SNP discovery and high-density genetic mapping in faba bean (*Vicia faba* L.) permits identification of QTLs for ascochyta blight resistance. *Plant Science* 217–218: 47–55.
- Kaur S, Cogan N, Forster J, Paull J (2014b). Assessment of genetic diversity in faba bean based on single nucleotide polymorphism. *Diversity* 6: 88–101.
- Khazaei H, O'Sullivan DM, Sillanpää MJ, Stoddard FL (2014). Use of synteny to identify candidate genes underlying QTL controlling stomatal traits in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theoretical Applied Genetics* 127: 2371-2385.
- Koinage EMK, Singh SP, Gepts P (1996). Genetics control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Science* 36: 1037-1945.
- Komeda Y (2004). Genetic Regulation of time to flower in *Arabidopsis Thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* 55: 521-35.
- Kujur A, Bejaj D, Upadhyaya HD, Das S, Ranjam R, Sree T, Saxena MS, Badoni S, Kumar V, Tripathi S, Gowda CLL, Sharma S, Singh S, Tyagi AK, Parida SK (2015a). Employing genome-wide SNP discovery and genotyping strategy to extrapolate the natural allelic diversity and domestication patterns in chickpea. *Frontiers in Plant Science* 6: UNSP 162.

Kujur A, Upadhayaya HD, Sfree T, Bajaj D, Das S, Saxena MS, Badoni V, Kumar V, Tripathi S, Gowda CLL, Sharma S, Singh S, Tyagi AK, Parida SK (2015b) Ultra-high density intra-specific genetic linkage maps accelerate identification of Functionally relevant molecular tags governing important agronomic traits in chickpea. *Scientific Reports* 5:9468.

Lagunes-Espinoza LC, Huguet T, Julier B (2012). Multi-population QTL detection for aerial morphogenetic traits in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 739-754.

Lander ES, Botstein D (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–189.

Lassner MW, Peterson P, Yoder JI (1989). Simultaneous amplification of multiple DNA fragments by polymerase chain reaction in the analysis of transgenic plants and their progeny. *Plant Molecular Biology Reports* 7: 116-128.

Li et al 2006

Ma Y, Yang T, Guan J, Wang S, Wan H, Sun X, Zong X. (2011). Development and characterization of 21 EST-derived microsatellite markers in *Vicia faba* (faba bean). *American Journal of Botany* 98: e22–e24.

Pierre JB, Bogard M, Herrmann D, Huighe C, Julier B. (2011). A CONSTANS-like gene candidate that could explain most of the genetic variation for flowering date in *Medicago truncatula*. *Molecular Breeding* 28: 25-35.

Pinson SRM, Capdevielle FM, Oard JH (2005). Confirming QTLs and finding additional loci conditioning sheath blight resistance in rice using recombinant inbred lines. *Crop Science*. 45: 503–510.

Ramsey G, van de Ven W, Waugh R, Griffiths DW, Powel W (1995). Mapping quantitative trait loci in faba beans. En: AEP (ed.) 2nd European Conference on Grain Legume. Copenhagen, Denmark. AEP. Paris, France. 444-445.

Ray H, Bock C, Georges F (2015). Faba bean: Transcriptome analysis from etiolated seedling and developing seed coat of key cultivars for synthesis of proanthocyanidins, phytate, raffinose family oligosaccharides, vicine and convicine. *The Plant Genome* 8, n.1.

- Romagosa I, Han F, Ullrich SE, Hayes PM, Wesenber DM (1999). Verification of yield QTL through realized molecular marker-assisted selection responses in a barley cross. *Molecular Breeding* 5: 143-152.
- Roman B, Satovic Z, Pozarkova D, Macas J, Dolezel J, Cubero JI, Torres AM, (2004). Development of a composite map in *Vicia faba*, breeding applications and future prospects. *Theoretical and Applied Genetics*. 108, 1079–1088.
- Roman B, Torres AM, Rubiales D, Cubero JI, Satovic Z (2002). Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobanche crenata Forsk*) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome* 45: 1057-1063.
- Ruiz-Rodriguez MD, Avila CM, Torres AM, Fuchs J, Schubert I (2014). Anchoring of genetic linkage maps to the chromosoma complement of *Vicia faba* L. *Molecular Breeding* 33: 743-748.
- Satovic Z, Avila CM, Cruz-Izquierdo S, Díaz-Ruiz R, García-Ruiz GM, Palomino C, Gutiérrez N, Vitale S, Ocaña-Moral S, Gutiérrez MV, Cubero JI and Torres AM (2013). A reference consensus genetic map for molecular markers and economically important traits in faba bean (*Vicia faba* L.) *Genomics* 14:932.
- Saxena MS, Bajaj D, Das S, Kujur A, Kumar V, Singh M, Bansal KC, Tyagi AK, Parida SK (2014). An integrated genomic approach for rapid delineation of candidate genes regulating agro-morphological traits in chickpea. *DNA Research* 21 (6): 695-710.
- Simmonds J, Scott P, Leverington-Waite M, Turner AS, Brinton J, Korzun V, Snape J, Uauy C (2014). Identification and independent validation of a stable yield and thousand grain weight QTL on chromosome 6A of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 14:191.
- Stanton-Geddes J, Paape T, Epstein B, Briskine R, Yoder J, Mudge J, Barthi AK, Farmer AD, ZhouP, Denny R, May GD, Erlandson S, Yakub M, Sugawara M, Sadowsky MJ, Young ND, Tiffin P (2013). Candidate genes and Genetic Architecture of Symbiotic and Agronomic Traits Revealed by Whole-Genome, Sequence Based Association Genetics in *Medicago truncatula*. *PlosONE* 8(5): e65688.
- Toker C (2004). Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield criteria in faba bean (*Vicia faba* L.). *Hereditas* 140: 222-225.

- Torres AM, Avila CM, Gutierrez N, Palomino C, Moreno MT, Cubero JI (2010). Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.) Field Crops Research 115: 243–252.
- Torres AM, Weeden NF, Martín A (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theoretical and Applied Genetics 85:937-945.
- Van Ooijen JW (1992). Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. Theoretical and Applied Genetics 84:803-811.
- Van Ooijen JW (2000). MapQTL™ version 4.0: user friendly power in QTL mapping. Addendum to the manual of version 3.0. Wageningen: Plant Research International.
- Varshney RK; Kudapa H, Pazhamala L, Chitikireni A, Thudi M, Bohra A, Gaur PM, Janila P, Fikre A, Kimurto P, Ellis N (2015). Translational Genomics in agriculture: Some Examples in Grain Legumes. Critical Reviews in Plant Sciences, 34 (1-3): 169-194.
- Vaz Patto MC (1997). Desarrollo del mapa genético y localización de genes de interés agronómico en *Vicia faba* L. Master of Science of the Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ). 204 pp.
- Vaz Patto MC, Torres AM, Koblizkova A, Macas J and Cubero JI (1999). Development of a genetic composite map of *Vicia faba* using F₂ populations derived from trisomic plants. Theoretical and Applied Genetics 98:736-743
- Villegas Fernández AM (2012). Mejora de habas (*Vicia faba* L.) para resistencia a *Botrytis fabae* Sard. Tesis doctoral. Dpto. De Genética. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Universidad de Córdoba.
- Voorrips RE (2002). MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. Journal of Heredity 93:77-78
- Wang H, Yang T, Guan J, Ma Y, Sun X, Zong X. (2011). Development and characterization of 20 novel polymorphic STS markers in *Vicia faba* (faba bean). American Journal Botany. 98, e189–e191.
- Webb A, Cottage A, Wood T, Khamassi K, Hobbs D, Gostkiewicz K, White M, Khazaei H, Ali M, Street D, Duc G, Stoddard F, Maalouf F, Ogonnaya FC, Link W, Thomas J

and O'Sullivan DM (2015). A SNP-based consensus genetic map for synteny-based trait targeting in faba bean (*Vicia faba* L.). Plant Biotechnology Journal. ISSN 1467-7652 (In Press).

Weeden NF (2007). Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: Is there a common genetic basis to the “Domestication syndrome” for legumes? Annals of Botany 100(5): 1017-1025.

Yeoh CC, Balcerowicz M, Zhang L, Jaudal M, Brocard L, Ratet P, Putterill J (2013). Fine Mapping Links the *FTa1* Flowering Time Regulator to the Dominant *Spring1* Locus in Medicago. PlosONE 8(1): e53467

Zeid M, Mitchell S, Link W, Carter M, Nawar, A, Fulton T, Kresovich S (2009). Simple sequence repeats (SSRs) in faba bean: new loci from Orobanche-resistant cultivar 'Giza 402'. Plant Breeding 128:149-155.

Discusión General

DISCUSIÓN GENERAL

La ampliación de la base genética de los distintos cultivos ha pasado a ser una de las mayores necesidades de la Agricultura actual. El proceso de la mejora vegetal, junto con la acción de las casas comerciales, ha llevado a la eliminación de variedades locales y/o primitivas que estaban adaptadas a las distintas condiciones de cultivo. Este hecho, que se da principalmente en países desarrollados, pone en peligro la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, sobre todo teniendo en cuenta las expectativas de cambio climático generadas por la mayoría de los modelos predictivos actuales. De ahí que los mejoradores necesiten de toda la variabilidad disponible para poder desarrollar nuevas variedades con una mayor adaptabilidad de los cultivos a las condiciones cambiantes que pueden sobrevenir a causa del cambio climático.

En los Bancos de Germoplasma se viene trabajando desde hace años en la colecta de material silvestre relacionado con las especies cultivadas, así como de variedades locales y primitivas que aseguren la disponibilidad de un reservorio de genes imprescindibles para afrontar la mejora en el futuro. El término “pre-mejora” precisamente se acuñó para englobar los procesos que permiten la transferencia de genes a partir de variedades primitivas o de ancestros silvestres al material mejorado, proceso que no siempre es fácil. De hecho, los mejoradores siempre hablaron de “genes co-adaptados” para explicar la dificultad de pasar un gen “limpio” de una variedad primitiva a una línea de mejora: el gen pasaba por retrocruzamiento, pero con él una buena cantidad de genes “acompañantes” que se encontraban estrechamente ligados con él.

El problema ha de afrontarse a través de programas de cruzamientos recurrentes o de retrocruzamientos, y en la actualidad se pueden aprovechar todas las herramientas puestas a disposición de la mejora por la Biotecnología. Por ejemplo se pueden transferir genes mediante ingeniería genética, una vez se ha detectado la posición del gen y ha sido aislado y clonado. Para ello es necesario disponer de buenos mapas genéticos en los que no sólo estén ubicados los genes de acción cualitativa sino también QTLs.

No siempre es posible llegar a la clonación de genes pero se puede localizar un gen o QTL y analizar las posibilidades de transferencia por cruzamiento con seguimiento con marcadores (MAS). El propio desarrollo de poblaciones para la construcción de mapas utilizando razas primitivas puede llevar a la obtención de nuevas combinaciones génicas por recombinación, que permitan obtener líneas con valor agronómico y con características distintas de las actuales.

Las habas no son una excepción y, por tanto, la ampliación de su base genética se ha reconocido como una necesidad para el cultivo. Por este motivo, en nuestro trabajo se propuso el estudio del potencial de las variedades locales recogidas en las regiones de cultivo antiguas y modernas, para evaluar el potencial de su uso en la mejora de la especie.

Para ello hemos desarrollado poblaciones RILs derivadas de cruzamientos entre los cuatro tipos botánicos que describió Muratova (1931) y algunas formas intermedias. En concreto hemos obtenido once de estas poblaciones y estamos en proceso de conseguir otras tres. Este material es de gran interés, en primer lugar porque son poblaciones estables, con los caracteres fijados, lo que nos permite la realización de estudios en distintos ambientes y en distintas campañas sin la limitación que suele suponer la escasez de semillas que se da en otros tipos de poblaciones. Por otro lado, como se ha apuntado anteriormente, se pueden obtener nuevas combinaciones génicas interesantes para el programa de mejora. Además son un material perfecto para el desarrollo de mapas de ligamiento en los que localizar genes y QTLs responsables de los caracteres de arquitectura y rendimiento de la especie, así como para el establecimiento de una estrategia de selección asistida por marcadores que disminuya el tiempo de obtención de nuevas variedades.

Por otra parte, la evaluación de las poblaciones F_2 de partida nos ha servido para profundizar en el estudio de algunas limitaciones que se pueden presentar a la hora de transferir genes/QTLs desde materiales primitivos y que ya han sido mencionados anteriormente. De esta manera, se ha obtenido una información preliminar muy valiosa a la hora de diseñar futuros trabajos con el material RIL obtenido.

Los análisis de componentes principales realizados para estudiar la variabilidad observada en las distintas generaciones F_2 sugieren que no existen bloques génicos que expliquen la arquitectura genética de las poblaciones dado el alto número de componentes que son necesarios para explicar el 90% de la variabilidad. Este hecho es de gran importancia para los programas de mejora de la especie ya que implicaría la posibilidad de trabajar de manera independiente con los caracteres estudiados. De hecho, la agrupación de caracteres propia de los parentales desaparece en F_2 y $F_{2:3}$, sobre todo en F_2 , sugiriendo que no existe un fuerte ligamiento entre aquellos y que en las $F_{2:3}$ puede comenzar una reagrupación, aunque sin repetir la constitución de los parentales

La evaluación fenotípica del material también nos ha permitido estimar el intervalo de variación existente para los caracteres evaluados en cada cruzamiento. Además, también se ha hecho una aproximación preliminar al tipo de herencia de cada uno de ellos. Con la combinación de estos resultados hemos seleccionado las poblaciones que, a priori, serían idóneas para el estudio en profundidad de cada carácter.

En cuanto a la herencia, cabría destacar que, en general, se observa una tendencia hacia efectos de dominancia, de distinto sentido dependiendo del carácter y del cruzamiento evaluado, una fuerte acción ambiental y una frecuente falta de variación entre parentales que impide el análisis. En la comparación de nuestros resultados con los obtenidos en otros trabajos (Hobbs y Burnett, 1982; Martin y Cubero, 1979; Suso et al. 1983, 1984, 1986; Suso y Cubero, 1986) se obtiene una homogeneidad más que aceptable, si bien, no son tan clarificadores como nos hubiera gustado.

Como ya apuntaban otros trabajos (además de los citados, Serradilla et al. 2003), las diferencias fenotípicas que llevaron a Muratova (1931) a la clasificación de las habas en distintos tipos botánicos, no tienen que ver con una diferente estructura génica sino con diferencias en los criterios de selección del cultivo a nivel regional. En otras palabras, la especie es un único complejo génico sin barreras evolutivas en el que todas las formas pueden cruzarse entre sí.

Ya se ha mencionado a la Biotecnología como una herramienta que puede ser muy útil para la transferencia de los caracteres de interés desde las variedades primitivas a las modernas. La identificación de marcadores moleculares ligados a genes y QTLs responsables de estos caracteres facilita su transferencia. Entre las distintas disciplinas de la Biotecnología, la genómica comparativa ha adquirido una gran importancia en los últimos años, ya que facilita el intercambio y uso de recursos genómicos entre diferentes especies, reduciendo el coste y aumentando la eficiencia en la investigación genética y en la mejora vegetal (Phan et al. 2006). El llamado mapeo comparativo ha demostrado que la organización de genes dentro de los genomas ha permanecido muy conservada a través de la evolución. En estos trabajos adquieren gran relevancia las especies modelo que sirven de puentes entre cultivos y como referencias consistentes.

En leguminosas se han considerado dos especies modelo, *M. truncatula* y *Lotus japonicus*, que han sido objeto de diversos proyectos genómicos multinacionales, consecuencia de los cuales se han originado técnicas moleculares y bioinformáticas para la elaboración de mapas comparativos entre las distintas leguminosas. Estos estudios han permitido la identificación de regiones homólogas responsables de caracteres de

interés agronómico. Todo ello redundará en un aumento de la eficiencia en el manejo de caracteres en los programas de mejora.

Los estudios desarrollados por Cruz-Izquierdo (2009) y Cruz-Izquierdo et al. (2012), fueron los primeros trabajos en los que se establecían las relaciones de macrosintenia entre casi todos los cromosomas de habas y los de *M. truncatula*. La única excepción la constituía el cromosoma IV de *V. faba*, para el que en ese momento no se habían asignado grupos de ligamiento físicamente localizados en ninguno de los trabajos de mapeo de la especie (Torres et al. 2010). Durante la realización de esta Tesis se ha subsanado esta limitación, completando así el cuadro de homologías. Para ello se trabajó con líneas de translocación de *V. faba* (Schubert & Rieger, 1991) de las cuales, por técnicas de microdissección, se aislaron sus cromosomas. Este ADN se utilizó para la amplificación de marcadores moleculares mapeados en trabajos previos. De esta manera se pudo determinar que el grupo de ligamiento I.B., que hasta entonces estaba asignado al cromosoma I, era en realidad el cromosoma IV (Ruiz-Rodríguez et al. 2013). Esta información ya ha sido integrada en los mapas consenso de la especie publicados recientemente (Satovic et al. 2013; Webb et al. 2015).

Para hacer uso de la genómica comparativa es indispensable la localización de genes y QTLs responsables de los caracteres de interés en mapas donde se usen marcadores comunes con los empleados en otras especies y sobre todo en las especies modelo, de tal manera que la comparación de la información sea posible de una manera eficiente. En este sentido, la validación de los resultados obtenidos tanto en distintas condiciones ambientales como en distintos fondos genéticos es un requisito ineludible. Por otra parte, esta validación es también necesaria para que la información generada sea realmente de utilidad en cualquier programa de mejora y en la estrategia de MAS (Ramagosa et al. 1999; Pinson et al. 2005; Simmonds et al. 2014).

En nuestro estudio se han validado QTLs para arquitectura de la planta y rendimiento de la población de *V. faba* Vf6 × Vf27 identificados previamente en los trabajos de Cruz-Izquierdo (2009) y Cruz-Izquierdo et al. (2012). Para ello se ha evaluado la misma población RIL en dos nuevas campañas, lo que ha permitido la confirmación parcial de los resultados y la identificación de nuevas regiones asociadas con los caracteres considerados.

Nuestros resultados corroboran la acumulación de QTLs en diferentes regiones genómicas tal y como describieron previamente Cruz-Izquierdo, 2009 y Cruz-Izquierdo et al. (2012). Destacan tres regiones con estas características: GL05 del cromosoma VI, con

clara influencia sobre los caracteres de rendimiento, GL07 (cromosoma V) relacionado con caracteres de floración (Cruz-Izquierdo et al. 2012) y por último en GL01 (cromosoma III) donde se acumulan caracteres relacionados con la arquitectura de la planta. Quedaría por determinar en estas regiones si existe un único gen con influencia sobre todos los caracteres o si bien se trata de diferentes genes muy cercanos y responsables de los diferentes caracteres. La saturación de estas regiones con nuevos marcadores podría arrojar luz sobre este punto.

En cuanto a la validación de QTLs en distintos fondos genéticos, hemos realizado dos aproximaciones. En la primera se han comparado los resultados obtenidos en la evaluación de QTLs de la población RIL Vf6 × Vf27 (Cruz-Izquierdo, 2009, Cruz-Izquierdo et al. 2012 y este trabajo) con los QTLs relacionados con caracteres agronómicos de habas publicados por Ávila et al. (2005) o con los QTLs para “peso de un grano” recientemente publicados por Khazaei et al. (2014). Esta aproximación ha permitido validar un QTL para “longitud de vaina” en el cromosoma V de la especie. En este mismo cromosoma y en el III, se validaron otros dos QTLs para “altura del primer nudo con flores”. En cuanto al peso de grano, los datos obtenidos no permiten descartar la validación del QTL en distintos fondos genéticos, pero tampoco confirmarla. De nuevo, la introducción de nuevos marcadores para saturar la región y refinar la posición del QTL podrá determinar la validación o no del mismo.

En la segunda aproximación se han empleado los datos obtenidos en la evaluación de cuatro de las F₂ utilizadas en el Capítulo I. En ellas, además, se han genotipado marcadores de localización conocida, comunes con otros trabajos de nuestro grupo. Mediante análisis ANOVA se ha estudiado la posible relación de cada marcador y por lo tanto de la región que lo contendría con los caracteres en estudio. Los resultados obtenidos son muy preliminares pero sugieren la conservación de algunas regiones en el control de varios caracteres.

Cabe destacar una región del cromosoma V que Cruz-Izquierdo et al. (2012) ya resaltaron en su estudio por su relación con caracteres de floración y que en nuestro trabajo ha resultado asociada con la mayoría de los caracteres. En el cromosoma VII de *M. truncatula*, homólogo del V de habas, Julier et al. (2007) describieron un gran QTL para el carácter fecha de floración y junto a él, otro más pequeño para crecimiento del tallo. Mediante genómica comparativa hemos comprobado como las dos regiones portadoras de estos QTLs son realmente homólogas, reforzando aún más el interés de la zona para futuros estudios.

Los marcadores incluidos en el mapa de la población RIL Vf6 x Vf27 han permitido establecer las homologías correspondientes con la especie modelo para llegar a proponer la hipótesis de QTLs comunes en las dos especies en un ejemplo de cómo la genómica comparativa y la información disponible en la bibliografía sobre la base genética de caracteres agronómicos, en otras especies y en especial en la especie modelo, pueden suponer un salto cualitativo en la investigación en cualquier otra especie, en este caso en habas. Durante el transcurso de nuestro trabajo hemos desarrollado otro ejemplo en el que incluso se proponen genes candidatos para el QTL de “altura de planta” identificado en el cromosoma III de *V. faba* (Cruz-Izquierdo, 2009).

Llegar al gen responsable de cada carácter no es tarea fácil ya que se requerirían estudios adicionales de expresión, silenciamiento génico, etc. Sin embargo, la genómica comparativa también da la oportunidad de saturar las regiones portadoras de QTLs de forma dirigida, aumentando la probabilidad de encontrar marcadores eficientes para la selección y por lo tanto, para la introgresión de genes/QTLs en las nuevas variedades.

Tanto las herramientas como los conocimientos han progresado muy rápido en los últimos años y lo seguirán haciendo en el futuro. El factor limitante para todo tipo de estudios comienza a ser el desarrollo de un material vegetal adecuado. Para una buena parte de los caracteres estudiados en esta Tesis, creemos que hemos obtenido un material valioso del que además tenemos un conocimiento igualmente valioso a la hora de diseñar nuevos estudios. Todo esto, unido a la información obtenida tanto en otros estudios sobre *V. faba* como en otras especies relacionadas, nos ayudará avanzar más rápidamente en la investigación sobre caracteres agronómicos en habas.

BIBLIOGRAFÍA

- Avila CM, Satovic, Z, Sillero JC, Nadal S, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM (2005). QTL detection for agronomic traits in faba bean (*Vicia faba* L.) *Agriculturae Conspectus Scientificus* 70: 65-73.
- Cruz-Izquierdo S (2009). Identificación de genes y QTLs relacionados con la domesticación y el rendimiento en la especie *Vicia faba*. Relaciones de sintenia con otros cultivos relacionados. Tesis doctoral. Departamento de Genética. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes. Universidad de Córdoba.
- Cruz-Izquierdo S, Avila CM, Satovic Z, Palomino C, Gutierrez N, Ellwood SR, Phan HTT, Cubero JI and Torres AM (2012). Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theoretical and Applied Genetics*: 1-16.
- Hobbs SLA, Burnett JH (1982). The genetic control of morphological and yield characters in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics* 62: 9-15.
- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre JB, Prosperi JM, Barre P, Huyghe C (2007). Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphology in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical Applied Genetics* 114: 1391-1406.
- Khazaei H, O'Sullivan DM, Sillanpää MJ, Stoddard FL (2014). Use of synteny to identify candidate genes underlying QTL controlling stomatal traits in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theoretical Applied Genetics* 127: 2371-2385.
- Martin, A., Cubero, J.I. (1979). Inheritance of quantitative characters in *Vicia faba*. Pp. 90-95 in Bond, D.A., Scarascia-Mugnozza, G.T., Poulsen, M.H. (eds.), Some current research on *Vicia faba* in Western Europe. Commission of the European Communities, Luxemburgo.
- Muratova VS (1931) Common beans (*Vicia faba* L.). *Bulletin of Applied Botany of Genetics and Plant Breeding (Suppl)* 50: 248-285.
- Phan HTT, Ellwood SR, Ford R, Thomas S, Oliver RP (2006). Differences in syntenic complexity between *Medicago truncatula* with *Lens culinaris* and *Lupinus albus*. *Functional Plant Biology* 33(8): 775-782.

-
- Pinson SRM, Capdevielle FM, Oard JH (2005). Confirming QTLs and finding additional loci conditioning sheath blight resistance in rice using recombinant inbred lines. *Crop Science*. 45: 503–510.
- Romagosa I, Han F, Ullrich SE, Hayes PM, Wesenber DM (1999). Verification of yield QTL through realized molecular marker-assisted selection responses in a barley cross. *Molecular Breeding* 5: 143-152.
- Ruiz-Rodriguez MD, Avila CM, Torres AM, Fuchs J, Schubert I (2014). Anchoring of genetic linkage maps to the chromosoma complement of *Vicia faba* L. *Molecular Breeding* 33: 743-748.
- Satovic Z, Avila CM, Cruz-Izquierdo S, Díaz-Ruiz R, García-Ruiz GM, Palomino C, Gutiérrez N, Vitale S, Ocaña-Moral S, Gutiérrez MV, Cubero JI and Torres AM (2013). A reference consensus genetic map for molecular markers and economically important traits in faba bean (*Vicia faba* L.) *Genomics* 14:932.
- Schubert I, Rieger R (1991). Catalogue of chromosomal and morphological mutants of Faba bean in the Gatersleben Collection, 1991. *FABIS Newslett* 28/29: 14-22.
- Serradilla JM, De Mora T, Moreno MT (1993). Geographic dispersion and varietal diversity in *Vicia faba* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 40: 143-151.
- Simmonds J, Scott P, Leverington-Waite M, Turner AS, Brinton J, Korzun V, Snape J, Uauy C (2014). Identification and independent validation of a stable yield and thousand grain weight QTL on chromosome 6A of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 14:191.
- Suso MJ y Cubero JI (1986). Changes under domestication in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 364-372.
- Suso MJ, Moreno MT, Cubero JI (1983). Inheritance of leaf characters in *Vicia faba*. *Genet. Agr.* 37: 23-32.
- Suso MJ, Moreno MT, Cubero JI (1984). Inheritance of seed size and seed shape in *V. faba*. *Legume Research* 7(2): 89-94.
- Suso MJ, Moreno MT, Cubero JI (1986). Inheritance of leaf characters in *Vicia faba*. II. Primitive cultivars. *Genet. Agr.* 40: 47-56.

Torres AM, Avila CM, Gutierrez N, Palomino C, Moreno MT, Cubero JI (2010). Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.) Field Crops Research 115: 243–252.

Webb A, Cottage A, Wood T, Khamassi K, Hobbs D, Gostkiewicz K, White M, Khazaei H, Ali M, Street D, Duc G, Stoddard F, Maalouf F, Ogbonnaya FC, Link W, Thomas J and O'Sullivan DM (2015). A SNP-based consensus genetic map for synteny-based trait targeting in faba bean (*Vicia faba* L.). Plant Biotechnology Journal. ISSN 1467-7652 (In Press).

Conclusiones Generales

CONCLUSIONES

1.- Para poder evaluar el potencial de variedades primitivas en la mejora de habas (*Vicia faba* L.) con el fin de ampliar la base genética del cultivo, se han desarrollado poblaciones RILs derivadas de cruzamientos entre los cuatro tipos botánicos que describió Muratova (1931) y algunas formas intermedias. Las poblaciones RIL obtenidas son un material idóneo para la realización de mapas de ligamiento que sirvan para el estudio de la base genética de cada carácter así como para el desarrollo de estrategias de selección asistida por marcadores. Al ser un material fijado, resulta de gran interés para el desarrollo de estudios de interacción genotipo x ambiente de los caracteres de arquitectura de planta y rendimiento. Por último, la caracterización en detalle de estas RILs puede permitir identificar individuos con interés directo para el programa de mejora.

2.- De la evaluación y análisis de las generaciones F_2 y $F_{2:3}$ origen de las citadas poblaciones RIL se ha obtenido una información valiosa de la genética de los caracteres considerados, básica para el planteamiento de futuros trabajos de mejora. Entre otras cosas, nos ha permitido hacer ya una preselección de qué poblaciones pueden ser de mayor interés para cada carácter.

3.- El análisis de componentes principales indica que no existen bloques génicos que expliquen la arquitectura genética de las poblaciones. Este hecho es de gran importancia para los programas de mejora de la especie ya que implica la posibilidad de trabajar con cada carácter de manera independiente sin el inconveniente que pueden representar las posibles respuestas correlacionadas.

4.- El estudio preliminar de la herencia de los caracteres sugiere, como habían hecho otros trabajos previamente, que la clasificación de las habas en distintos tipos botánicos realizada por Muratova en 1931, no se basa en diferentes estructuras génicas sino en diferentes criterios de selección a nivel regional y, por lo tanto, no tiene entidad botánica.

5. Los grupos de ligamiento asignados hasta el momento al cromosoma I, y que habían sido denominados como IB en distintos trabajos del grupo, han podido ser asignados físicamente al cromosoma IV de *V. faba*. Esta información ha permitido cerrar el cuadro de homologías entra los cromosomas de habas y los del resto de las leguminosas ya que este era el único cromosoma al que no se habían asignado grupos de ligamiento hasta el momento.

6. Se han validado QTLs relacionados con los caracteres de arquitectura y rendimiento de habas en distintas condiciones ambientales a través de la evaluación y análisis de la población RIL Vf6 x Vf27 durante dos campañas adicionales a las dos ya estudiadas en trabajos previos de nuestro grupo. Como en trabajos precedentes, se ha corroborado la acumulación de QTLs en regiones concretas del mapa. Todavía hay que discernir si en estas zonas hay un único gen de efectos pleiotrópicos sobre varios caracteres o si, por el contrario, se trata de una acumulación de genes muy cercanos unos de otros y responsables de cada uno de los caracteres.

7. Se han validado QTLs para algunos caracteres en distintos fondos genéticos utilizando dos aproximaciones distintas. En primer lugar, la existencia de marcadores comunes en distintos trabajos de mapeo y de análisis de QTLs para caracteres agronómicos en *Vicia faba*, ha permitido la comparación de resultados y con ella la validación de parte de los mismos. En segundo lugar a través del genotipado y fenotipado de cuatro de las poblaciones F₂ utilizadas en el trabajo también se han obtenido indicios sobre regiones conservadas en distintas poblaciones de la especie e incluso sobre nuevas regiones que podrían estar asociadas a algunos de los caracteres. Este tipo de validación es especialmente importante para las estrategias de selección asistida por marcadores (MAS) ya que pueden implicar que los marcadores que se desarrollen sean útiles en una mayor cantidad de materiales del programa de mejora.

8. Entre las distintas regiones relacionadas con los caracteres en estudio, cabe destacar una en el cromosoma V de habas que ha resultado homóloga de otra región del cromosoma VII de la especie modelo *Medicago truncatula* en la que se ha detectado un QTL para fecha de floración y otro para el crecimiento de planta. En *V. faba* esta región ya había sido asociada al carácter de floración en un trabajo previo pero, además, en el nuestro parece estar asociada a gran parte de los caracteres evaluados. Todo lo expuesto refuerza el interés de la zona para futuros estudios.

9. Mediante genómica comparativa también se ha llegado a la designación de genes candidatos para el QTL de “altura de planta” identificado en el cromosoma III de *V. faba*.

10. Las estrategias seguidas no sólo pueden ser útiles para la identificación de los genes responsables de cada carácter sino que también pueden servir para la saturación dirigida de las regiones de interés y, por lo tanto, para la obtención de marcadores útiles en programas de mejora convencionales.

ANEXO I

Análisis de PCA de las poblaciones F_2 y $F_{2:3}$

INDICE ANEXO I**Cruzamiento Vf417 x Vf172 (F₂) 193**

Tabla 1: Varianza total explicada

Tabla 2: Matriz de componenetes principales

Figura 1: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417xVf172, generación F₂

Cruzamiento Vf422 x Vf172 (F₂) 194

Tabla 3: Varianza total explicada

Tabla 4: Matriz de componenetes principales

Figura 2: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422xVf172, generación F₂

Cruzamiento Vf937 x Vf172 (F₂) 195

Tabla 5: Varianza total explicada

Tabla 6: Matriz de componenetes principales

Figura 3: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf172, generación F₂

Cruzamiento Vf751 x Vf1809 (F₂) 196

Tabla 7: Varianza total explicada

Tabla 8: Matriz de componenetes principales

Figura 4: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751xVf1809, generación F₂

Cruzamiento Vf1809 x Vf751 (F₂) 197

Tabla 9: Varianza total explicada

Tabla 10: Matriz de componenetes principales

Figura 5: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf1809xVf751, generación F₂

Cruzamiento Vf751 x Vf417 (F₂) 198

Tabla 11: Varianza total explicada

Tabla 12: Matriz de componenetes principales

Figura 6: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751xVf417, generación F₂

Cruzamiento Vf422 x Vf751 (F₂)	199
Tabla 13: Varianza total explicada	
Tabla 14: Matriz de componenetes principales	
Figura 7: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422xVf751, generación F ₂	
Cruzamiento Vf751 x Vf422 (F₂)	200
Tabla 15: Varianza total explicada	
Tabla 16: Matriz de componenetes principales	
Figura 8: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751xVf422, generación F ₂	
Cruzamiento Vf1809 x Vf422 (F₂)	201
Tabla 17: Varianza total explicada	
Tabla 18: Matriz de componenetes principales	
Figura 9: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf1809xVf422, generación F ₂	
Cruzamiento Vf937 x Vf751 (F₂)	202
Tabla 19: Varianza total explicada	
Tabla 20: Matriz de componenetes principales	
Figura 10: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf751, generación F ₂	
Cruzamiento Vf937 x Vf417 (F₂)	203
Tabla 21: Varianza total explicada	
Tabla 22: Matriz de componenetes principales	
Figura 11: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf417, generación F ₂	
Cruzamiento Vf417 x Vf937 (F₂)	204
Tabla 23: Varianza total explicada	
Tabla 24: Matriz de componenetes principales	
Figura 12: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417xVf937, generación F ₂	

Cruzamiento Vf937 x Vf422 (F_2)	205
Tabla 25: Varianza total explicada	
Tabla 26: Matriz de componenetes principales	
Figura 13: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf422, generación F_2	
Cruzamiento Vf422 x Vf937 (F_2)	206
Tabla 27: Varianza total explicada	
Tabla 28: Matriz de componenetes principales	
Figura 14: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422xVf937, generación F_2	
Cruzamiento Vf417 x Vf172 ($F_{2:3}$)	207
Tabla 29: Varianza total explicada	
Tabla 30: Matriz de componenetes principales	
Figura 15: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417xVf172, generación $F_{2:3}$	
Cruzamiento Vf422 x Vf172 ($F_{2:3}$)	208
Tabla 31: Varianza total explicada	
Tabla 32: Matriz de componenetes principales	
Figura 16: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422xVf172, generación $F_{2:3}$	
Cruzamiento Vf937 x Vf172 ($F_{2:3}$)	209
Tabla 33: Varianza total explicada	
Tabla 34: Matriz de componenetes principales	
Figura 17: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf172, generación $F_{2:3}$	
Cruzamiento Vf751 x Vf422 ($F_{2:3}$)	210
Tabla 35: Varianza total explicada	
Tabla 36: Matriz de componenetes principales	
Figura 18: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751xVf422, generación $F_{2:3}$	

Cruzamiento Vf937 x Vf751 ($F_{2:3}$)	211
Tabla 37: Varianza total explicada	
Tabla 38: Matriz de componenetes principales	
Figura 19: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf751, generación $F_{2:3}$	
Cruzamiento Vf937 x Vf417 ($F_{2:3}$)	212
Tabla 39: Varianza total explicada	
Tabla 40: Matriz de componenetes principales	
Figura 20: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf417, generación $F_{2:3}$	
Cruzamiento Vf417 x Vf937 ($F_{2:3}$)	213
Tabla 41: Varianza total explicada	
Tabla 42: Matriz de componenetes principales	
Figura 21: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417xVf937, generación $F_{2:3}$	
Cruzamiento Vf937 x Vf422 ($F_{2:3}$)	214
Tabla 43: Varianza total explicada	
Tabla 44: Matriz de componenetes principales	
Figura 22: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937xVf422, generación $F_{2:3}$	
Cruzamiento Vf422 x Vf937 ($F_{2:3}$)	215
Tabla 45: Varianza total explicada	
Tabla 46: Matriz de componenetes principales	
Figura 23: Scaterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422xVf937, generación $F_{2:3}$	

CRUZAMIENTO: Vf417 x Vf172 (F₂)**(Em x P)****Tabla 1:** Varianza total explicada

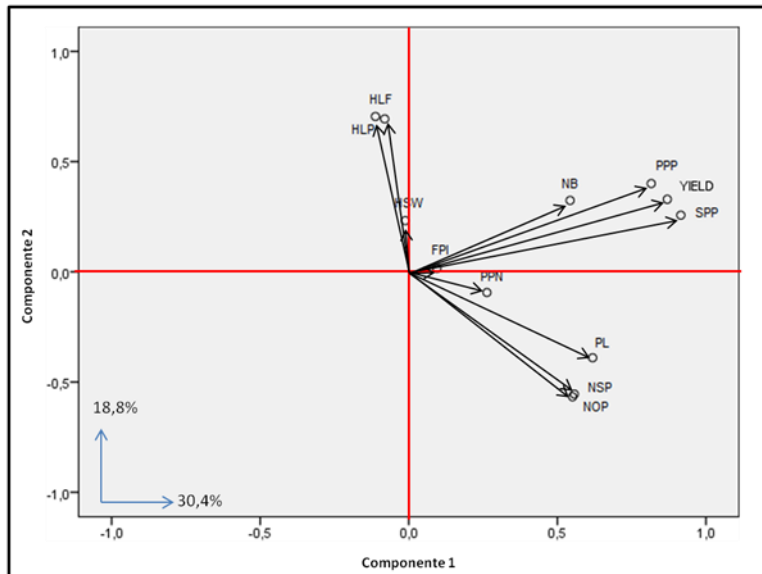
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,649	30,140	30,410
2	2,262	18,846	49,256
3	1,714	14,281	63,538
4	1,266	10,552	74,089
5	1,161	9,677	83,766
6	0,754	6,285	90,051

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 2: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,081	,694	,679	,063	,065
HLP	-,112	,705	,664	,027	,115
NB	,543	,324	,013	-,101	-,486
FPI	,095	,016	-,039	-,125	,885
PPN	,263	-,094	-,029	-,688	,198
PPP	,816	,400	-,282	-,142	,022
NOP	,557	-,555	,475	,135	-,068
NSP	,551	-,567	,487	,076	-,034
PL	,619	-,390	,246	,323	,223
HSW	-,012	,232	-,361	,759	,162
SPP	,915	,257	-,117	-,094	-,001
YIELD	,870	,329	-,251	,171	,058

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 1:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417 x Vf172, generación F₂

CRUZAMIENTO: Vf422 x Vf172 (F₂)

(Eq x P)

Tabla 3: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,813	31,772	31,772
2	2,181	18,173	49,945
3	1,805	15,038	64,983
4	1,078	8,984	73,967
5	,926	7,719	81,686
6	,789	6,574	88,260
7	,511	4,255	92,515

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 4: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,057	,748	,583	-,123	-,189
HLP	,055	,797	,489	-,158	-,204
NB	,614	-,192	,454	,274	,230
FPI	-,011	,495	,102	,301	,697
PPN	-,264	-,269	,450	-,008	,348
PPP	,723	-,351	,275	-,018	-,218
NOP	,680	,290	-,440	-,231	,080
NSP	,631	,445	-,423	-,177	,190
PL	,591	,244	-,479	,161	-,040
HSW	-,100	,282	-,149	,851	-,300
SPP	,904	-,237	,243	-,051	,028
YIELD	,894	-,178	,221	,185	-,076

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

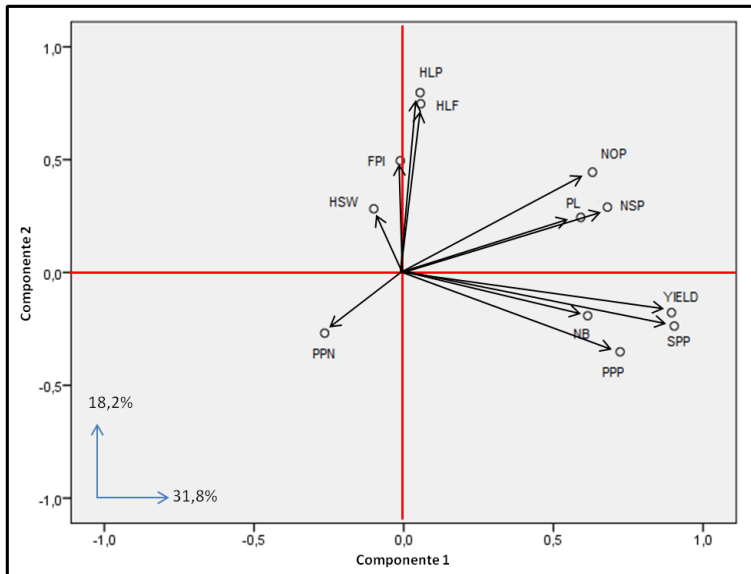


Figura 2: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422 x Vf172, generación F₂

CRUZAMIENTO Vf937 X Vf172 (F₂)

(Mj x P)

Tabla 5: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,223	26,861	26,861
2	2,435	20,288	47,148
3	1,750	14,584	61,732
4	1,181	9,840	71,572
5	,997	8,308	79,881
6	,945	7,879	87,760
7	,603	5,022	92,781

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

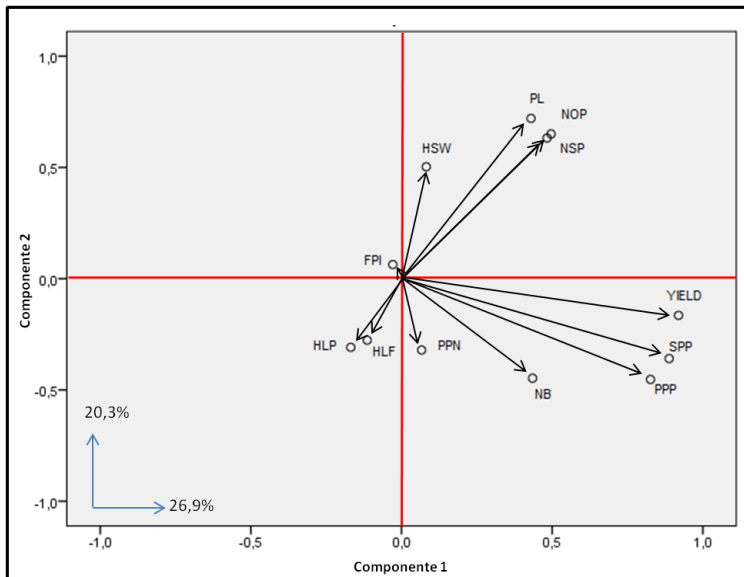


Figura 3: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf172, generación F₂

Tabla 6: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,114	-,276	,882	,079	,019
HLP	-,169	-,309	,868	,028	,077
NB	,435	-,447	-,031	,415	,158
FPI	-,029	,064	-,034	-,232	,952
PPN	,067	-,321	-,002	,601	-,013
PPP	,826	-,453	-,068	-,120	-,018
NOP	,496	,650	,230	-,038	-,121
NSP	,483	,632	,356	-,196	-,047
PL	,430	,720	,164	,158	,060
HSW	,082	,503	-,065	,676	,185
SPP	,888	-,359	-,013	-,210	-,022
YIELD	,919	-,165	-,026	,068	,055

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf751 x Vf1809 (F₂) (mm x m)

Tabla 7: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,373	28,105	28,105
2	2,447	20,392	48,497
3	1,947	16,227	64,723
4	1,151	9,590	74,313
5	1,081	9,007	83,320
6	,710	5,915	89,235
7	,563	4,695	93,930

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 8: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,063	,776	,361	-,227	,300
HLP	,053	,740	,468	-,143	,298
NB	-,326	-,585	-,219	,224	,230
FPI	-,261	,005	-,081	,459	,688
PPN	,241	-,367	,186	-,602	-,114
PPP	,568	-,560	,402	-,069	,275
NOP	,687	,328	-,481	-,012	,013
NSP	,749	,250	-,546	,099	-,014
PL	,795	,203	-,425	,087	,022
HSW	,232	,210	,563	,573	-,427
SPP	,748	-,458	,195	-,119	,312
YIELD	,730	-,206	,531	,303	-,082

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

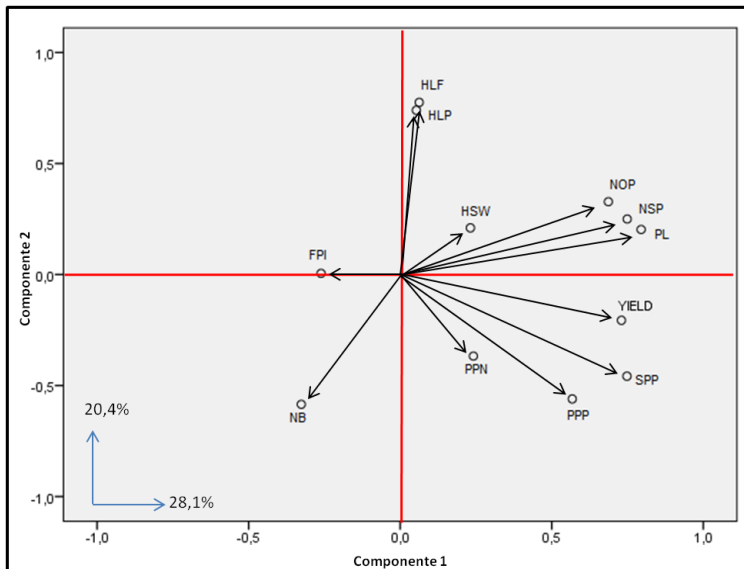


Figura 4: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751 x Vf1809, generación F₂

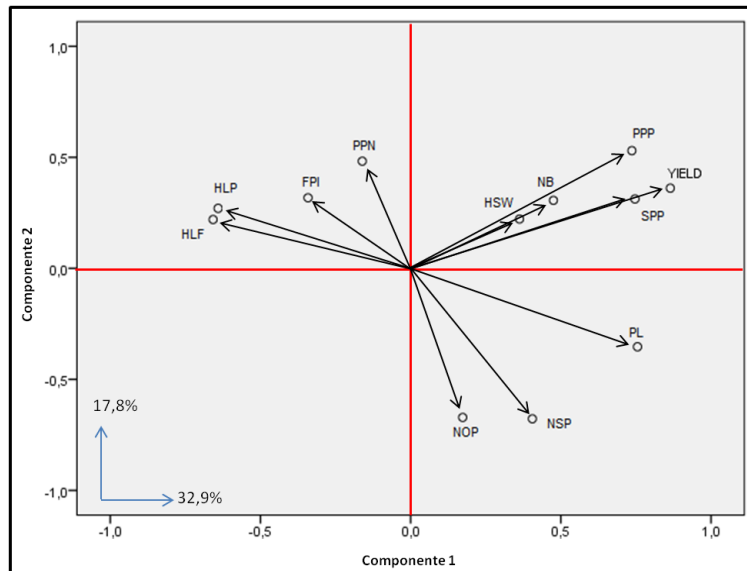
CRUZAMIENTO Vf1809 x Vf751 (F₂)

(m x mm)

Tabla 9: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,955	32,956	32,956
2	2,142	17,849	50,805
3	1,589	13,241	64,046
4	1,096	9,129	73,175
5	,983	8,191	81,366
6	,797	6,638	88,005
7	,596	4,968	92,973

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

**Figura 5:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf1809 x Vf751, generación F₂**Tabla 10:** Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,658	,220	,596	,233	,142
HLP	-,641	,270	,494	,412	,103
NB	,475	,306	,158	,423	-,328
FPI	-,342	,318	,396	-,509	,450
PPN	-,161	,483	,175	,135	-,363
PPP	,736	,530	,156	-,161	,052
NOP	,173	-,671	,459	-,098	,128
NSP	,405	-,678	,416	,128	-,009
PL	,755	-,353	,255	,271	,102
HSW	,362	,222	-,379	,431	,652
SPP	,747	,312	,387	-,322	-,152
YIELD	,864	,361	,104	,032	,179

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf751 x Vf417 (F₂) (mm x Em)**Tabla 11:** Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,677	30,641	30,641
2	2,779	23,157	53,798
3	1,439	11,992	65,790
4	1,290	10,751	76,541
5	,926	7,714	84,255
6	,669	5,578	89,833
7	,504	4,204	94,037

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

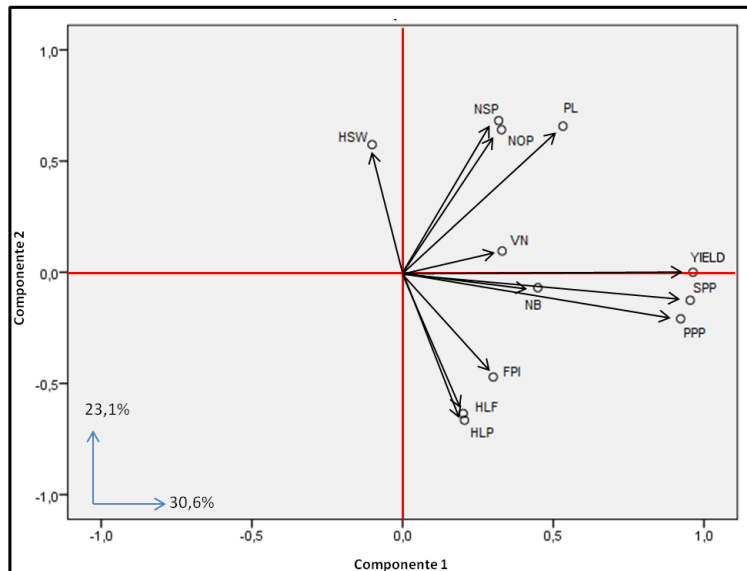


Figura 6: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751 x Vf417, generación F₂

Tabla 12: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,201	-,635	,649	,101	-,079
HLP	,205	-,665	,541	,116	-,196
NB	,954	-,126	-,145	-,134	-,135
FPI	,532	,657	,097	-,208	-,182
PPN	,330	,095	,152	,832	,072
PPP	,923	-,210	-,144	-,091	-,148
NOP	-,101	,574	-,055	,612	-,313
NSP	,301	-,471	-,095	,086	,653
PL	,328	,641	,465	-,106	,330
HSW	,449	-,070	-,452	,319	,276
SPP	,319	,682	,444	-,086	,262
YIELD	,964	,000	-,145	-,043	-,155

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf422 x Vf751 (F₂) (Eq x mm)

Tabla 13: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,361	28,008	28,008
2	2,435	20,289	48,297
3	1,719	14,328	62,624
4	1,295	10,788	73,413
5	,985	8,209	81,622
6	,728	6,067	87,689
7	,605	5,045	92,734

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

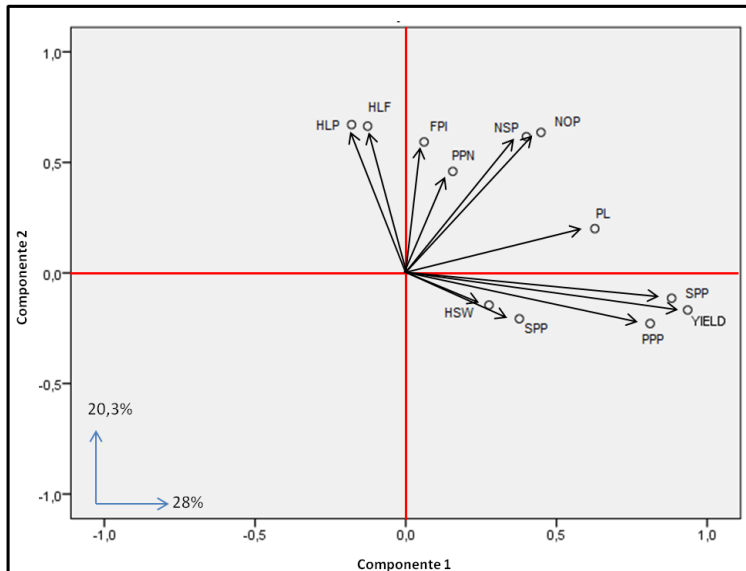


Figura 7: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422 x Vf751, generación F₂

Tabla 14: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,126	,664	-,432	,372	,027
HLP	-,180	,671	-,161	,575	-,093
NB	,377	-,207	,055	,638	-,254
FPI	,061	,593	,151	,097	,393
PPN	,156	,459	-,332	-,296	,572
PPP	,811	-,229	-,468	-,061	,113
NOP	,449	,636	,336	-,157	-,272
NSP	,400	,616	,124	-,444	-,401
PL	,627	,200	,574	,023	,038
HSW	,276	-,145	,726	,276	,419
SPP	,882	-,114	-,395	,039	-,038
YIELD	,935	-,167	-,102	,132	,058

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf751 x Vf422 (F₂) (mm x Eq)

Tabla 15: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	4,052	33,768	33,768
2	2,178	18,147	51,915
3	1,766	14,719	66,634
4	1,273	10,612	77,246
5	,787	6,562	83,808
6	,607	5,057	88,866
7	,506	4,218	93,083

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

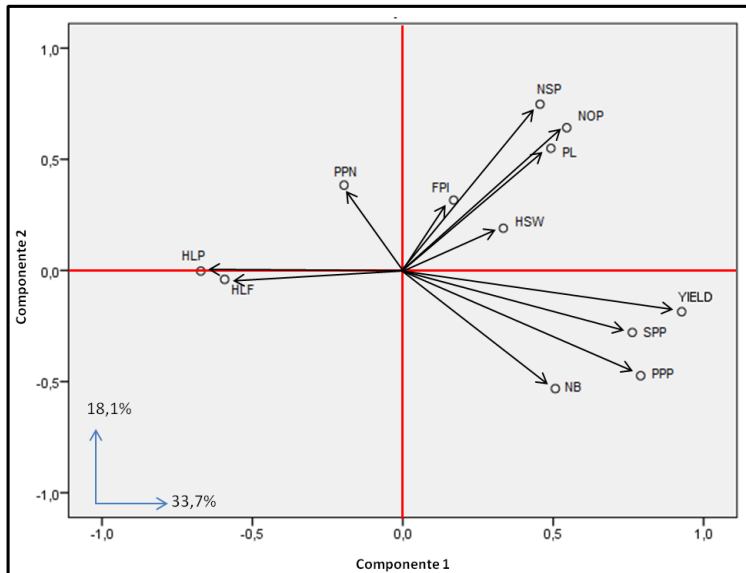


Figura 8: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751 x Vf422, generación F₂

Tabla 16: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,592	-,040	,686	,088	,074
HLP	-,672	-,003	,643	,045	,078
NB	,507	-,532	,139	,247	,303
FPI	,169	,316	,673	,239	-,106
PPN	-,195	,384	-,010	-,522	,716
PPP	,791	-,474	,236	-,064	,158
NOP	,545	,642	,076	-,077	-,121
NSP	,456	,748	-,178	-,021	-,006
PL	,492	,549	,424	,020	-,014
HSW	,334	,190	-,180	,805	,320
SPP	,763	-,279	,291	-,463	-,126
YIELD	,927	-,186	,144	-,010	,043

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf1809 x Vf422 (F₂) (m x Eq)

Tabla 17: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,205	26,709	26,709
2	2,010	16,751	43,460
3	1,757	14,643	58,103
4	1,153	9,608	67,711
5	1,008	8,397	76,108
6	,947	7,894	84,002
7	,816	6,800	90,802

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

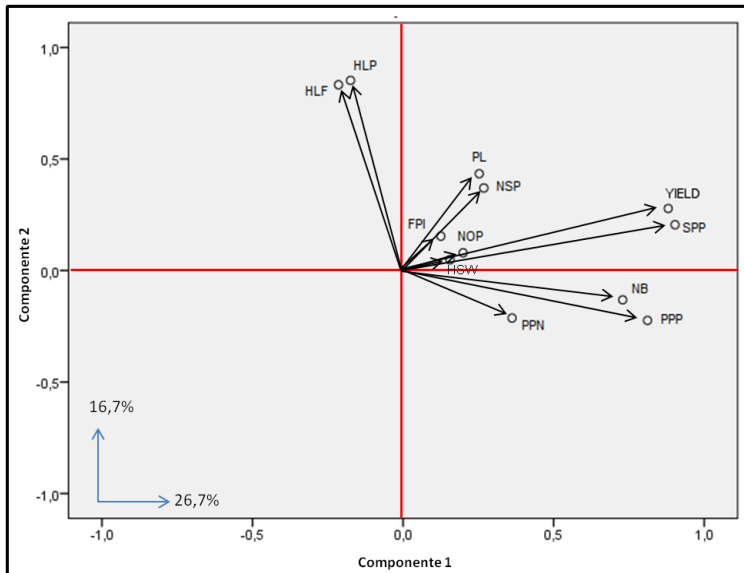


Figura 9: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf1809 x Vf422, generación F₂

Tabla 18: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,215	,833	-,431	-,004	,011
HLP	-,174	,852	-,398	-,053	,045
NB	,729	-,131	-,088	,044	,238
FPI	,126	,154	,147	,578	-,338
PPN	,362	-,213	-,184	-,595	-,008
PPP	,812	-,224	-,382	,012	-,080
NOP	,199	,080	-,222	-,059	,723
NSP	,268	,370	,677	-,366	-,089
PL	,253	,434	,723	-,225	,087
HSW	,156	,048	,393	,485	,489
SPP	,903	,205	-,137	,019	-,198
YIELD	,881	,278	,004	,188	-,105

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf937 x Vf751 (F₂) (Mj x mm)

Tabla 19: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	4,425	40,228	40,228
2	1,849	16,808	57,036
3	1,426	12,965	70,001
4	,989	8,991	78,992
5	,659	5,988	84,980
6	,489	4,446	89,426
7	,371	3,374	92,799

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 20: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,005	,708	,525	,133	,139
HLP	-,206	,690	,301	,467	,078
NB	,556	,531	-,450	-,012	-,097
FPI	,502	,401	-,337	-,363	,387
PPP	,590	,460	-,481	-,066	-,221
NOP	,706	-,196	,226	-,124	,476
NSP	,822	-,130	,372	-,152	-,106
PL	,801	-,220	,110	,115	,147
HSW	,484	-,303	-,382	,681	,164
SPP	,812	,070	,395	-,157	-,298
YIELD	,874	-,127	,089	,278	-,225

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

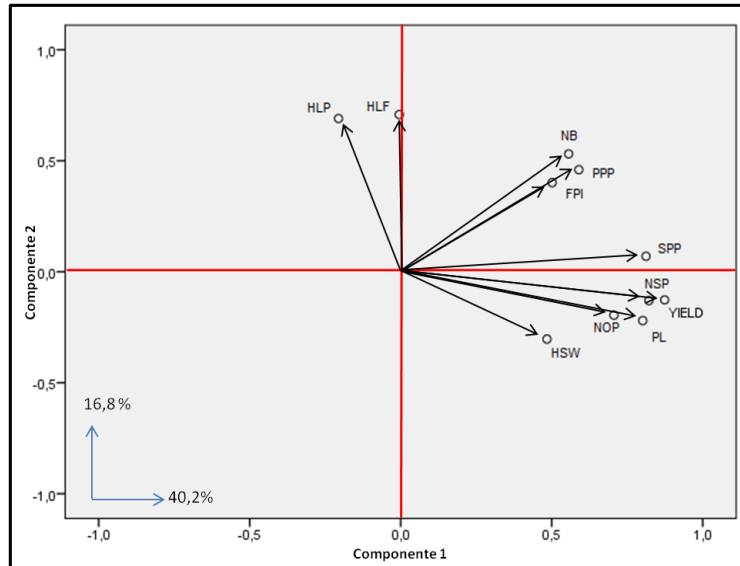


Figura 10: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf751, generación F₂

CRUZAMIENTO Vf937 x Vf417 (F₂) (Mj x Em)

Tabla 21: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,631	30,260	30,260
2	2,487	20,724	50,984
3	1,785	14,871	65,855
4	,995	8,293	74,148
5	,922	7,680	81,828
6	,753	6,278	88,106
7	,565	4,711	92,817

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 22: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,134	,403	,789	,266	-,158
HLP	-,026	,490	,798	,096	-,084
NB	,440	,274	-,171	,391	,504
FPI	,494	-,021	,441	-,177	,430
PPN	-,297	,266	,174	-,628	,500
PPP	,755	,519	-,236	,038	,014
NOP	,495	-,632	,257	-,195	-,150
NSP	,659	-,439	,199	-,277	-,128
PL	,471	-,707	,281	,106	,037
HSW	-,193	-,641	,118	,446	,383
SPP	,880	,385	-,114	-,035	-,115
YIELD	,897	,129	-,060	,093	-,003

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

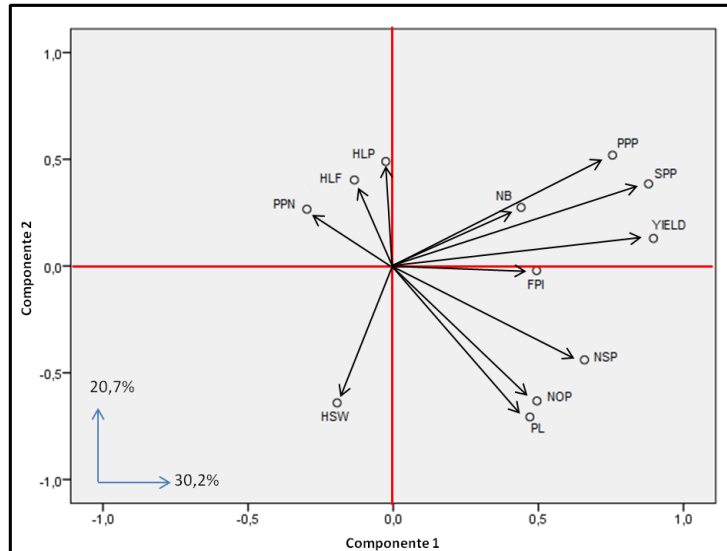


Figura 11: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf417, generación F₂

CRUZAMIENTO Vf417 x Vf937 (F₂) (Em x Mj)

Tabla 23: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	4,050	33,749	33,749
2	2,289	19,079	52,828
3	1,450	12,084	64,913
4	1,094	9,120	74,033
5	1,007	8,393	82,425
6	,930	7,746	90,171

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

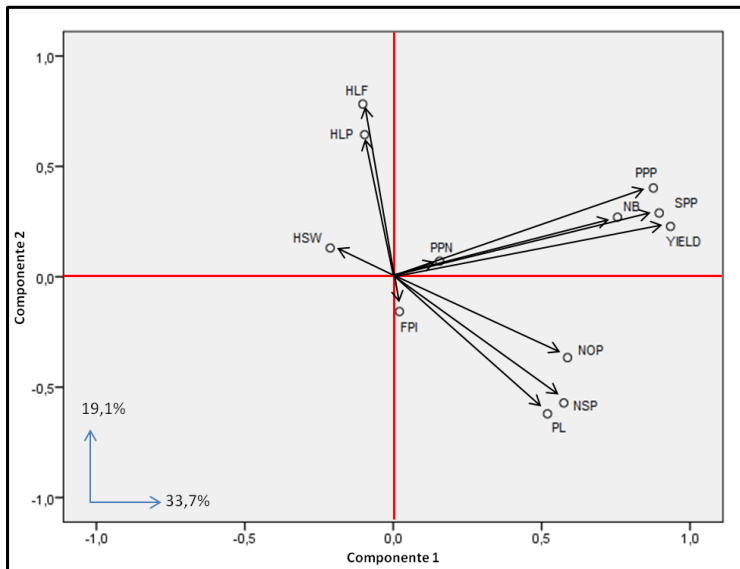


Figura 12: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417 x Vf937, generación F₂

Tabla 24: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,103	,782	,345	,363	-,002
HLP	-,096	,644	,649	,105	,120
NB	,756	,270	-,165	-,223	-,082
FPI	,021	-,158	,176	-,238	,931
PPN	,156	,071	-,309	,754	,242
PPP	,876	,402	-,210	-,060	-,003
NOP	,587	-,366	,140	,425	-,037
NSP	,575	-,572	,415	,068	-,060
PL	,520	-,621	,475	,113	-,067
HSW	-,212	,130	,531	-,197	-,215
SPP	,934	,228	-,081	-,096	,061
YIELD	,896	,289	,080	-,161	,007

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf937 x Vf422 (F₂) (Mj xEq)

Tabla 25: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,650	30,416	30,416
2	2,499	20,823	51,239
3	1,710	14,250	65,488
4	1,290	10,754	76,242
5	,962	8,020	84,262
6	,782	6,520	90,782

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 26: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,178	,761	,451	,182	-,319
HLP	,178	,793	,373	,188	-,335
NB	,718	-,009	-,018	,249	-,037
FPI	,189	,137	,217	,560	,479
PPN	-,223	,381	,248	,195	,624
PPP	,827	,282	-,363	-,127	,174
NOP	,382	-,419	,711	-,262	,104
NSP	,478	-,383	,660	-,323	,082
PL	,520	-,588	,172	,347	-,233
HSW	-,049	-,579	-,072	,686	-,122
SPP	,907	,207	-,261	-,159	,108
YIELD	,912	-,013	-,288	,055	-,015

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

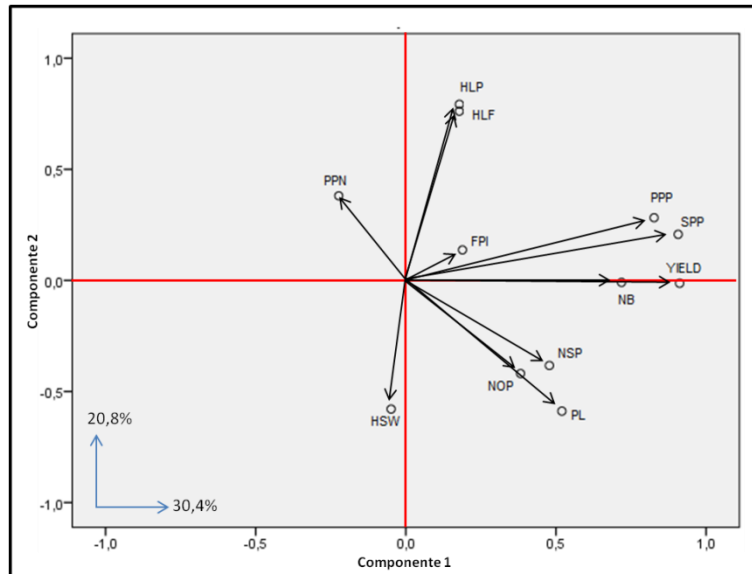


Figura 13: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf422, generación F₂

CRUZAMIENTO Vf422 x Vf937 (F₂) (Eq x Mj)

Tabla 27: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,817	31,811	31,811
2	2,106	17,550	49,360
3	1,660	13,836	63,196
4	1,357	11,307	74,503
5	,984	8,202	82,704
6	,611	5,094	87,798
7	,555	4,623	92,421

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

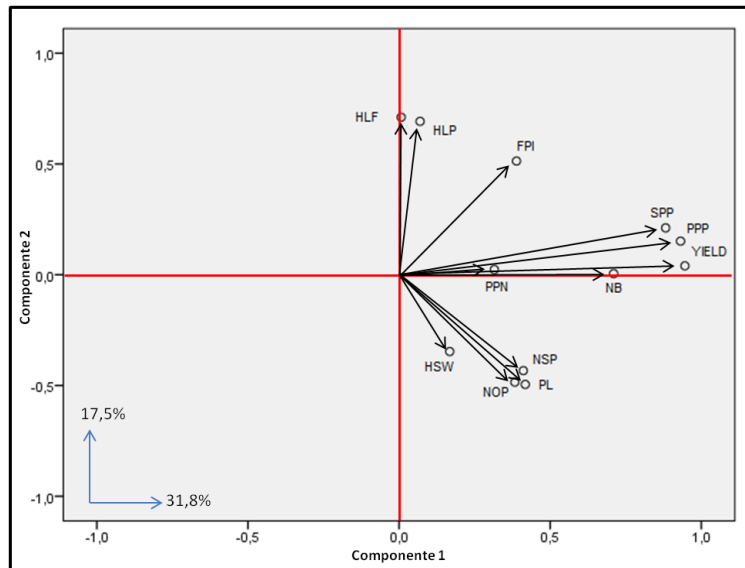


Figura 14: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422 x Vf937, generación F₂

Tabla 28: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,007	,711	,476	,225	,167
HLP	,069	,692	,440	,382	,058
NB	,710	,005	-,198	-,014	-,102
FPI	,389	,513	,258	-,073	-,377
PPN	,315	,023	-,162	,106	,868
PPP	,882	,211	-,258	-,124	-,018
NOP	,383	-,485	,681	-,134	,009
NSP	,411	-,433	,617	-,344	,084
PL	,418	-,495	,313	,554	,007
HSW	,168	-,347	-,194	,808	-,193
SPP	,931	,152	-,157	-,164	-,014
YIELD	,946	,040	-,192	,068	-,042

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf417 x Vf172 (F_{2:3})**(Em x P)****Tabla 29:** Varianza total explicada

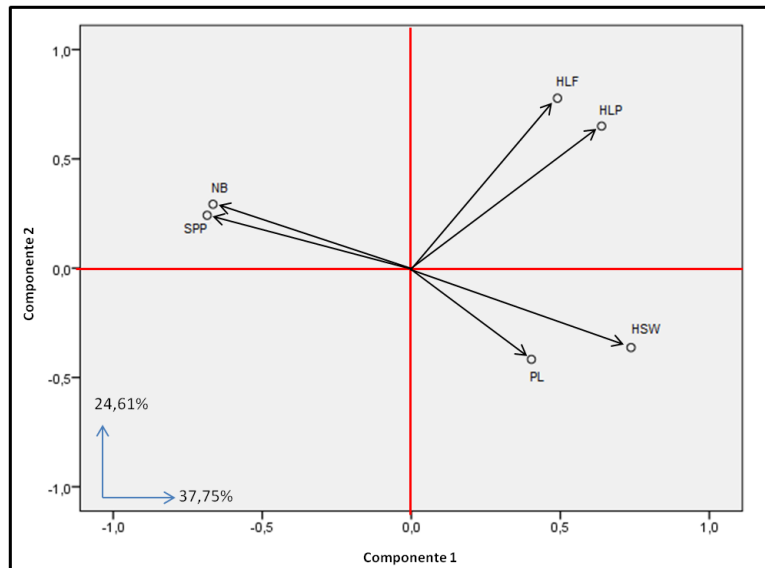
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,265	37,755	37,755
2	1,477	24,616	62,371
3	1,276	21,271	83,642
4	,392	6,535	90,177

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 30: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,490	,777	,114	-,202	,108
HLP	,638	,650	,119	,181	-,177
NB	-,665	,292	,520	,422	,100
PPP	-,685	,242	,536	-,368	,064
PL	,403	-,417	,737	-,052	-,317
HSW	,737	-,363	,386	,045	,404

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 15:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417 x Vf172, generación F_{2:3}

CRUZAMIENTO Vf422 x Vf172 (F_{2:3})

(Eq x P)

Tabla 31: Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	1,870	26,708	26,708
2	1,724	24,625	51,333
3	1,585	22,640	73,972
4	,923	13,187	87,159
5	,389	5,560	92,720

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 32: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,760	-,394	,101	,351	,249
HLP	,872	-,229	,026	,205	-,243
NB	-,185	,157	,840	,287	-,358
FPI	,535	-,050	,201	-,795	-,127
PPP	-,079	-,122	,900	-,116	,334
PL	,352	,848	,109	-,061	,099
HSW	,285	,868	-,068	,159	,056

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

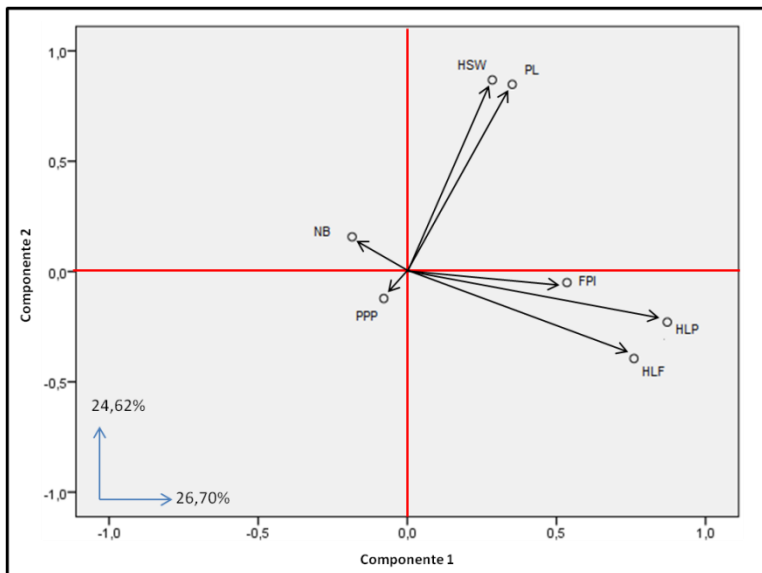


Figura 16: Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422 x Vf172, generación F_{2:3}

CRUZAMIENTO Vf937 x Vf172 (F_{2:3})**(Mj x P)****Tabla 33:** Varianza total explicada

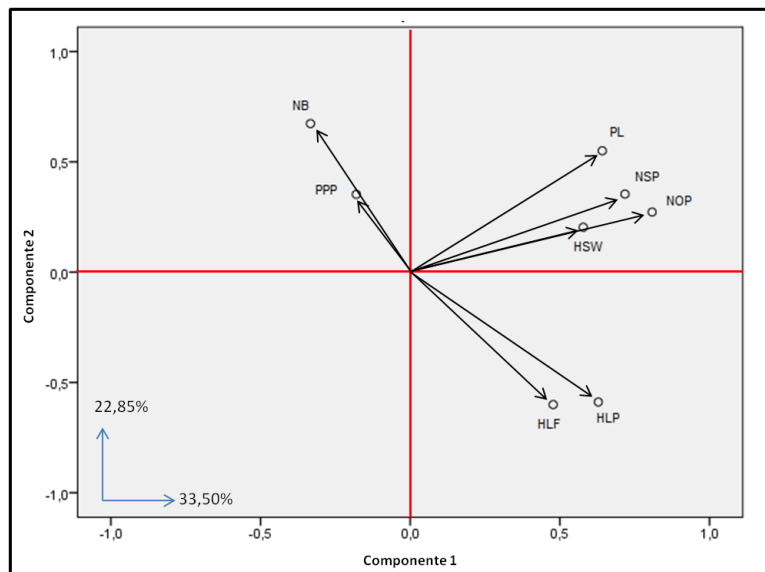
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,680	33,505	33,505
2	1,828	22,854	56,359
3	1,386	17,322	73,681
4	1,121	14,011	87,692
5	,405	5,061	92,753

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 34: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,478	-,600	,483	,199	,156
HLP	,628	-,589	,281	,169	,135
NB	-,333	,673	,480	,088	,427
PPP	-,180	,353	,721	,423	-,368
NOP	,808	,272	,122	-,399	-,130
NSP	,718	,354	,277	-,450	-,045
PL	,642	,550	-,332	,262	,147
HSW	,578	,203	-,349	,660	-,070

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 17:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf172, generación F_{2:3}

CRUZAMIENTO Vf751 x Vf422 (F_{2:3})**(mm x Eq)****Tabla 35:** Varianza total explicada

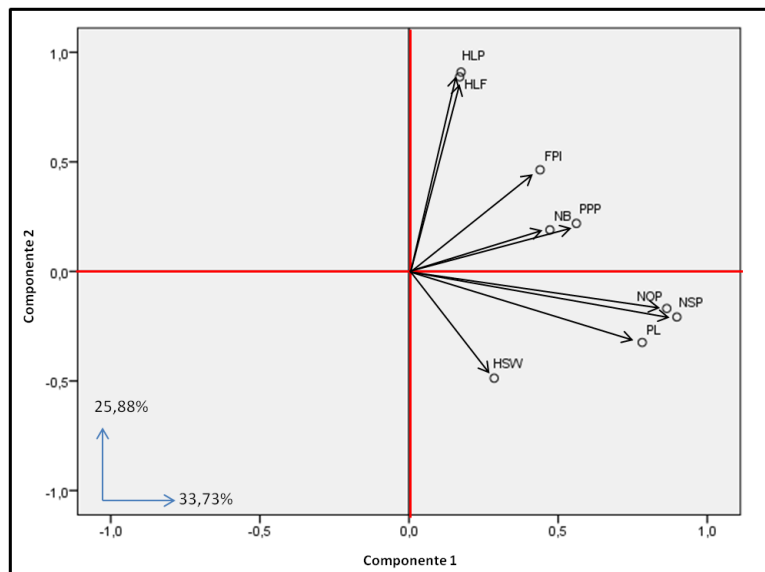
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,036	33,736	33,736
2	2,330	25,891	59,628
3	1,853	20,590	80,218
4	,662	7,359	87,577
5	,550	6,107	93,684

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 36: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,171	,911	,236	,178	-,115
HLP	,166	,890	,269	,246	-,088
NB	,474	,186	-,762	,142	,225
FPI	,438	,468	,475	-,443	,379
PPP	,562	,217	-,704	,045	,209
NOP	,865	-,166	,141	-,241	-,238
NSP	,899	-,208	,015	-,177	-,164
PL	,781	-,321	,199	,386	-,159
HSW	,285	-,483	,603	,336	,427

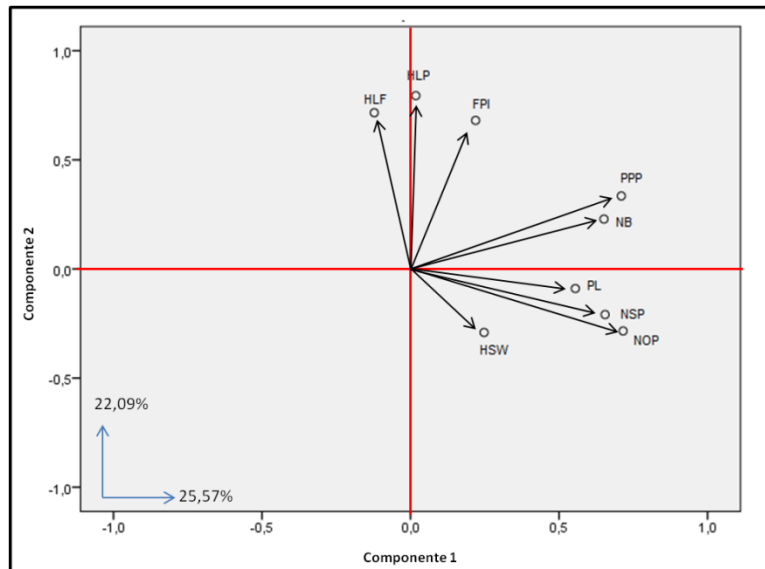
Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 18:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf751 x Vf422, generación F_{2:3}

CRUZAMIENTO Vf937 x Vf751 (F_{2:3})**(Mj x mm)****Tabla 37:** Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,302	25,575	25,575
2	1,988	22,092	47,666
3	1,423	15,811	63,477
4	,858	9,530	73,007
5	,691	7,682	80,689
6	,610	6,781	87,470
7	,496	5,508	92,977

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

**Figura 19:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf751, generación F_{2:3}**Tabla 38:** Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,122	,716	,448	-,243	-,124
HLP	,018	,794	,328	-,125	-,248
NB	,651	,229	-,529	-,145	,020
FPI	,219	,681	-,104	,406	,340
PPP	,710	,335	-,210	-,057	,257
NOP	,716	-,284	-,020	-,356	-,155
NSP	,655	-,209	,476	-,175	-,050
PL	,555	-,090	,158	,652	-,449
HSW	,248	-,291	,726	,105	,452

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

CRUZAMIENTO Vf937 x Vf417 (F_{2:3})**(Mj x Em)****Tabla 39:** Varianza total explicada

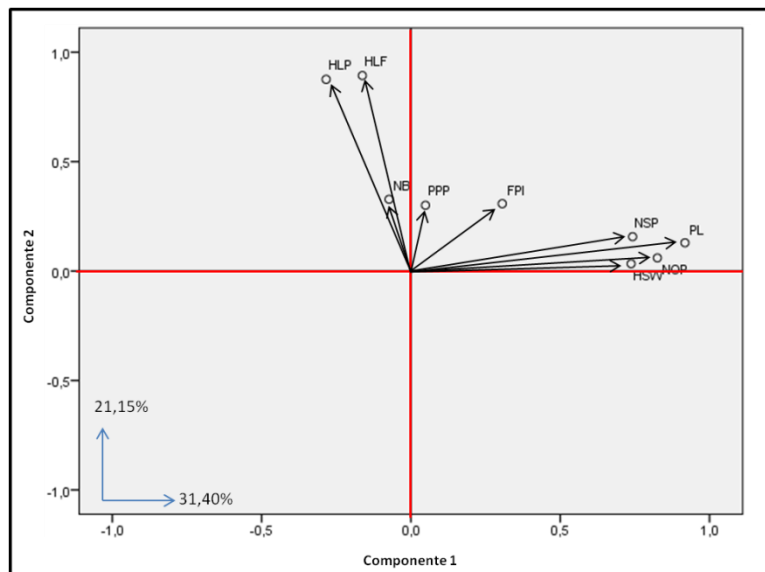
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,826	31,400	31,400
2	1,903	21,150	52,550
3	1,408	15,644	68,195
4	,925	10,278	78,473
5	,861	9,568	88,041

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 40: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	-,162	,893	-,194	-,200	-,127
HLP	-,284	,876	-,232	-,131	,003
NB	-,071	,329	,486	,232	,754
FPI	,306	,307	,069	,802	-,367
PPP	,051	,301	,792	-,030	-,192
NOP	,825	,060	-,346	,108	,183
NSP	,742	,155	-,392	,029	,214
PL	,918	,129	,198	-,149	-,043
HSW	,737	,034	,368	-,368	-,155

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 20:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf417, generación F_{2:3}

CRUZAMIENTO Vf417 x Vf937 (F_{2:3})**(Em x Mj)****Tabla 41:** Varianza total explicada

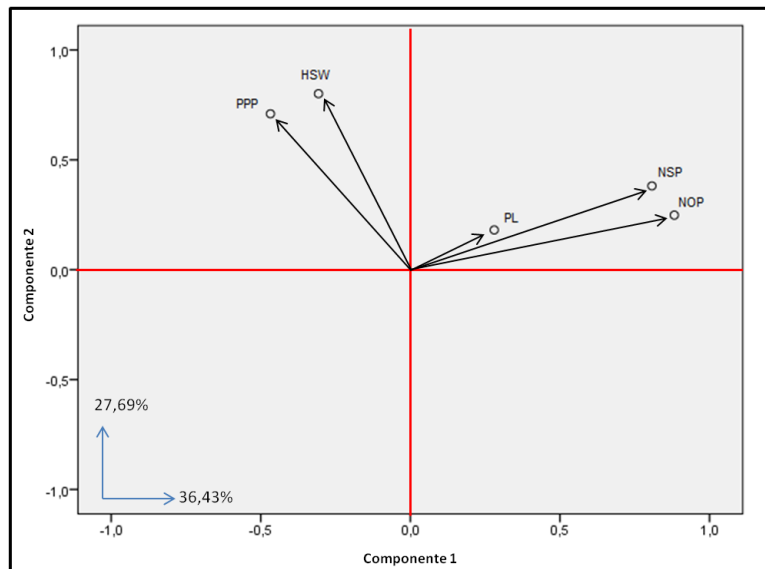
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	1,822	36,435	36,435
2	1,385	27,696	64,130
3	,960	19,199	83,329
4	,544	10,886	94,215

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 42: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
PPP	-,468	,709	-,044	,521	,067
NOP	,882	,248	-,102	,005	,387
NSP	,807	,381	-,250	,089	-,364
PL	,280	,181	,941	,036	-,052
HSW	-,307	,801	-,023	-,513	,005

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 21:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf417 x Vf937, generación F_{2:3}

CRUZAMIENTO Vf937 x Vf422 (F_{2:3})**(Mj x Eq)****Tabla 43:** Varianza total explicada

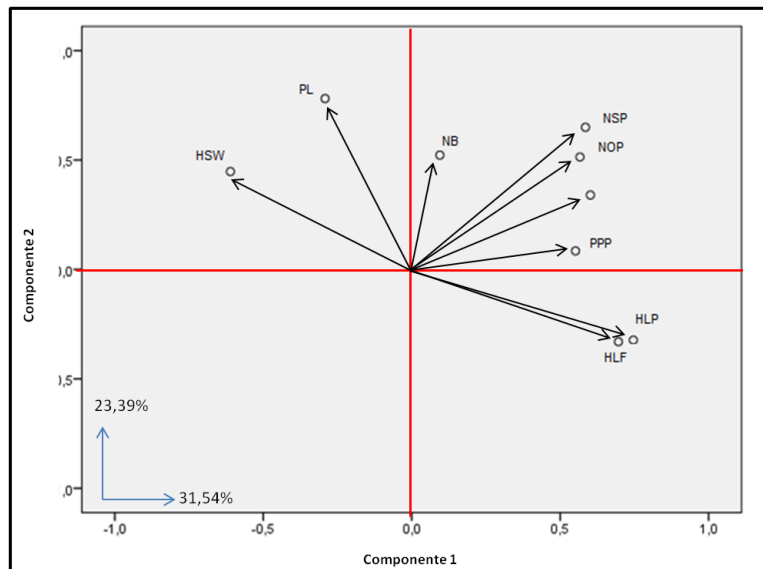
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,839	31,544	31,544
2	2,105	23,391	54,935
3	1,469	16,324	71,259
4	1,221	13,567	84,826
5	,691	7,675	92,501

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 44: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
HLF	,746	-,323	,352	,325	,209
HLP	,696	-,330	,374	,399	,215
NB	,095	,522	,539	-,512	,302
FPI	,602	,340	,131	,265	-,625
PPP	,552	,085	,423	-,600	-,231
NOP	,567	,514	-,544	,060	,197
NSP	,585	,650	-,396	-,020	,081
PL	-,292	,781	,279	,370	,117
HSW	-,611	,447	,434	,352	-,073

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 22:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf937 x Vf422, generación F_{2:3}

CRUZAMIENTO Vf422 x Vf937 (F_{2:3})**(Eq x Mj)****Tabla 45:** Varianza total explicada

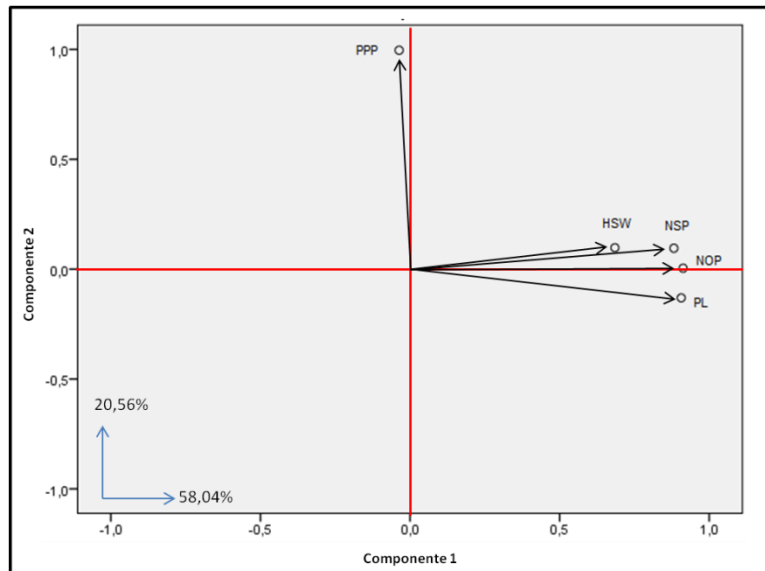
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,902	58,049	58,049
2	1,028	20,560	78,609
3	,775	15,500	94,109

Número de componentes necesarios hasta alcanzar >90% de la variabilidad

Tabla 46: Matriz de componentes principales

	Componentes				
	1	2	3	4	5
PPP	-,037	,996	-,005	,077	,019
NOP	,913	,004	-,323	-,095	,231
NSP	,882	,095	-,394	-,109	-,215
PL	,906	-,131	,184	,356	-,014
HSW	,685	,098	,694	-,200	-,011

Valores de los vectores propios de los primeros cinco componentes

**Figura 23:** Scatterplot del Análisis de Componentes principales del cruzamiento Vf422 x Vf937, generación F_{2:3}

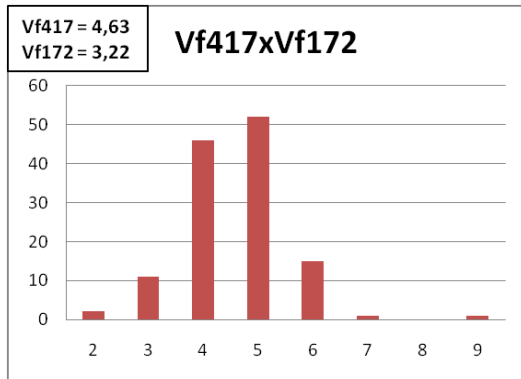
ANEXO II

Histogramas de las poblaciones F_2 y $F_{2:3}$

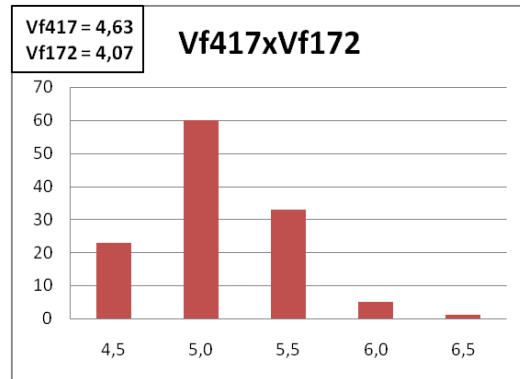
1.- CARÁCTER ALTURA DE LA PRIMERA FLOR (HLF)

Cruzamiento Vf417xVf172

F₂

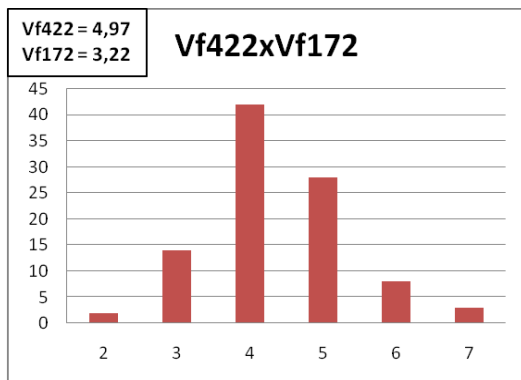


F_{2:3}

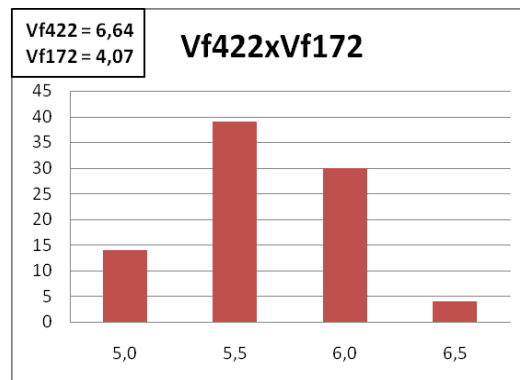


Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

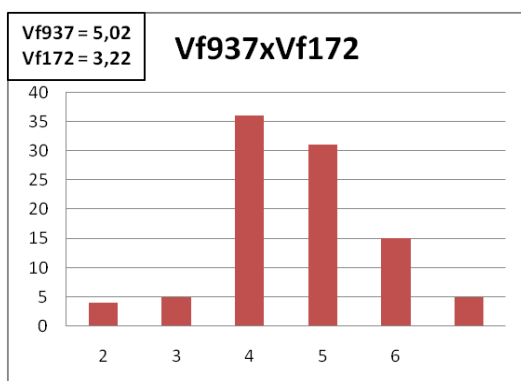


F_{2:3}

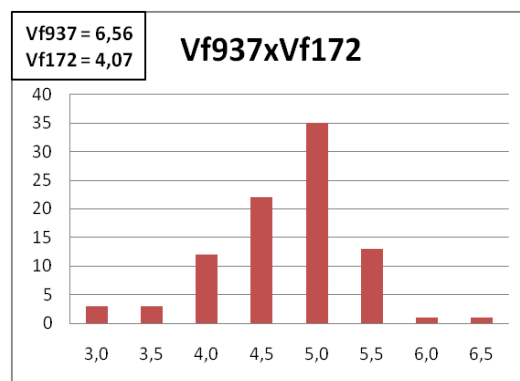


Cruzamiento Vf937xVf172

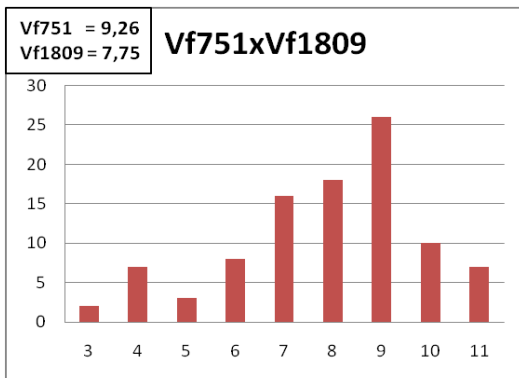
F₂



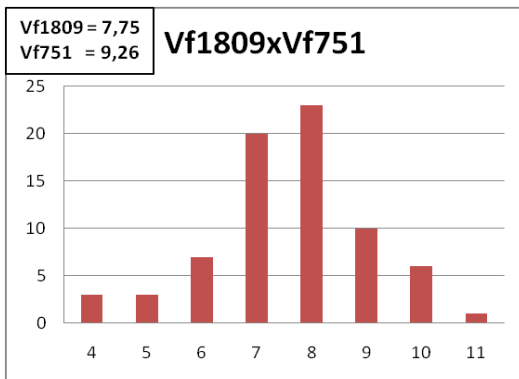
F_{2:3}



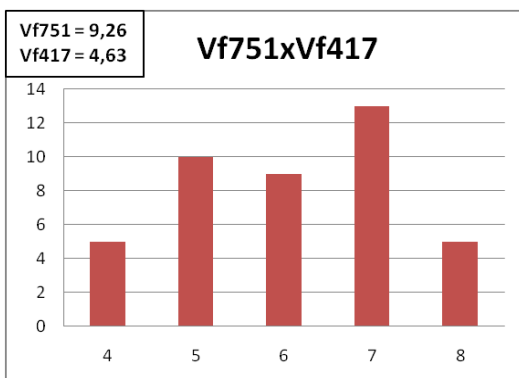
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂

Cruzamiento Vf1809xVf751

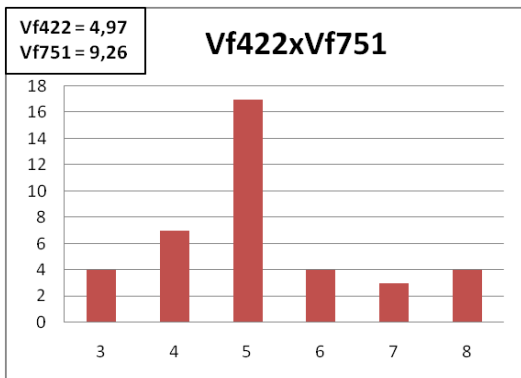
F₂

Cruzamiento Vf751xVf417

F₂

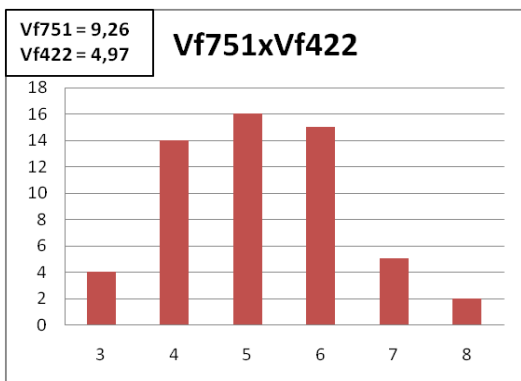
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

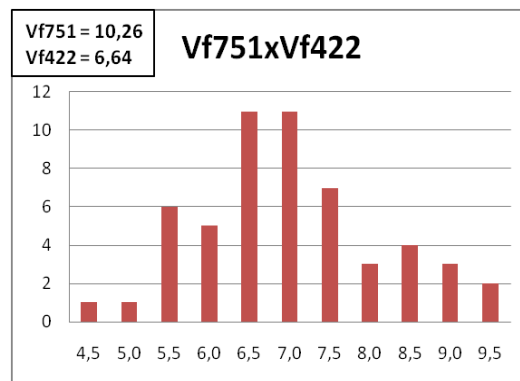


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

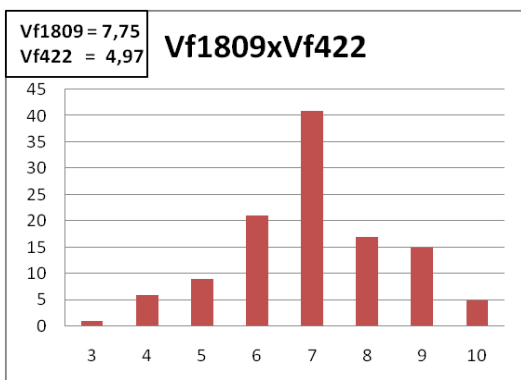


F_{2:3}



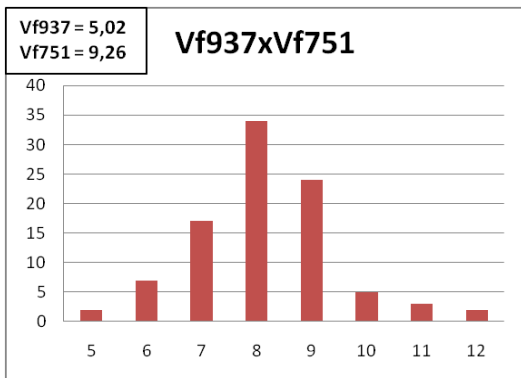
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

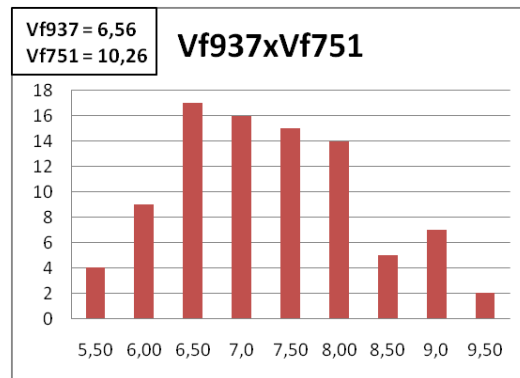


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

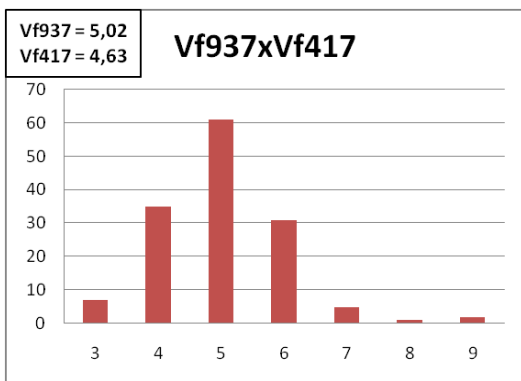


F_{2:3}

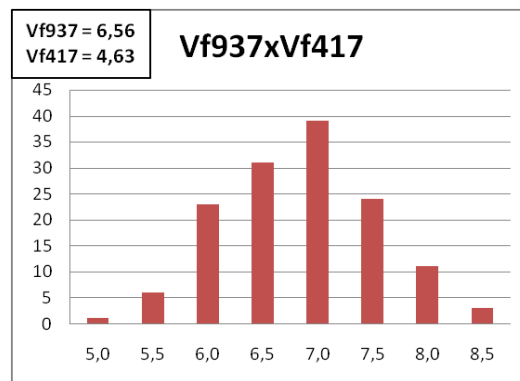


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

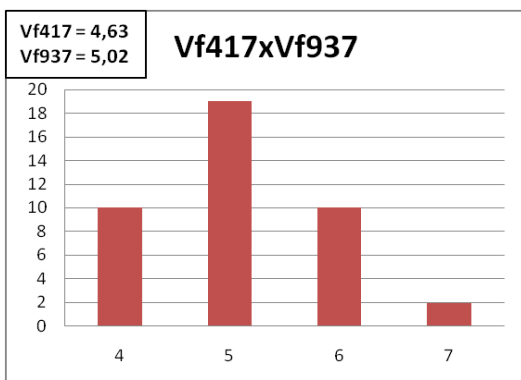


F_{2:3}



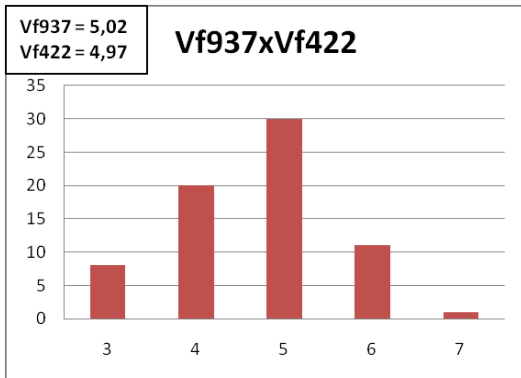
Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

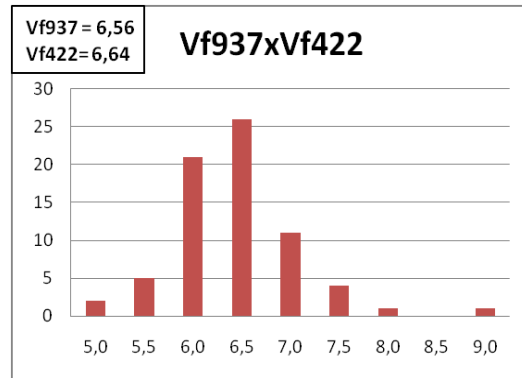


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

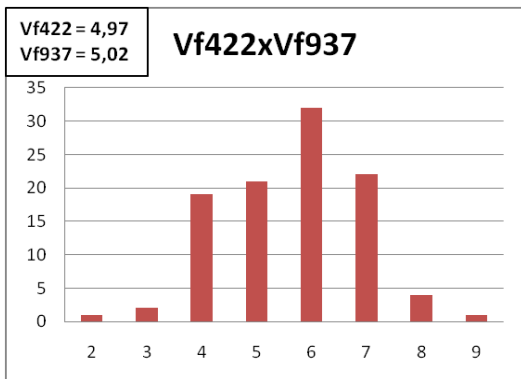


F_{2:3}



Cruzamiento Vf422xVf937

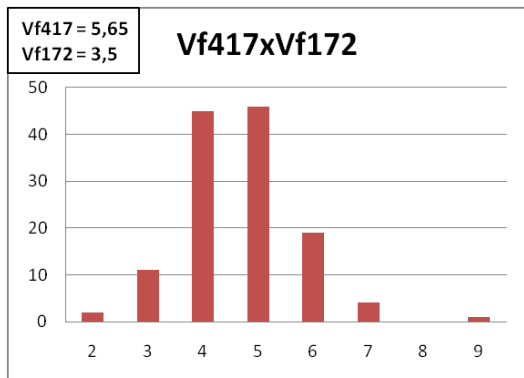
F₂



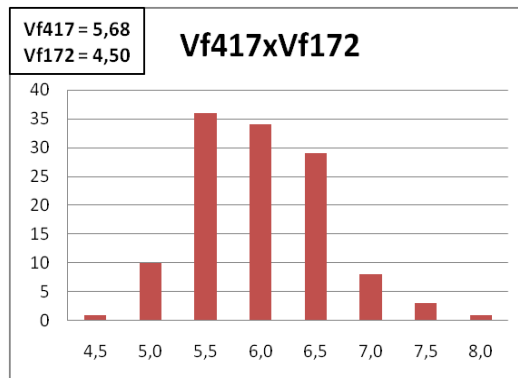
2.- CARÁCTER ALTURA DE LA PRIMERA VAINA (HLP)

Cruzamiento Vf417xVf172

F₂

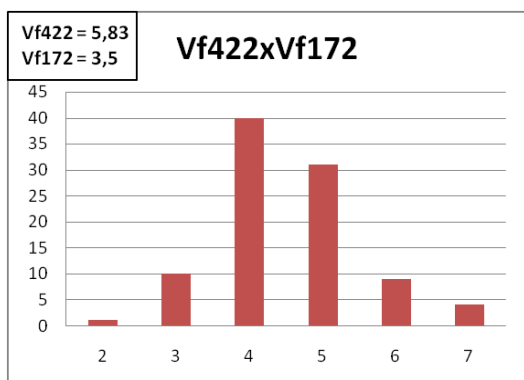


F_{2:3}

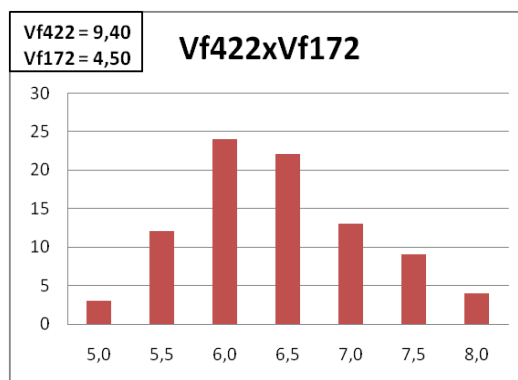


Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

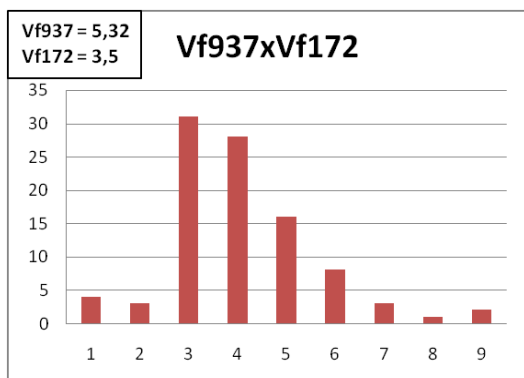


F_{2:3}

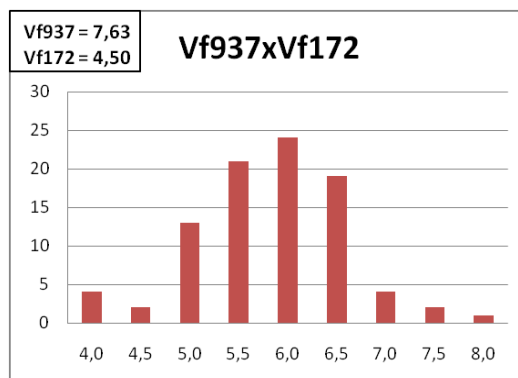


Cruzamiento Vf937xVf172

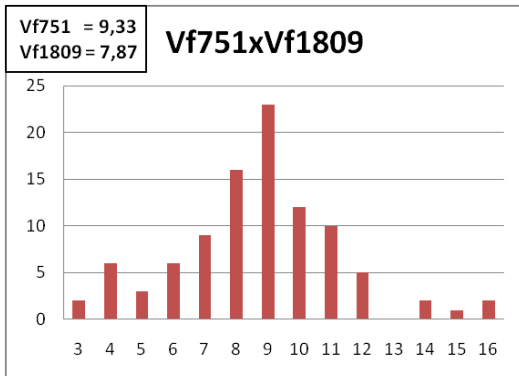
F₂



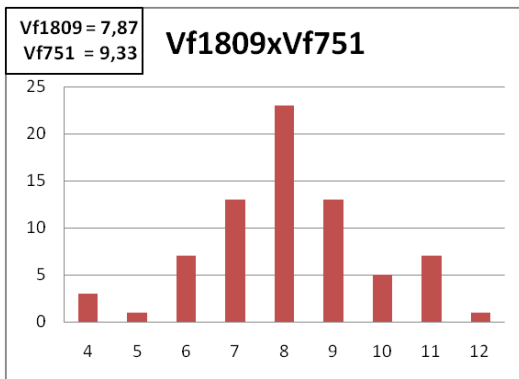
F_{2:3}



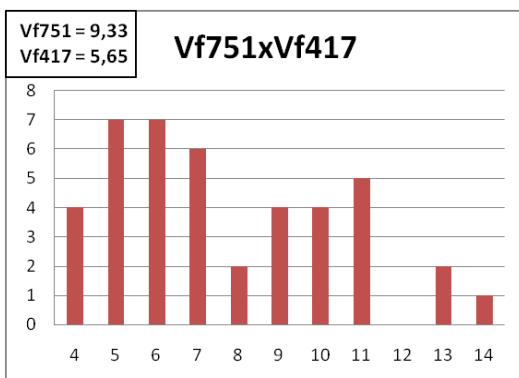
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂

Cruzamiento Vf1809xVf751

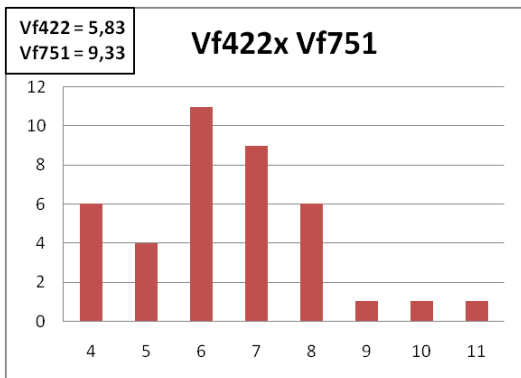
F₂

Cruzamiento Vf751xVf417

F₂

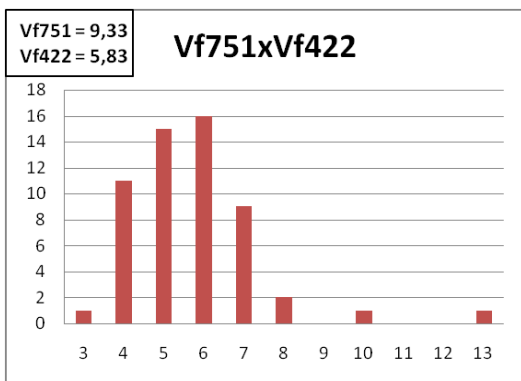
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

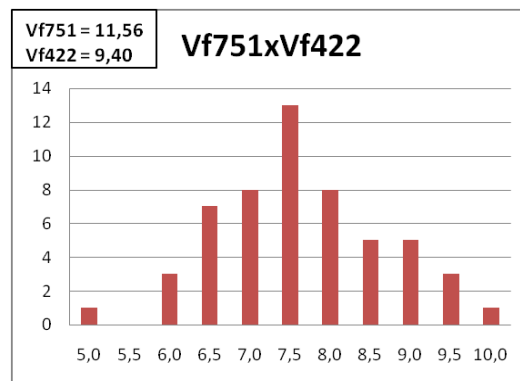


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

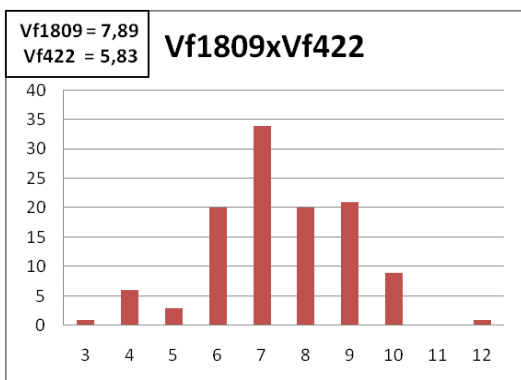


F_{2:3}



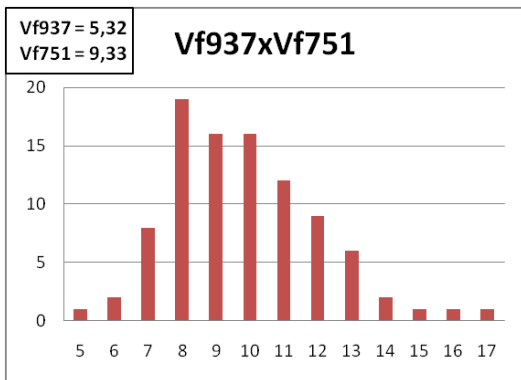
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

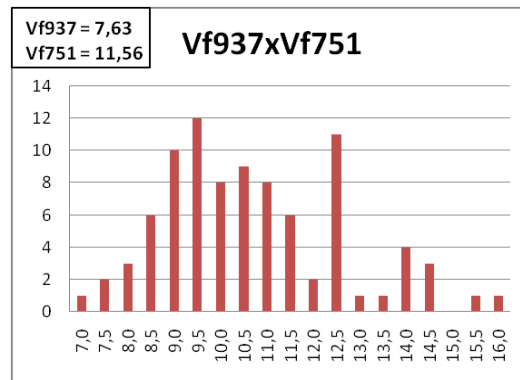


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

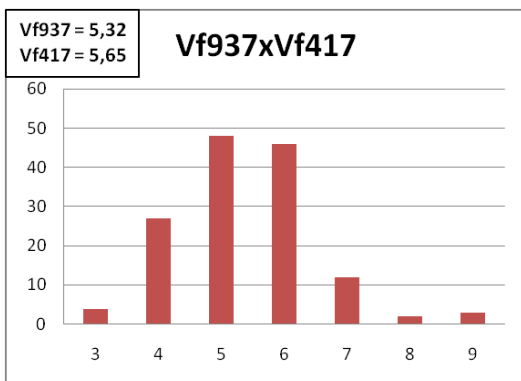


F_{2:3}

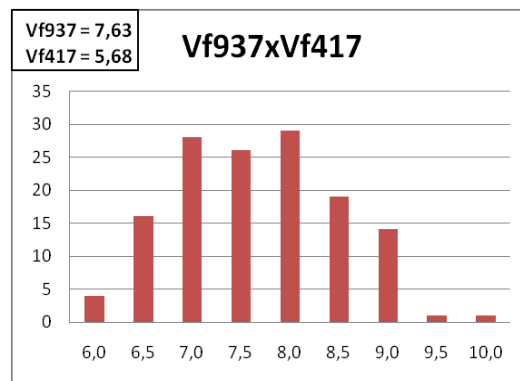


Cruzamiento Vf937xvV417

F₂

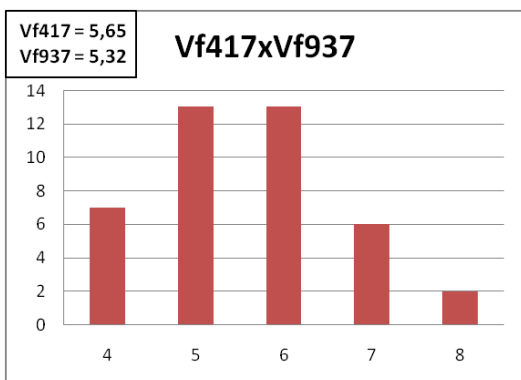


F_{2:3}



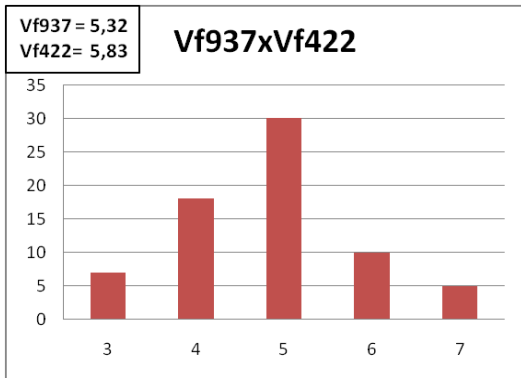
Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

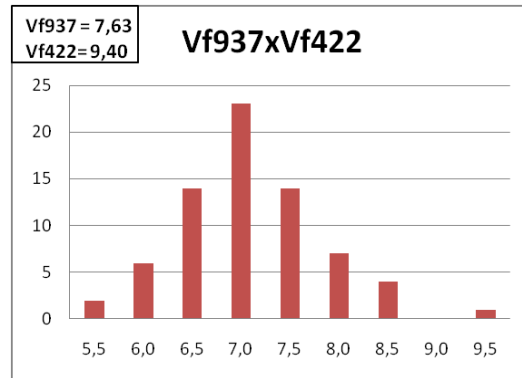


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

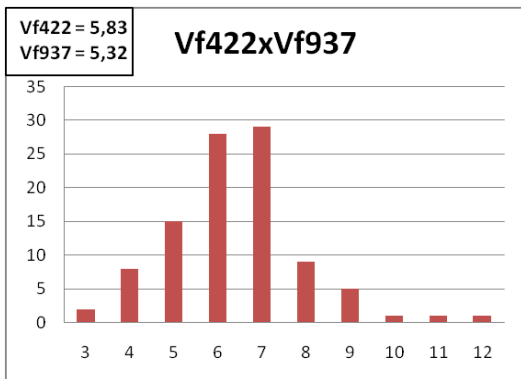


F_{2:3}



Cruzamiento Vf422xVf937

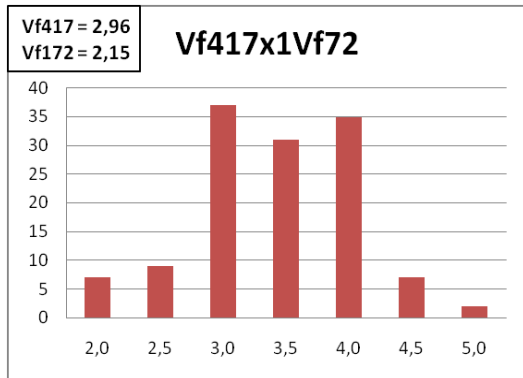
F₂



3.- CARÁCTER FLORES POR INFLORESCENCIA (FPI)

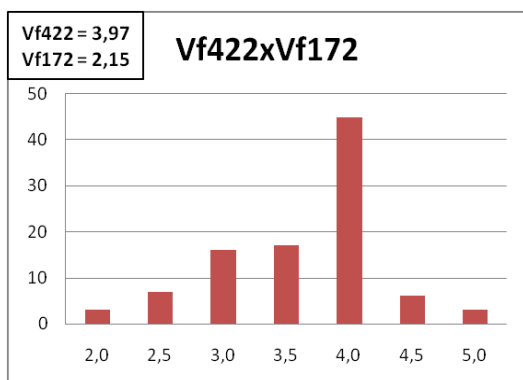
Cruzamiento Vf417xVf172

F₂

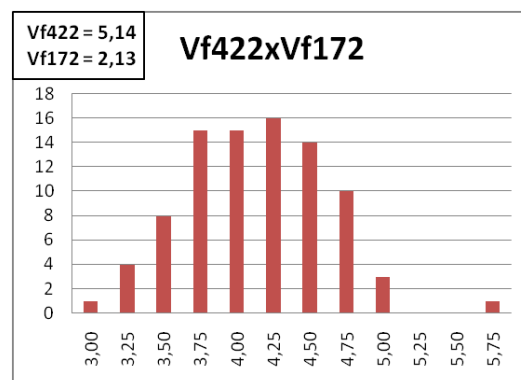


Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

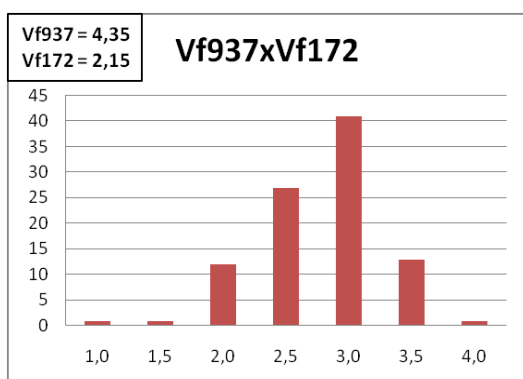


F_{2:3}



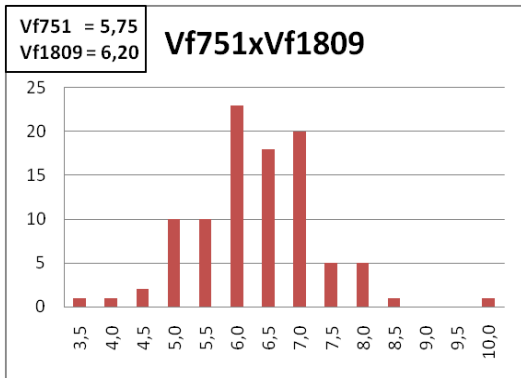
Cruzamiento Vf937xVf172

F₂



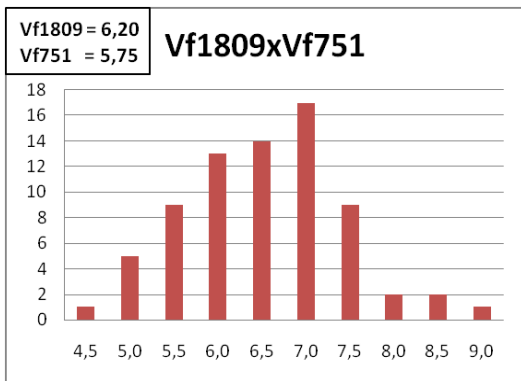
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂



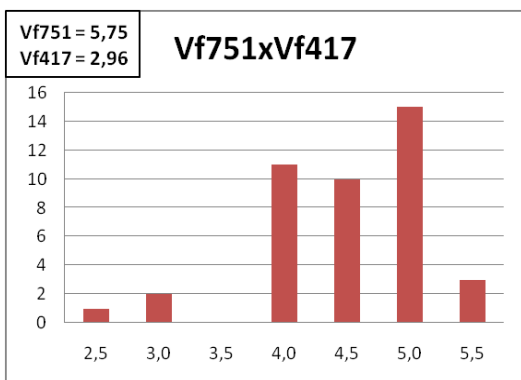
Cruzamiento Vf1809xVf751

F₂



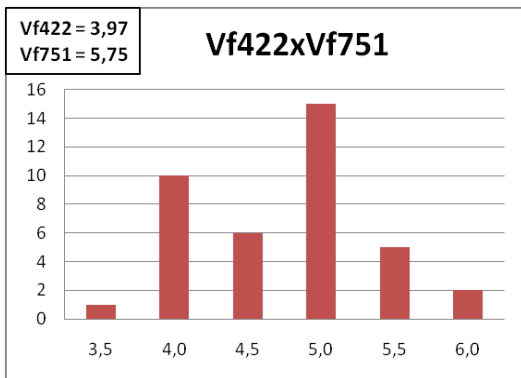
Cruzamiento Vf751xVf417

F₂



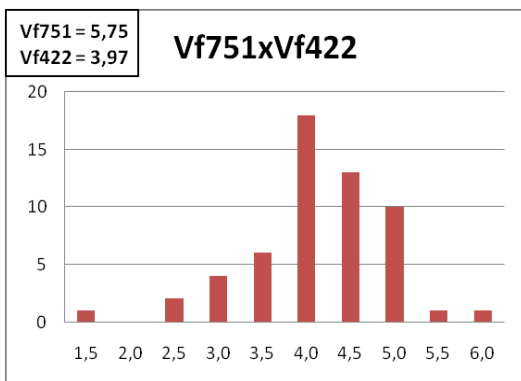
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

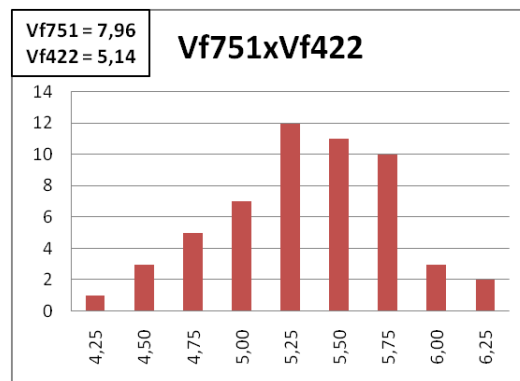


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

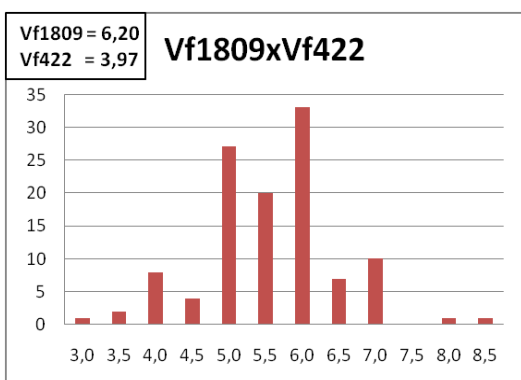


F_{2:3}



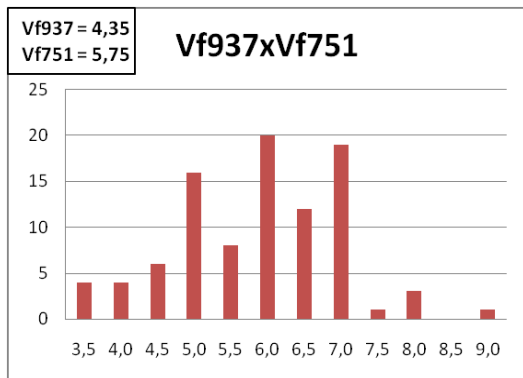
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

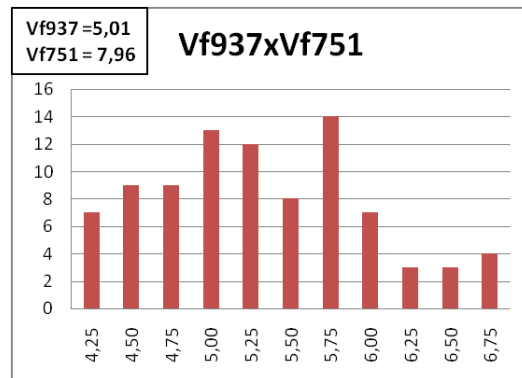


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

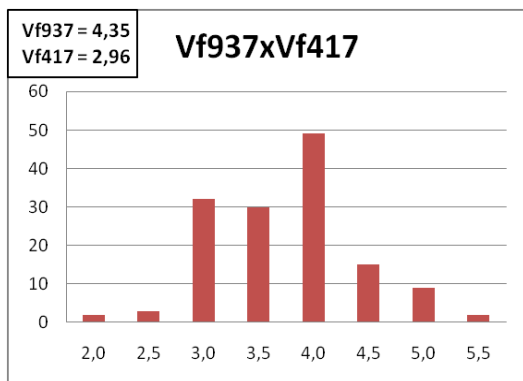


F_{2:3}

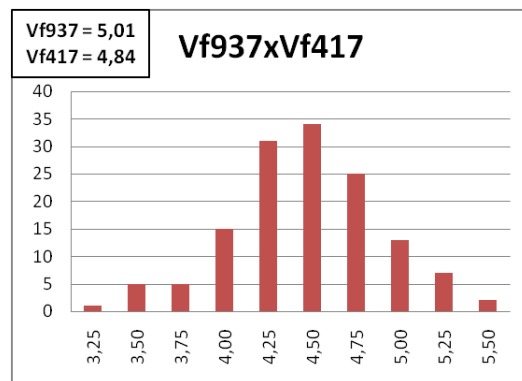


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

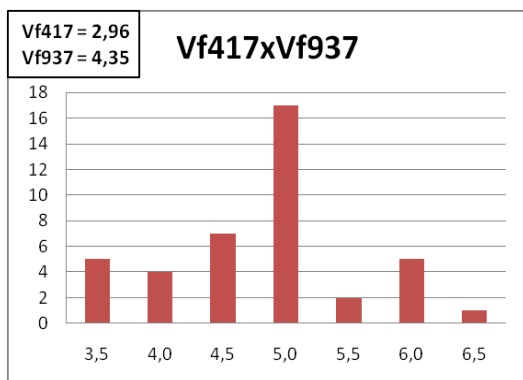


F_{2:3}



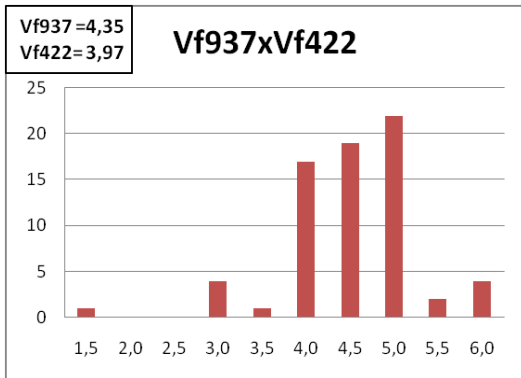
Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

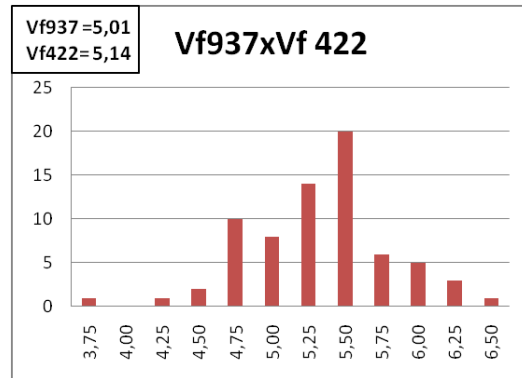


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

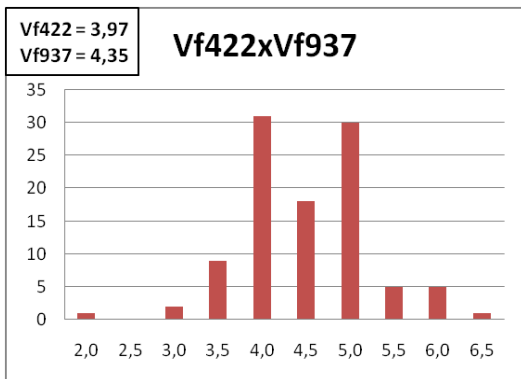


F_{2:3}



Cruzamiento Vf422xVf937

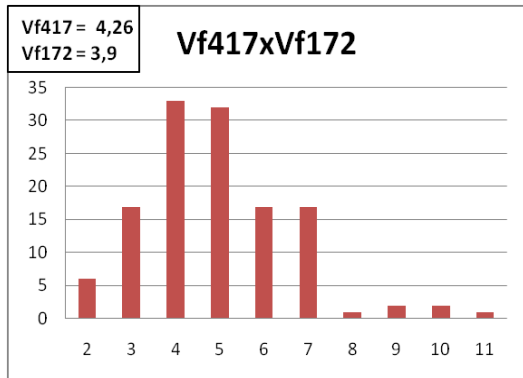
F₂



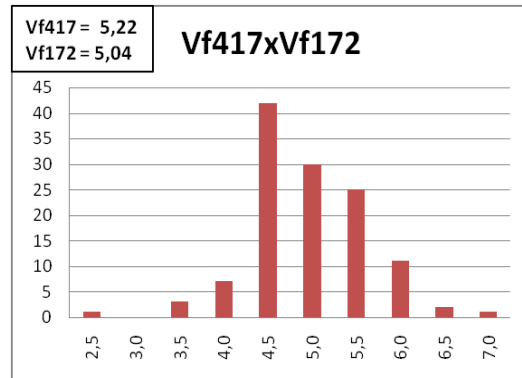
4.- CARÁCTER NÚMERO DE RAMAS TOTAL (NTP)

Cruzamiento Vf417xVf172

F₂

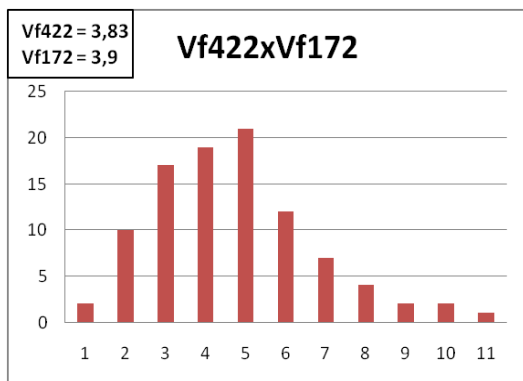


F_{2:3}

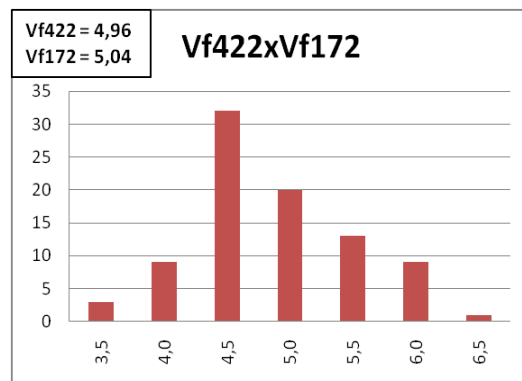


Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

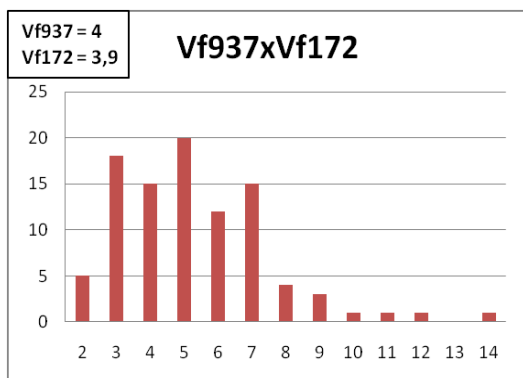


F_{2:3}

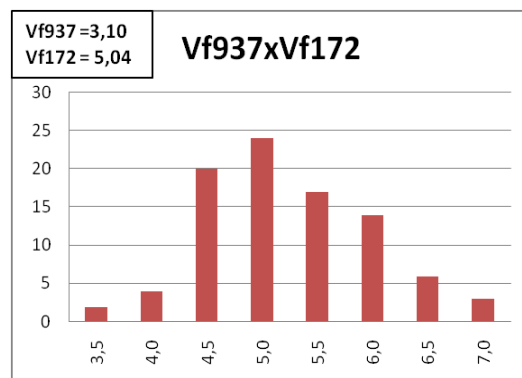


Cruzamiento Vf937xVf172

F₂

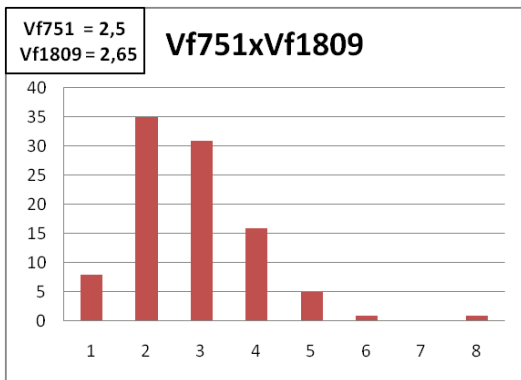


F_{2:3}



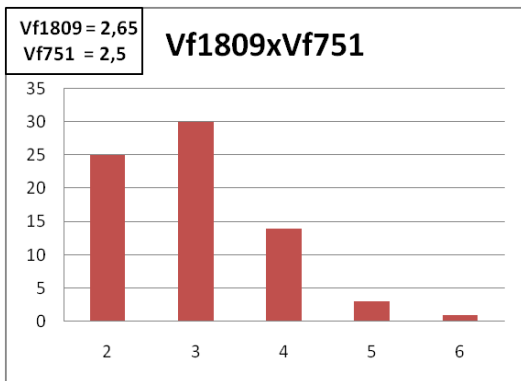
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂



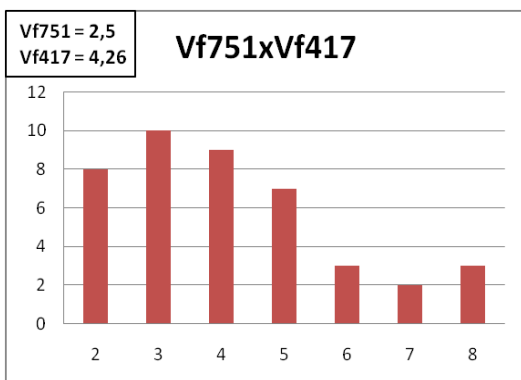
Cruzamiento Vf1809xVf751

F₂



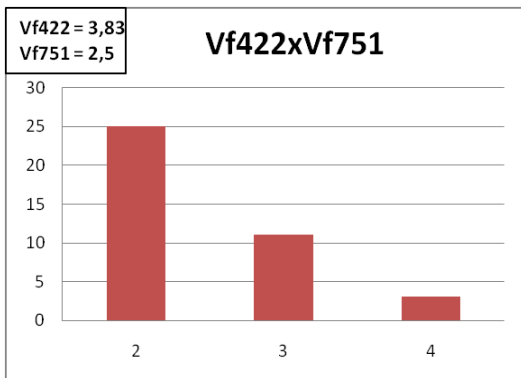
Cruzamiento Vf751xVf417

F₂



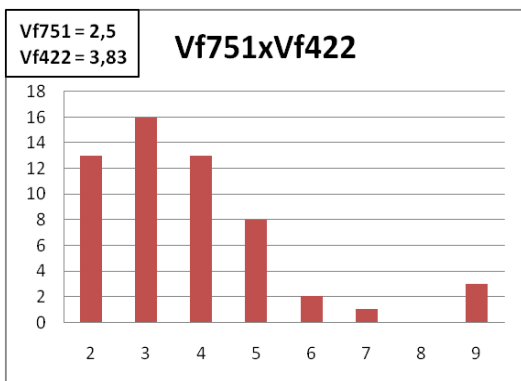
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

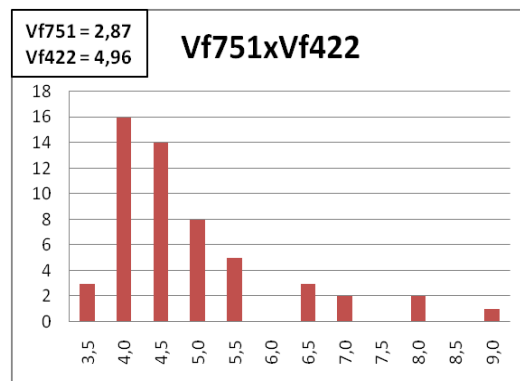


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

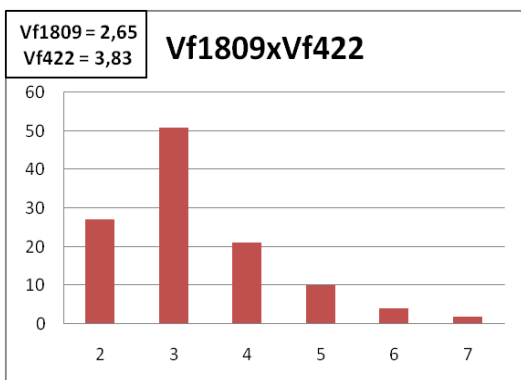


F_{2:3}



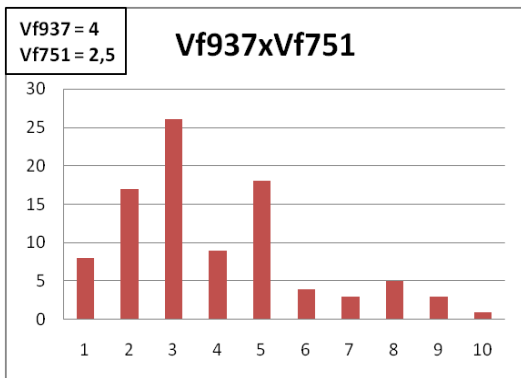
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

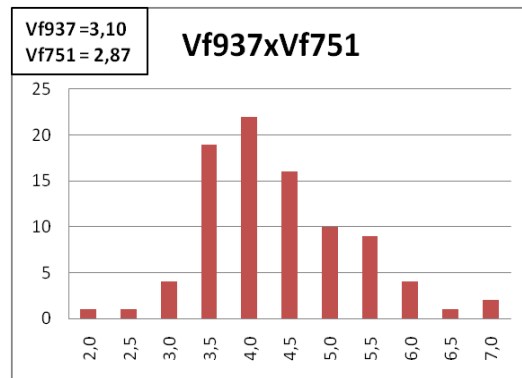


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

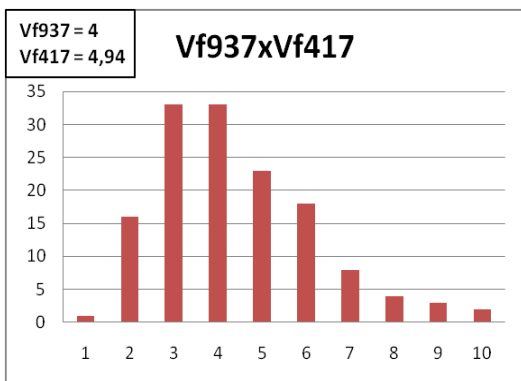


F_{2:3}

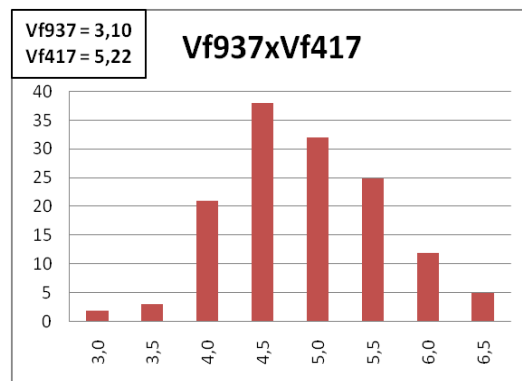


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

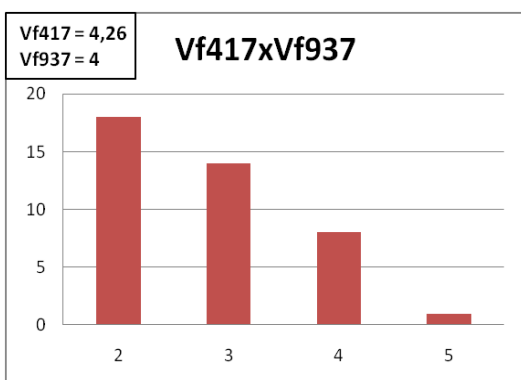


F_{2:3}



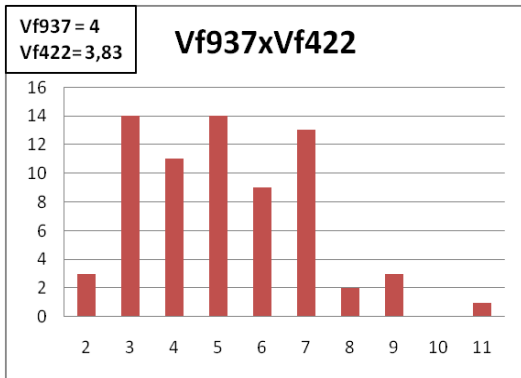
Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

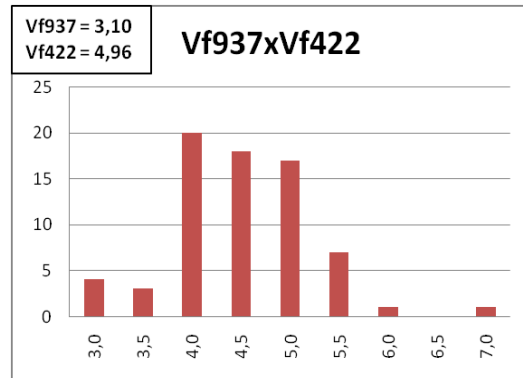


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

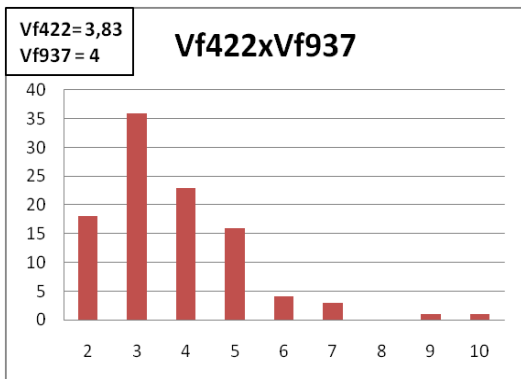


F_{2:3}



Cruzamiento Vf422xVf937

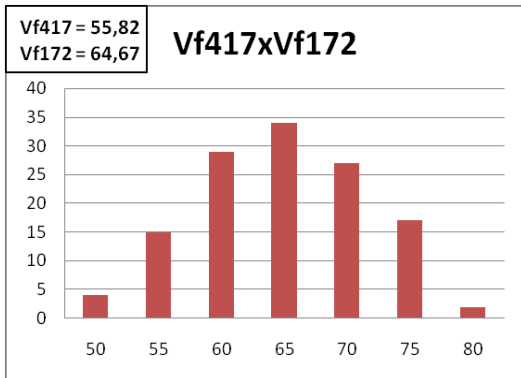
F₂



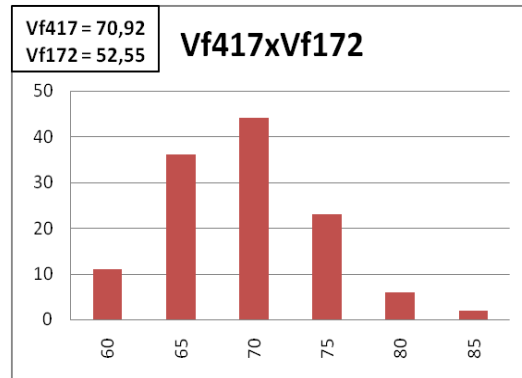
5.- CARÁCTER LONGITUD DE VAINA (PL)

Cruzamiento Vf417xVf172

F₂

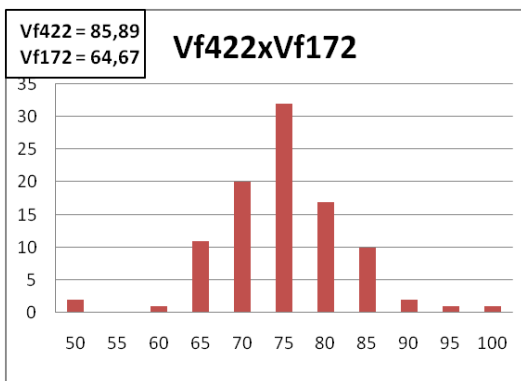


F_{2:3}

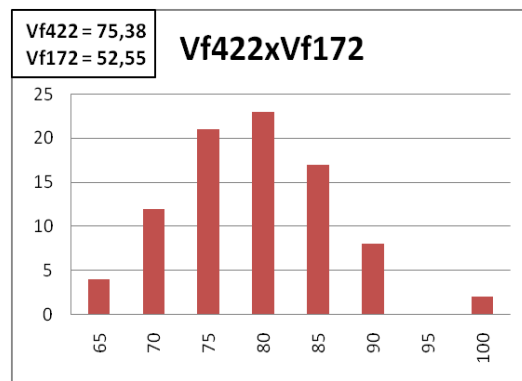


Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

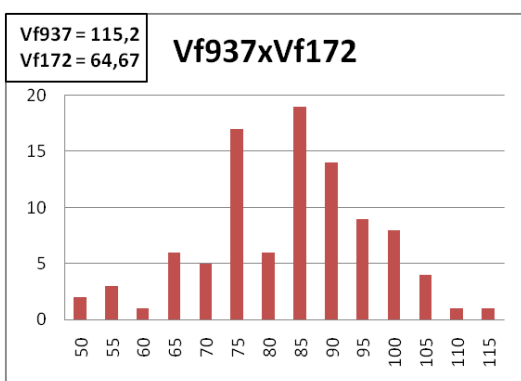


F_{2:3}

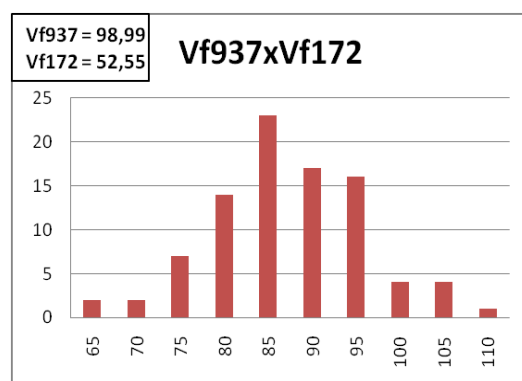


Cruzamiento Vf937xVf172

F₂

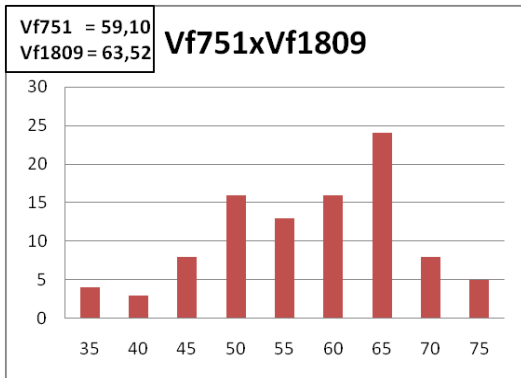


F_{2:3}



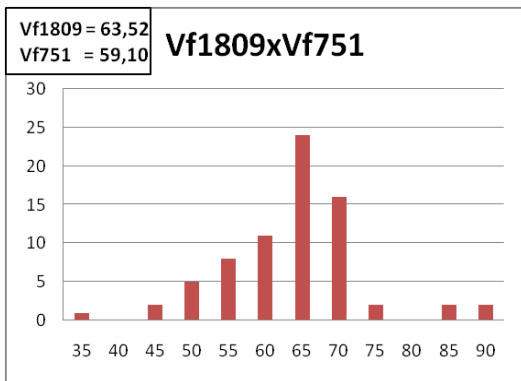
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂



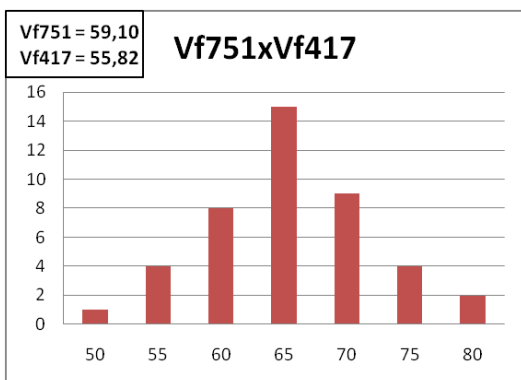
Cruzamiento Vf1809xVf751

F₂



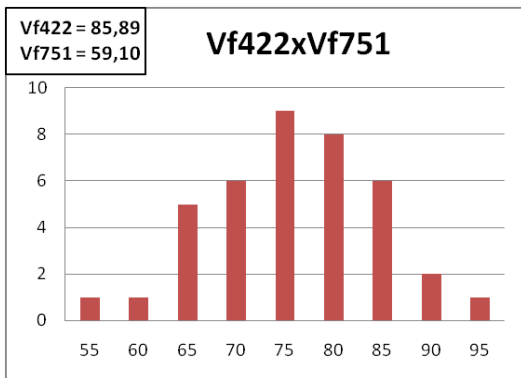
Cruzamiento Vf751xVf417

F₂



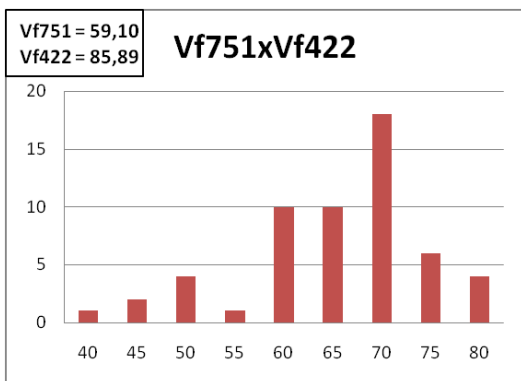
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

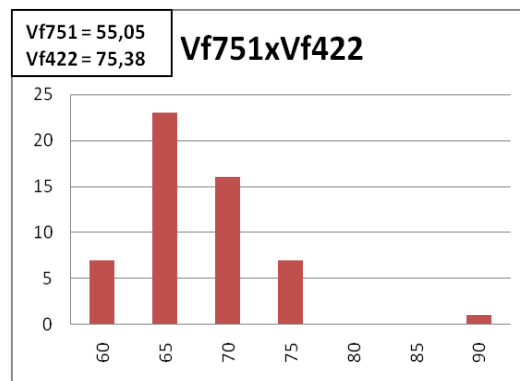


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

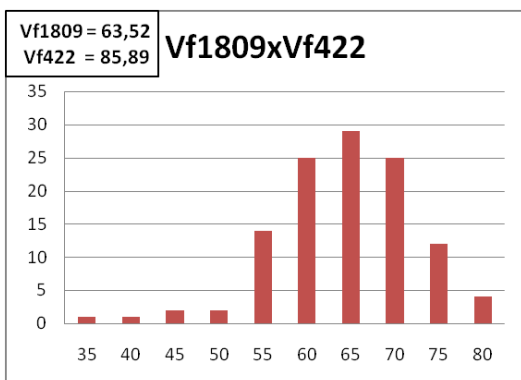


F_{2:3}



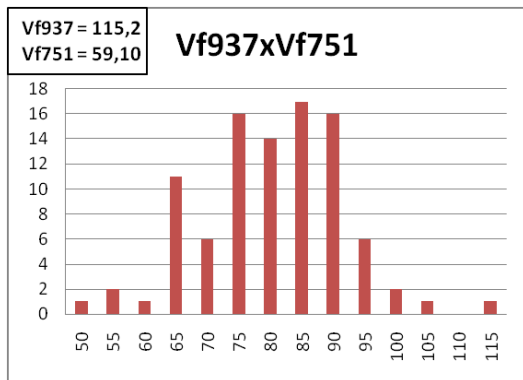
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

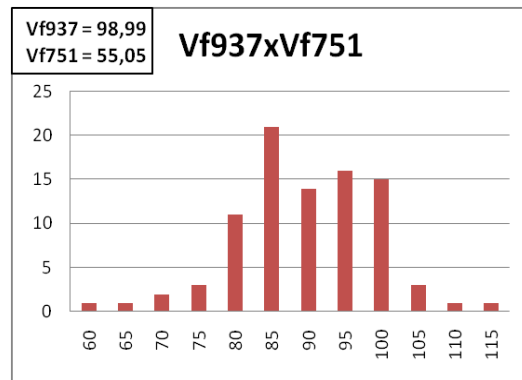


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

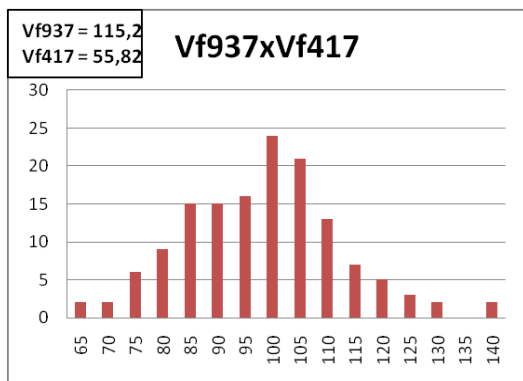


F_{2:3}

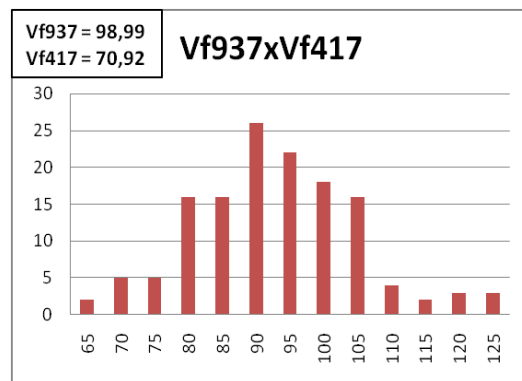


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

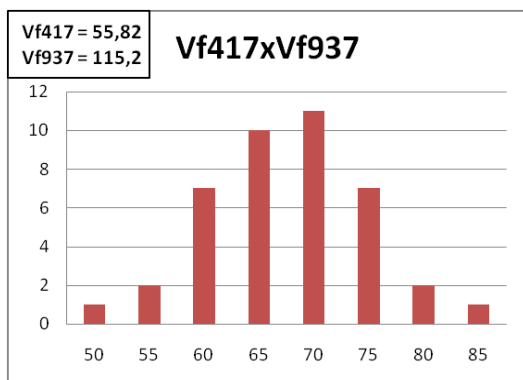


F_{2:3}

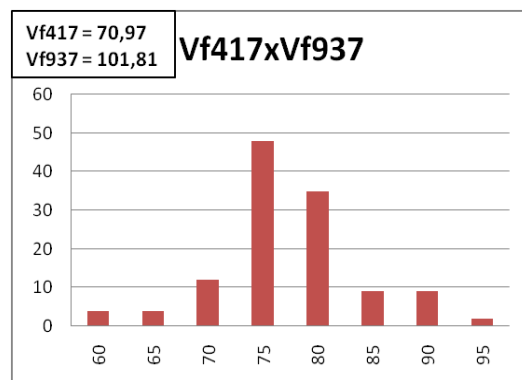


- Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

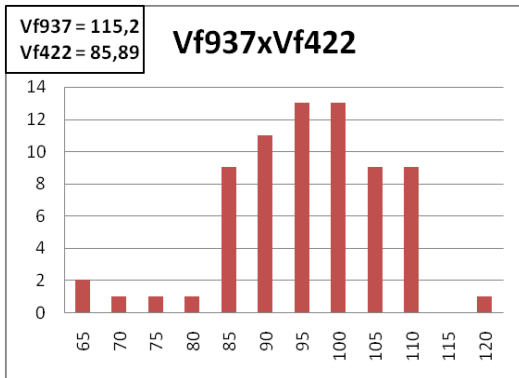


F_{2:3}

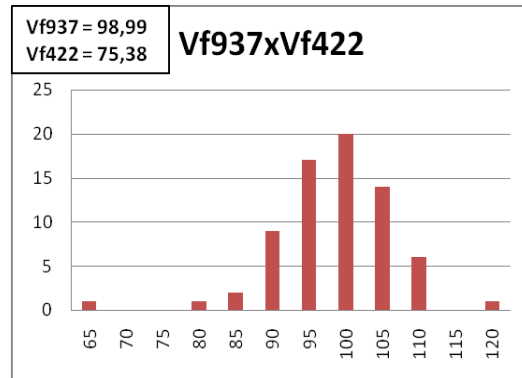


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

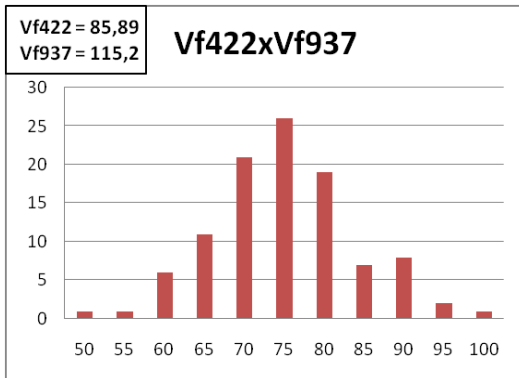


F_{2:3}

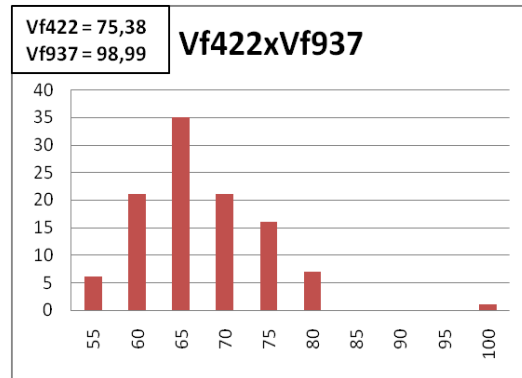


Cruzamiento Vf422xVf937

F₂



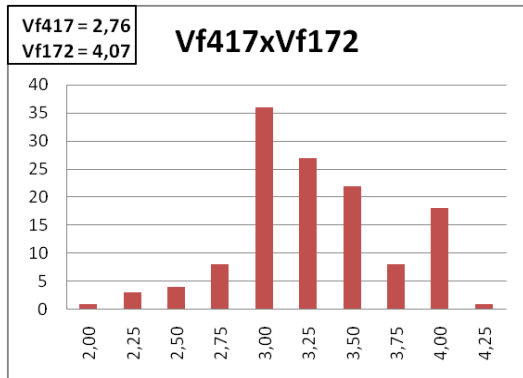
F_{2:3}



6.- CARÁCTER NÚMERO DE ÓVULOS POR VAINA (NOP)

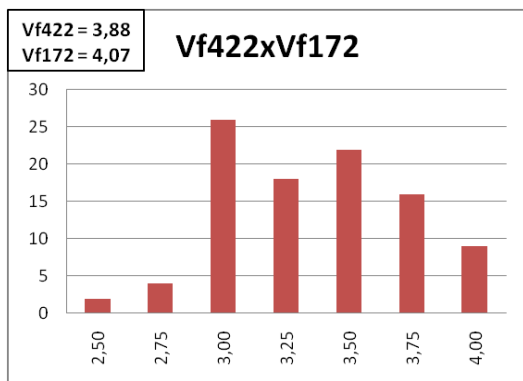
Cruzamiento Vf417xVf172

F₂



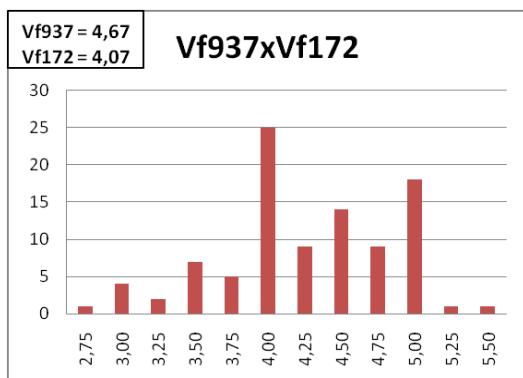
Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

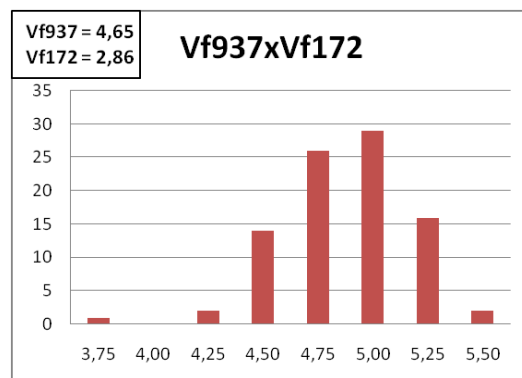


Cruzamiento Vf937xVf172

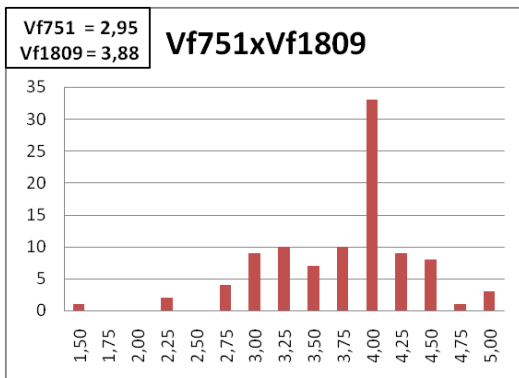
F₂



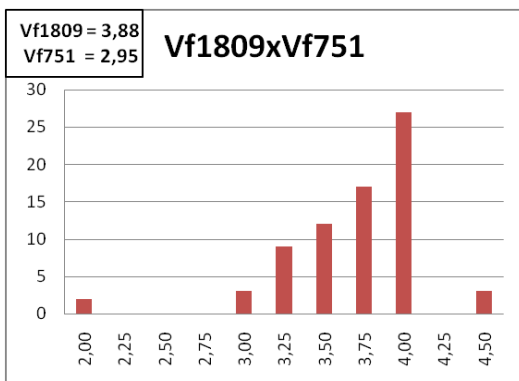
F_{2:3}



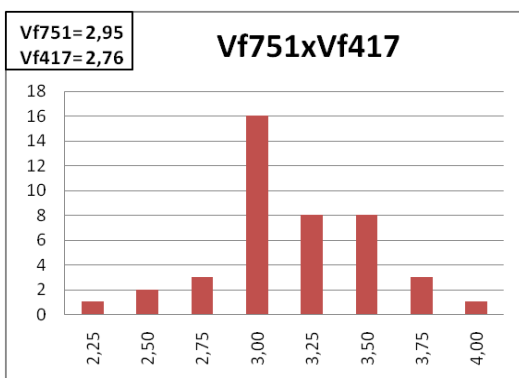
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂

Cruzamiento Vf1809xVf751

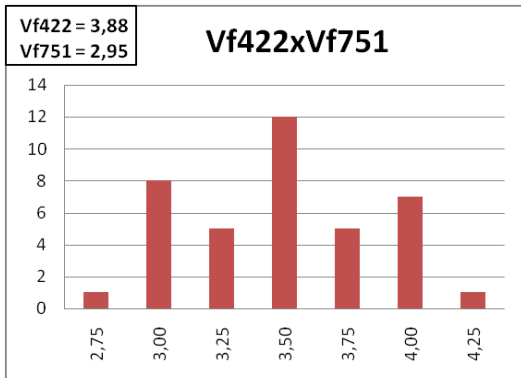
F₂

Cruzamiento Vf751xVf417

F₂

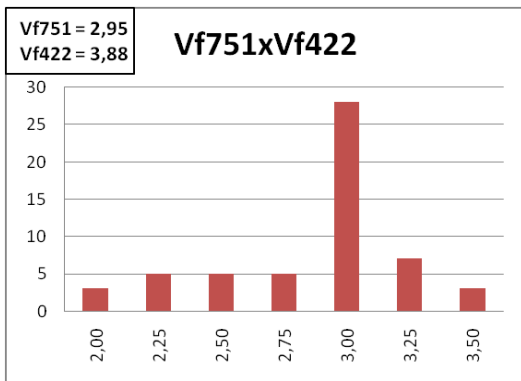
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

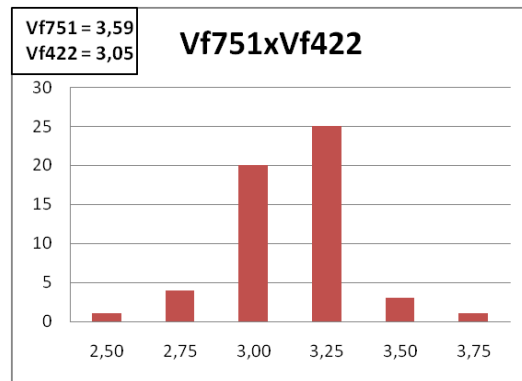


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

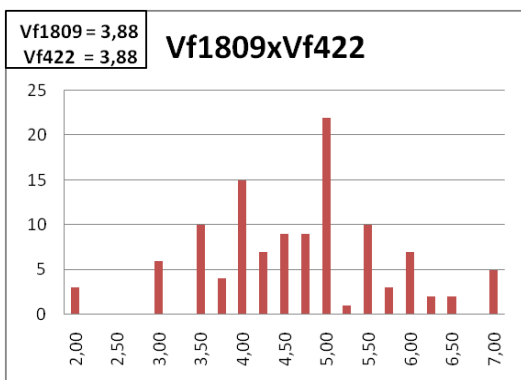


F_{2:3}



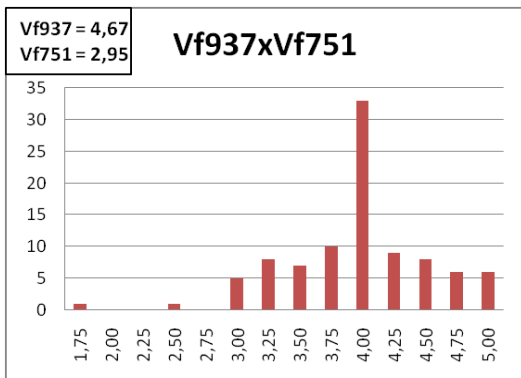
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

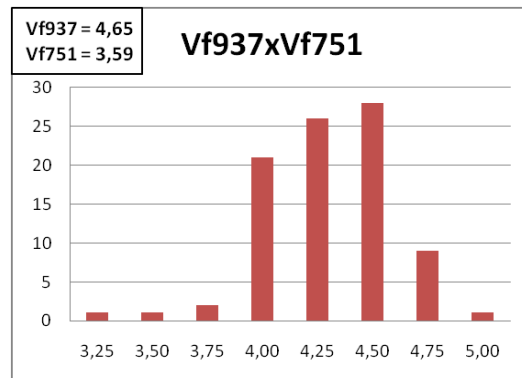


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

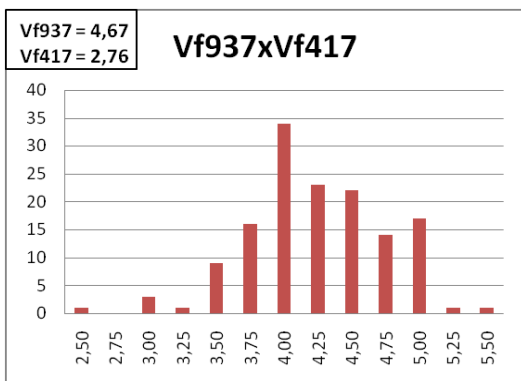


F_{2:3}

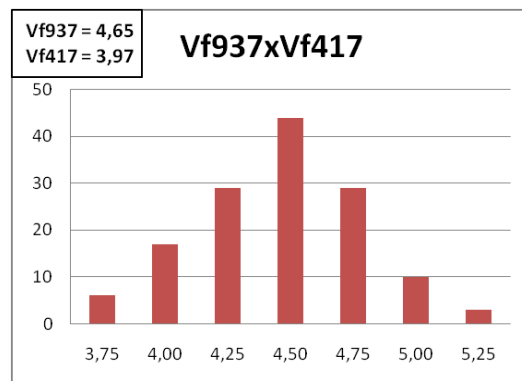


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

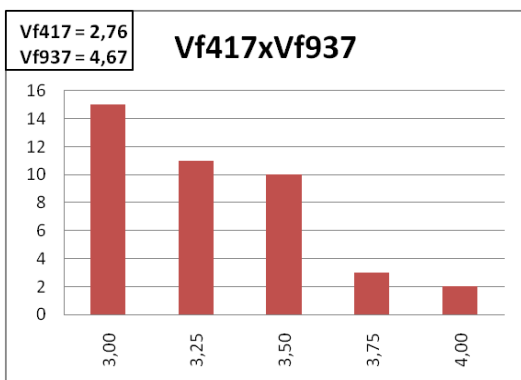


F_{2:3}

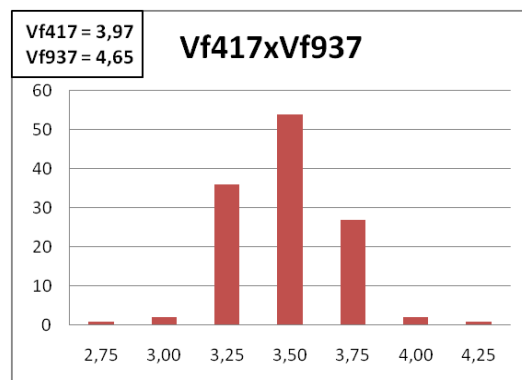


Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

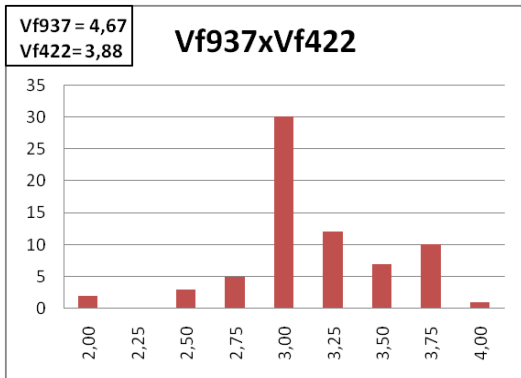


F_{2:3}

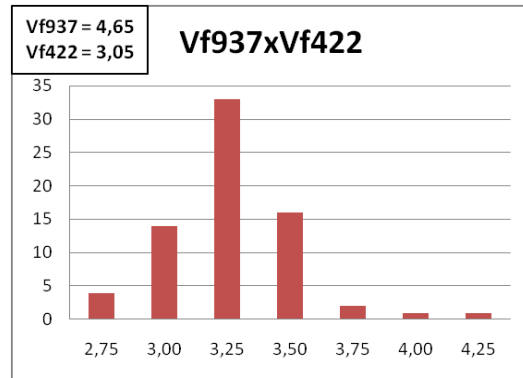


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

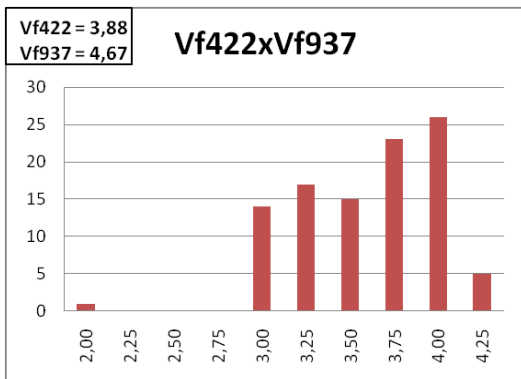


F_{2:3}

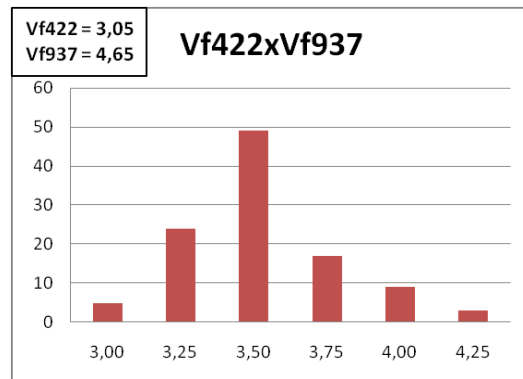


Cruzamiento Vf422xVf937

F₂



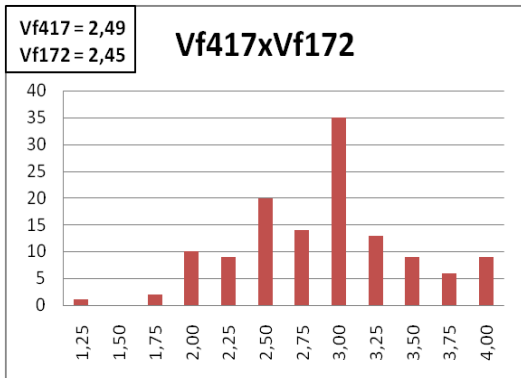
F_{2:3}



7.- CARÁCTER NÚMERO GRANOS POR VAINA (NSP)

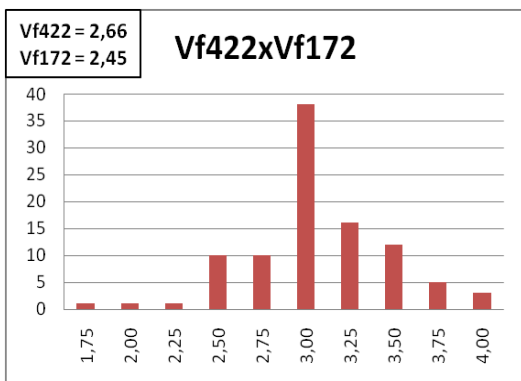
Cruzamiento Vf417xVf172

F₂



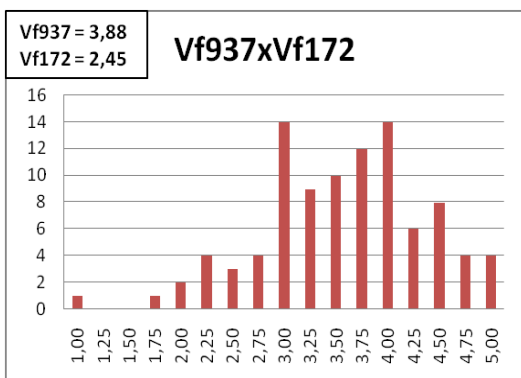
Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

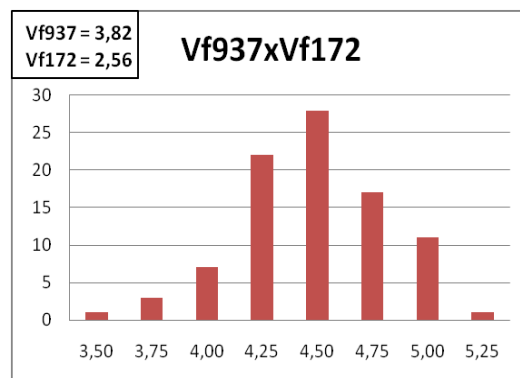


Cruzamiento Vf937xVf172

F₂

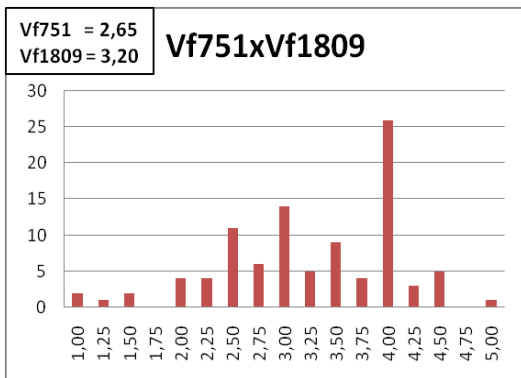


F_{2:3}



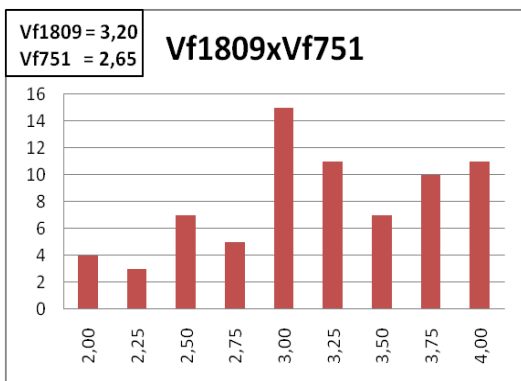
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂



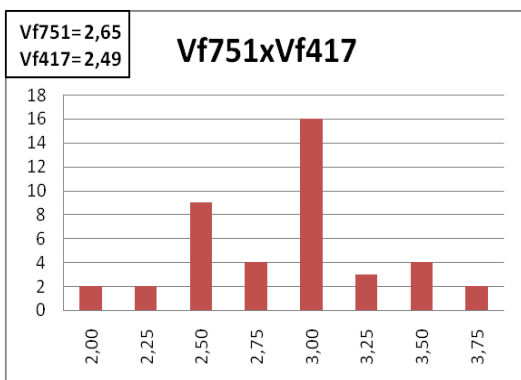
Cruzamiento Vf1809xVf751

F₂



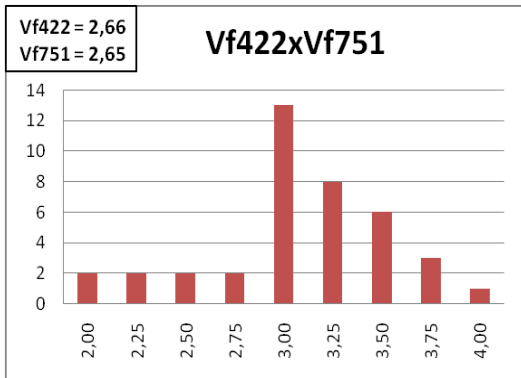
Cruzamiento Vf751xVf417

F₂



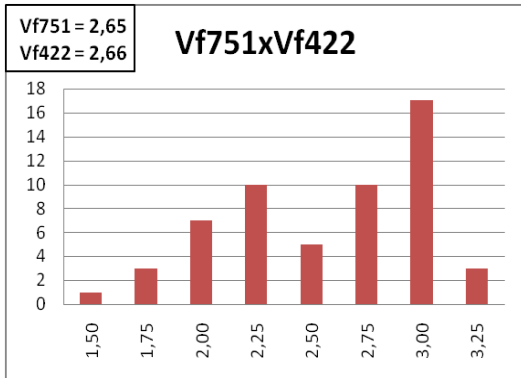
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

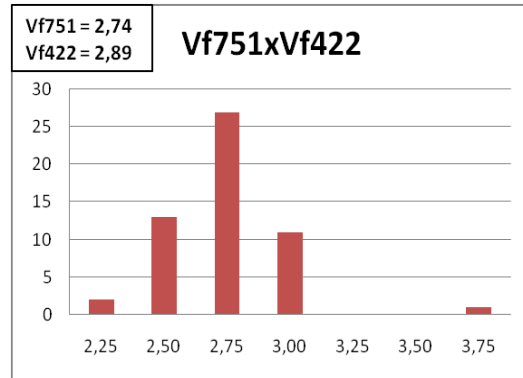


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

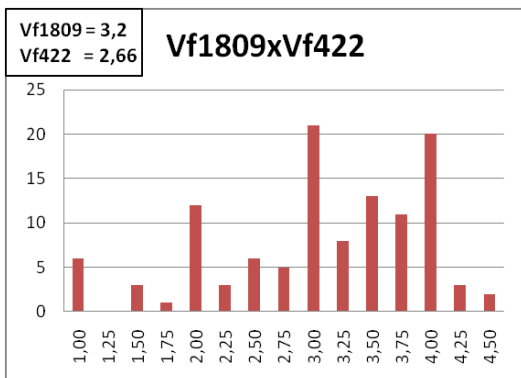


F_{2:3}



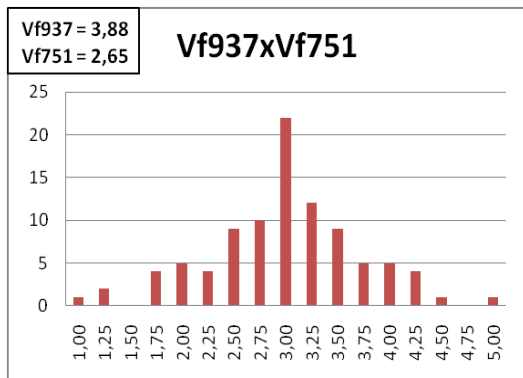
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

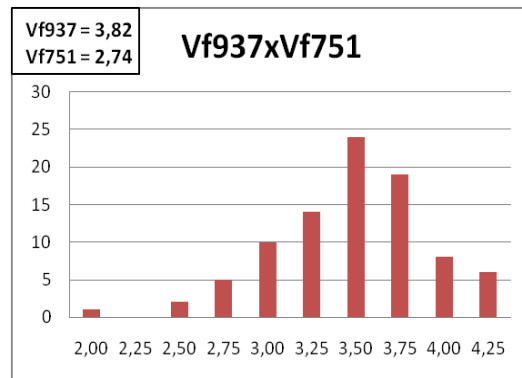


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

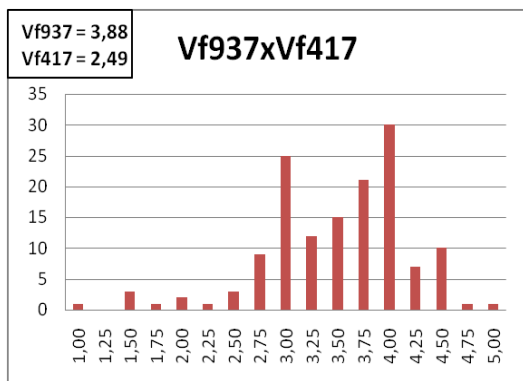


F_{2:3}

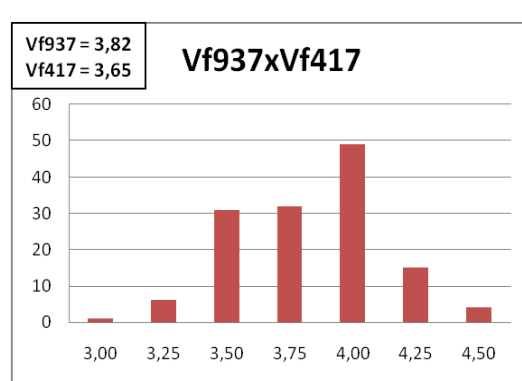


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

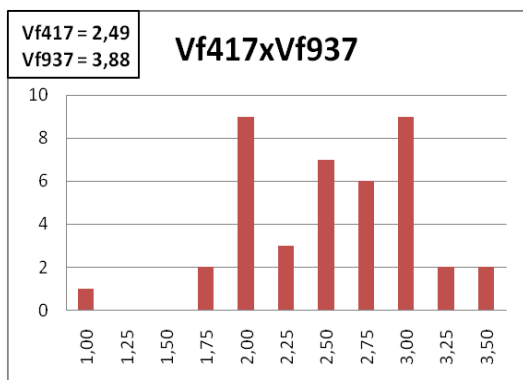


F_{2:3}

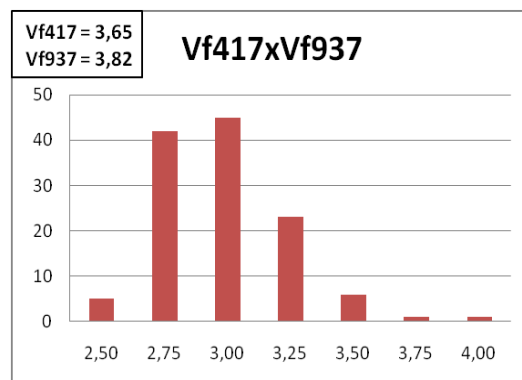


Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

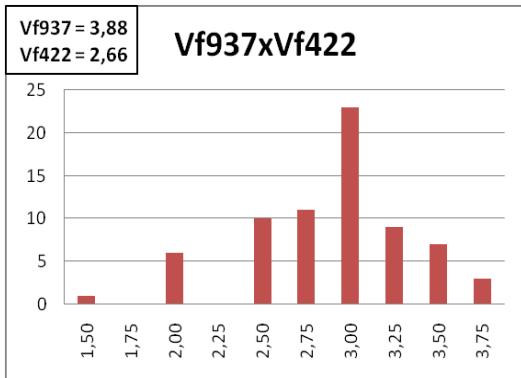


F_{2:3}

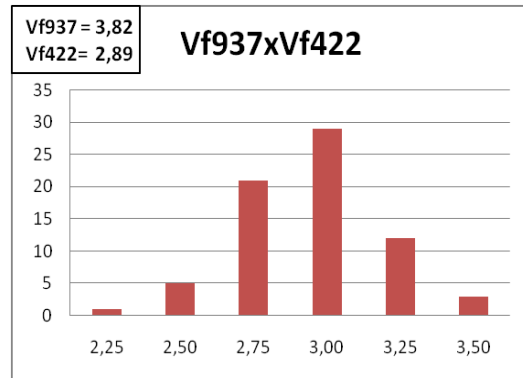


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

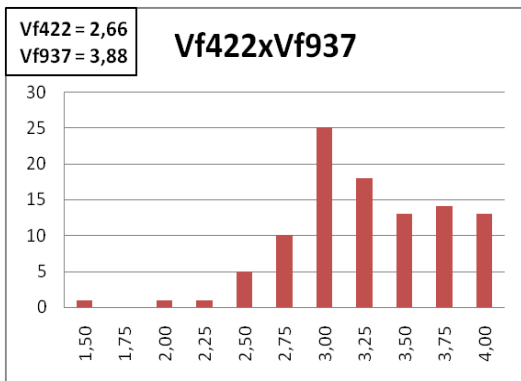


F_{2:3}

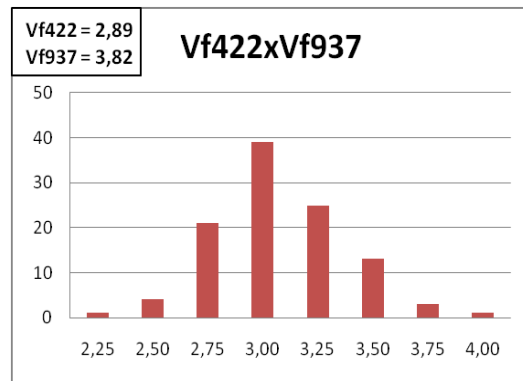


Cruzamiento Vf422xVf937

F₂



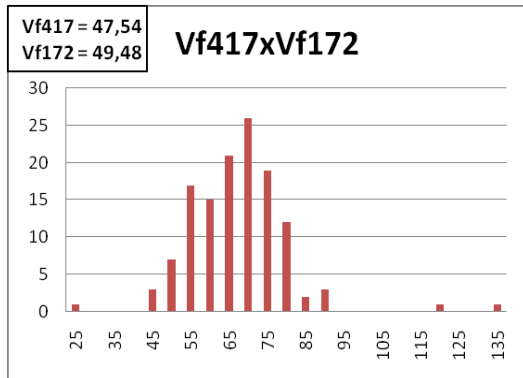
F_{2:3}



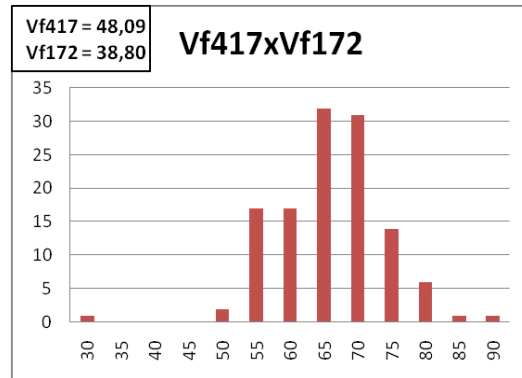
8.- CARÁCTER PESO DE 100 SEMILLAS (HSW)

Cruzamiento Vf417xVf172

F₂

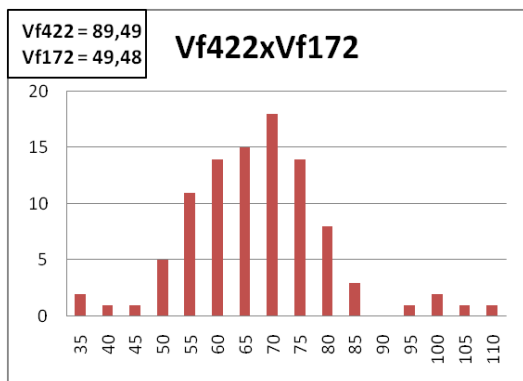


F_{2:3}

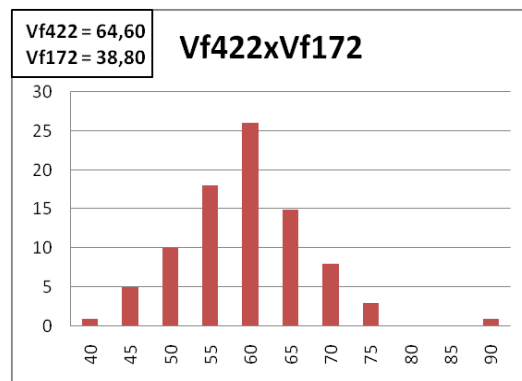


Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

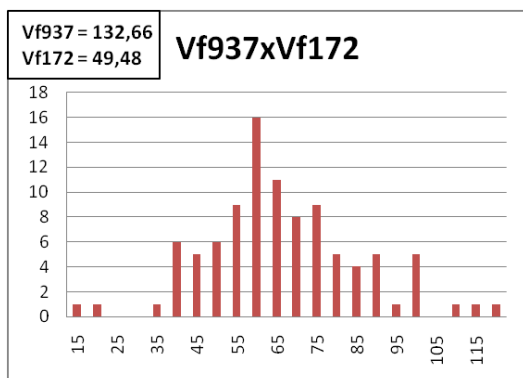


F_{2:3}

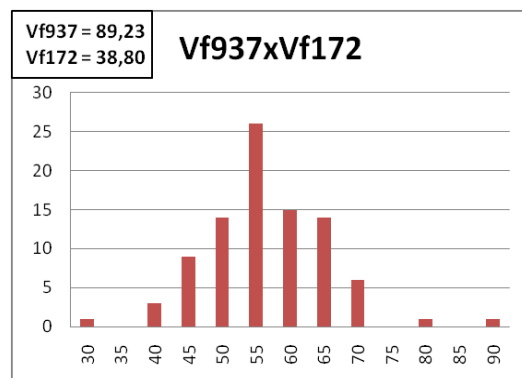


Cruzamiento Vf937xVf172

F₂

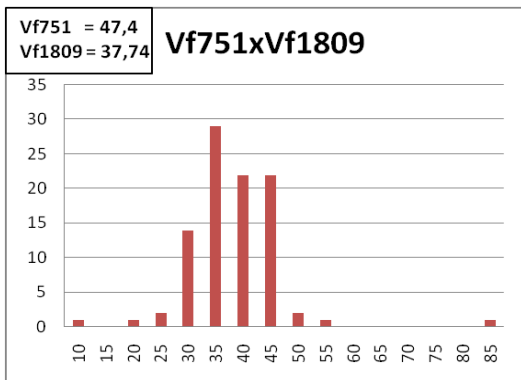


F_{2:3}



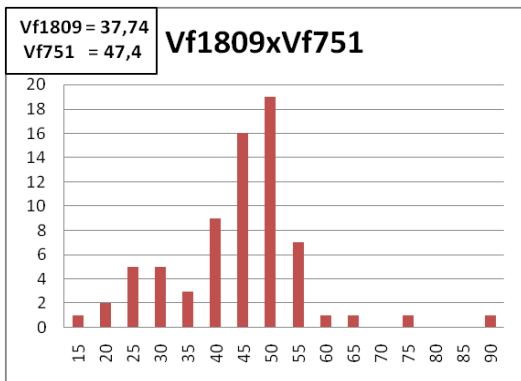
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂



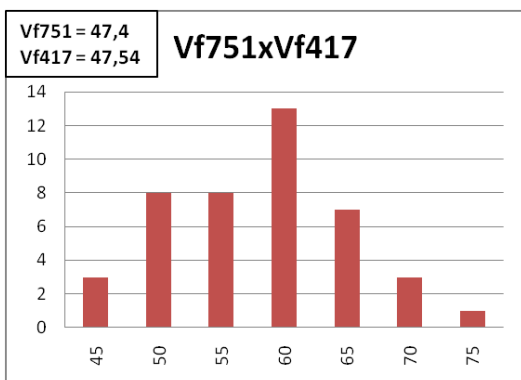
Cruzamiento Vf1809xVf751

F₂



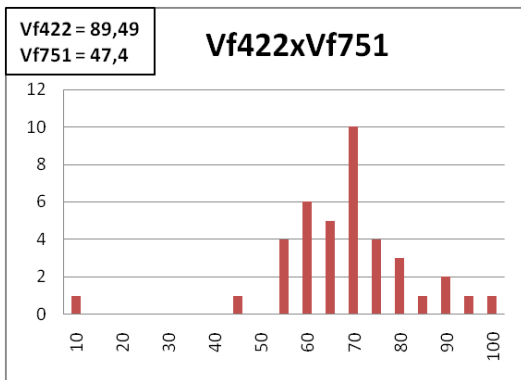
Cruzamiento Vf751xVf417

F₂



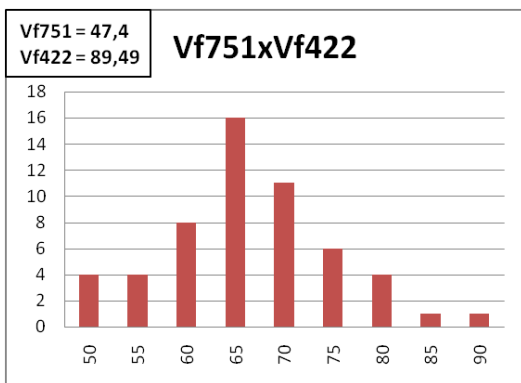
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

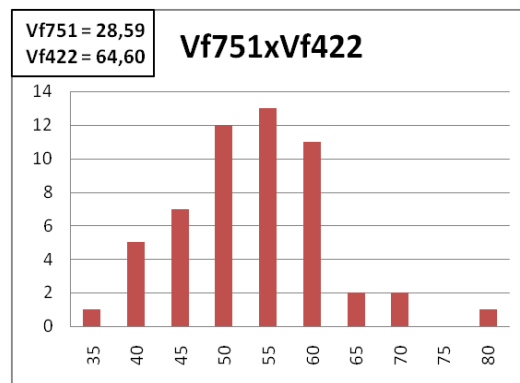


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

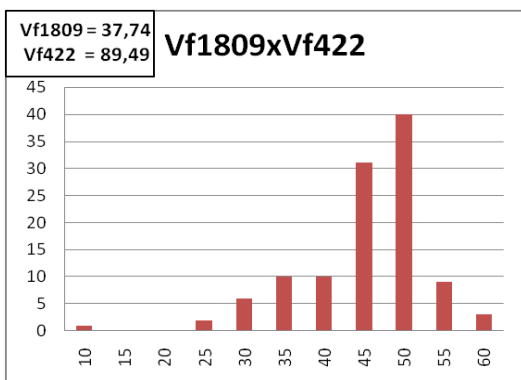


F_{2:3}



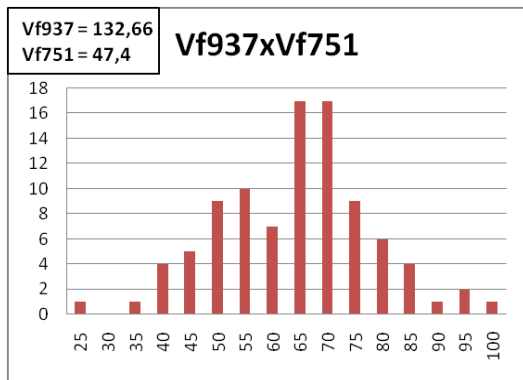
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

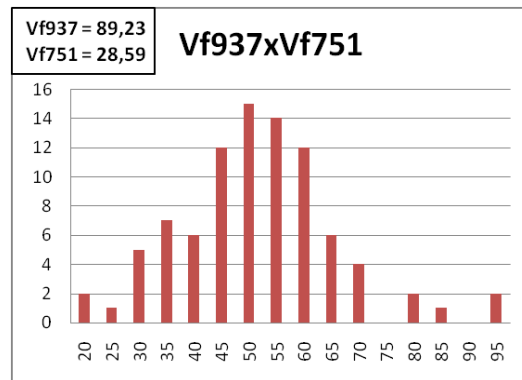


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

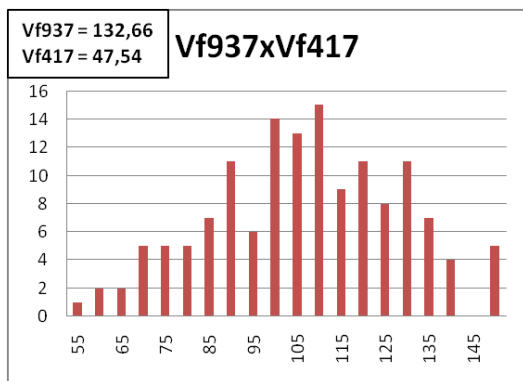


F_{2:3}

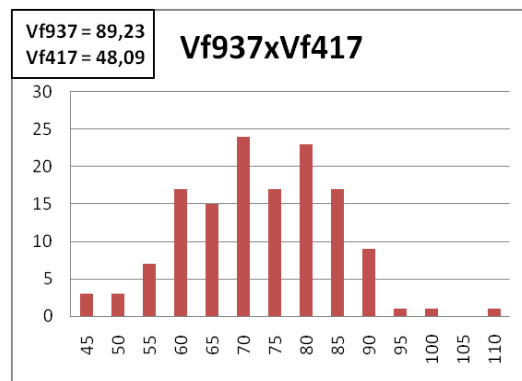


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

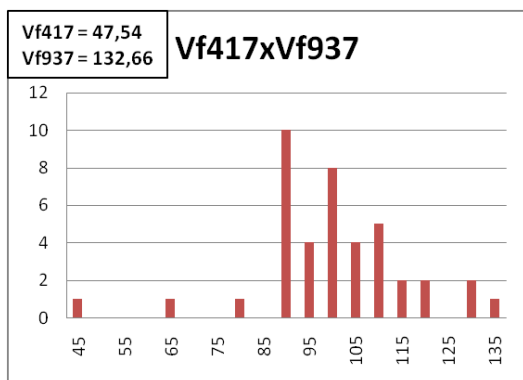


F_{2:3}

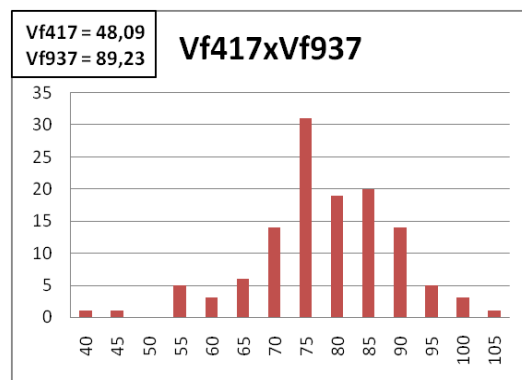


Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

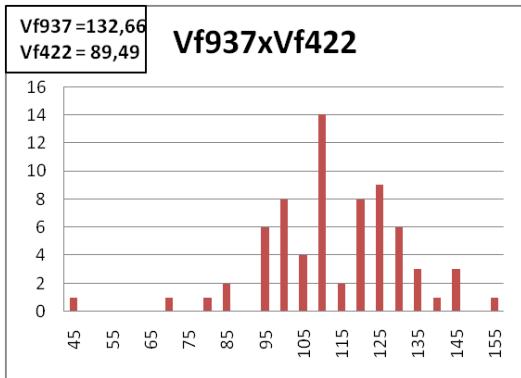


F_{2:3}

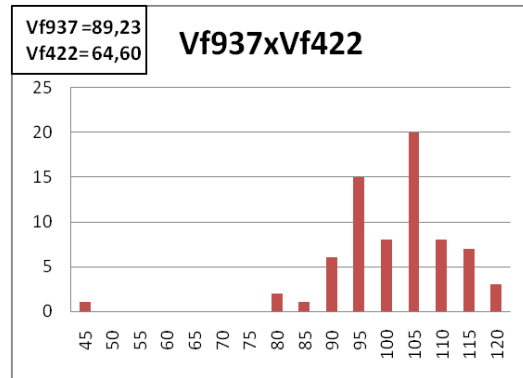


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

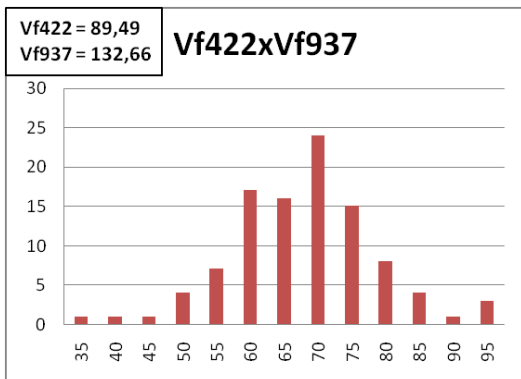


F_{2:3}

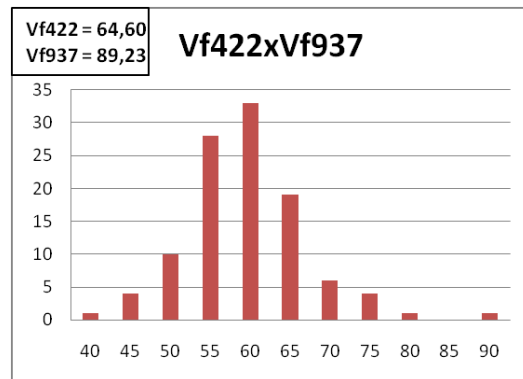


Cruzamiento Vf422xVf937

F₂



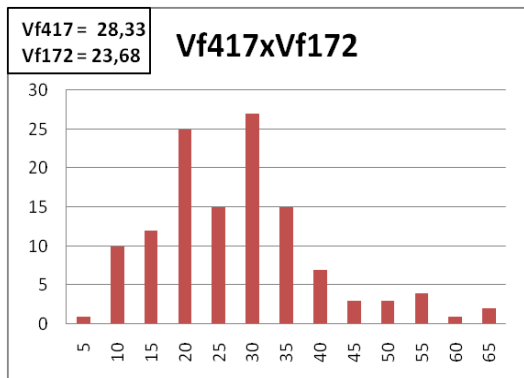
F_{2:3}



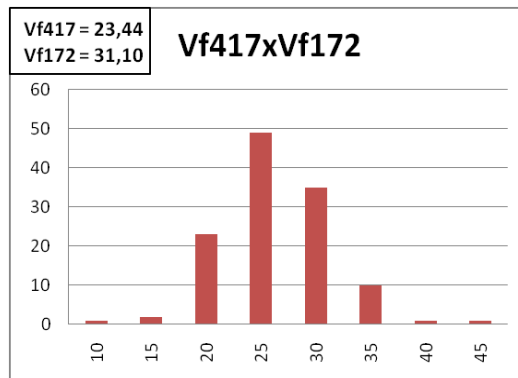
9.- CARÁCTER NÚMERO DE VAINAS POR PLANTA (PPP)

Cruzamiento Vf417xVf172

F₂

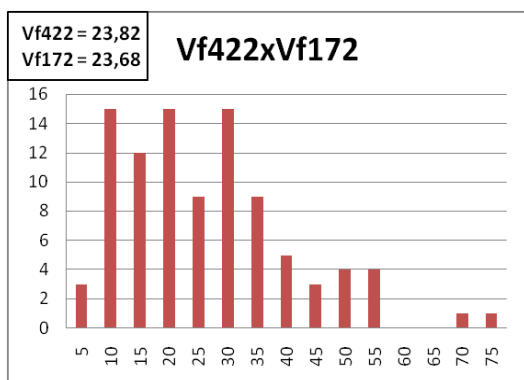


F_{2:3}

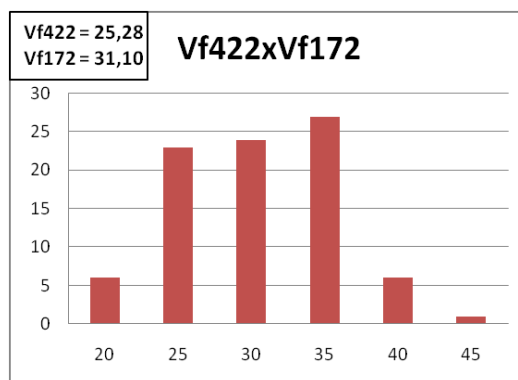


Cruzamiento Vf422xVf172

F₂

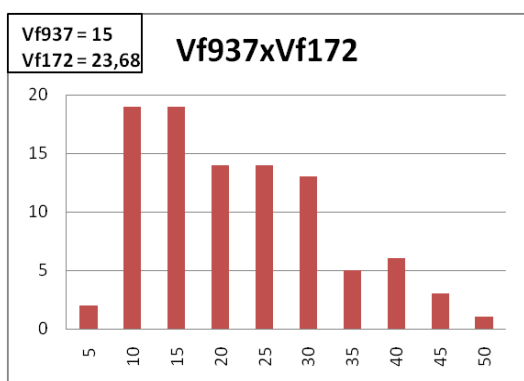


F_{2:3}

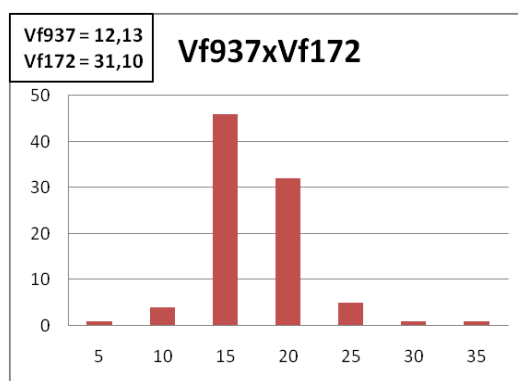


Cruzamiento Vf937xVf172

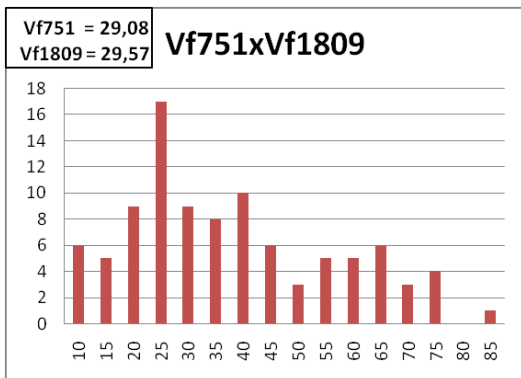
F₂



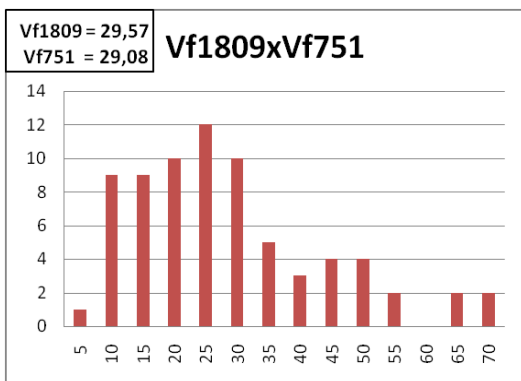
F_{2:3}



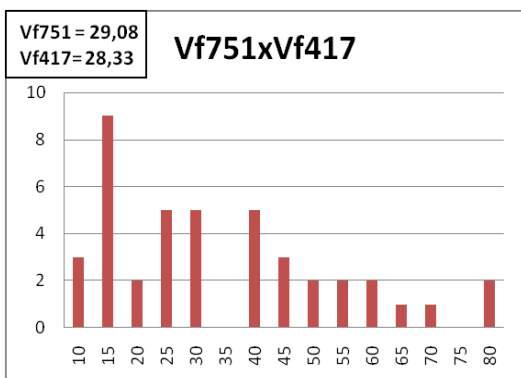
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂

Cruzamiento Vf1809xVf751

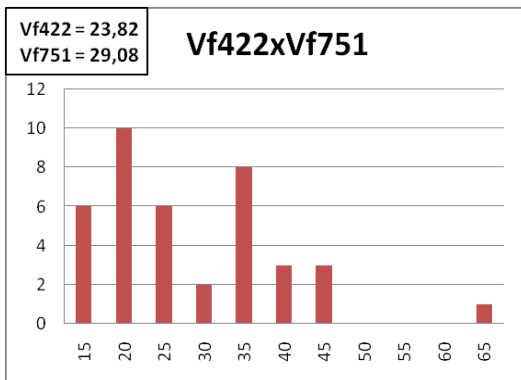
F₂

Cruzamiento Vf751xVf417

F₂

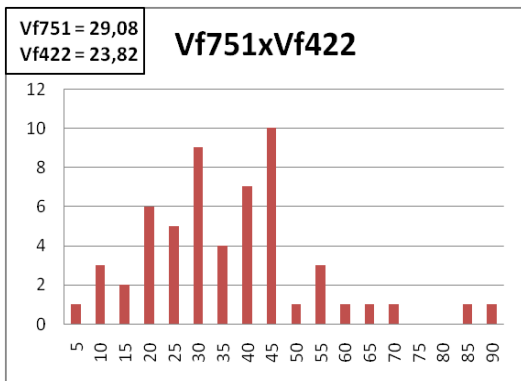
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂

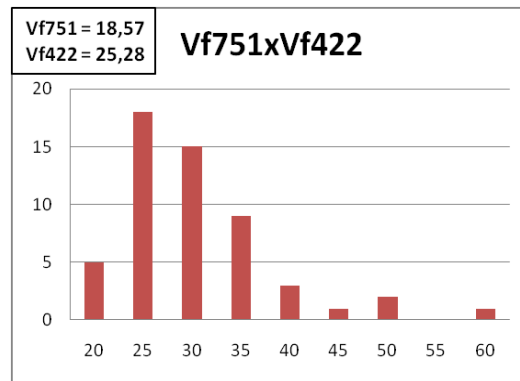


Cruzamiento Vf751xVf422

F₂

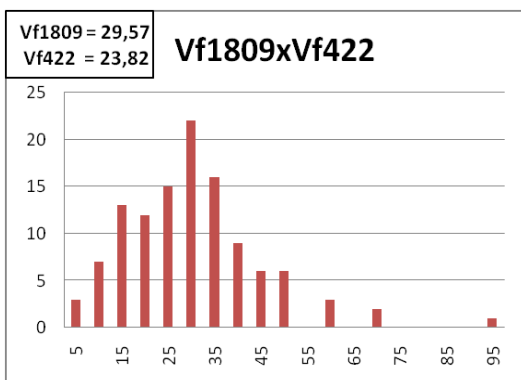


F_{2:3}



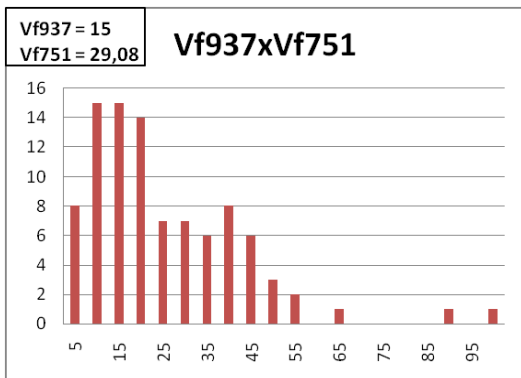
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂

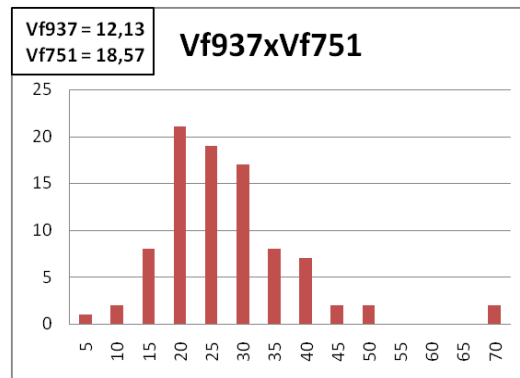


Cruzamiento Vf937xVf751

F₂

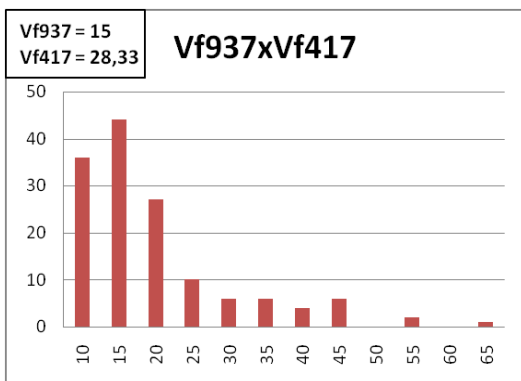


F_{2:3}

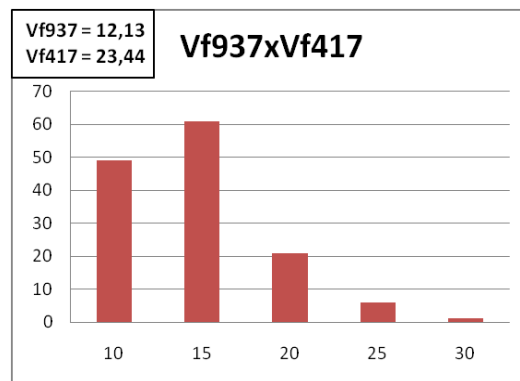


Cruzamiento Vf937xVf417

F₂

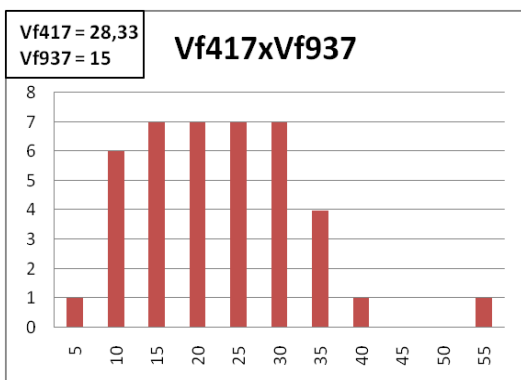


F_{2:3}

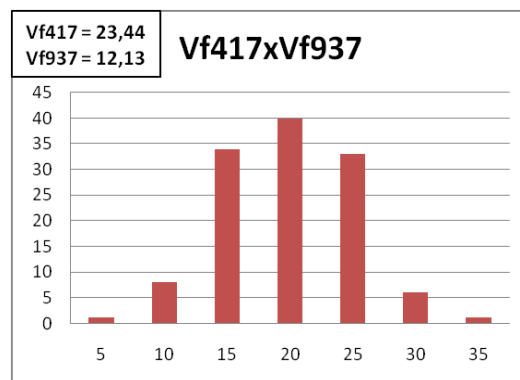


- Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

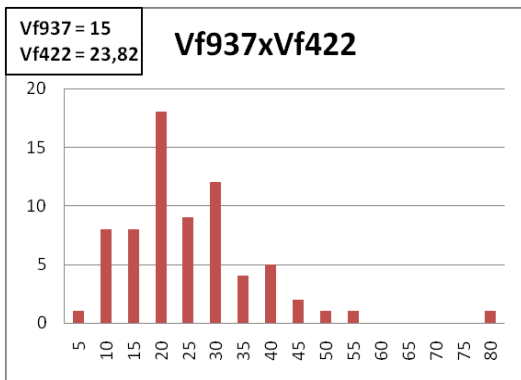


F_{2:3}

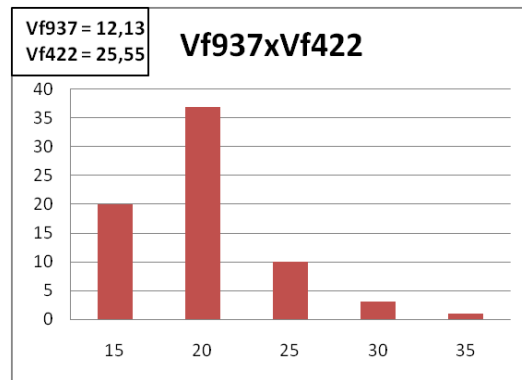


Cruzamiento Vf937xVf422

F₂

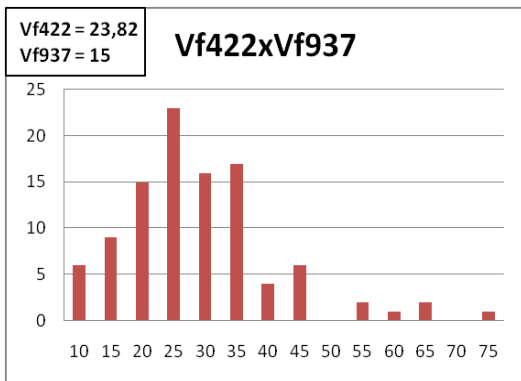


F_{2:3}

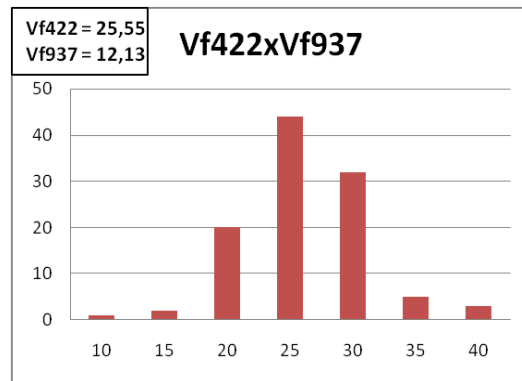


Cruzamiento Vf422xVf937

F₂



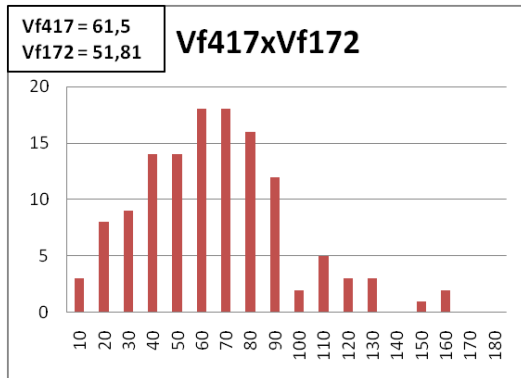
F_{2:3}



10.- CARÁCTER NÚMERO DE GRANOS POR PLANTA (SPP)

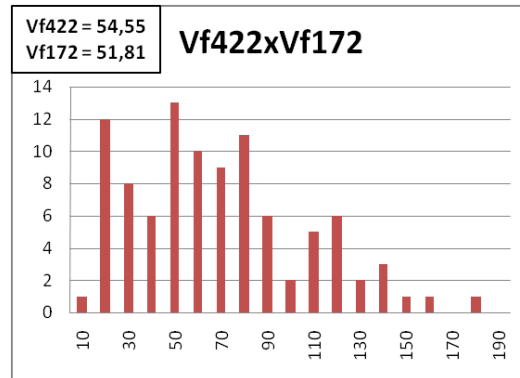
Cruzamiento Vf417xVf172

F₂



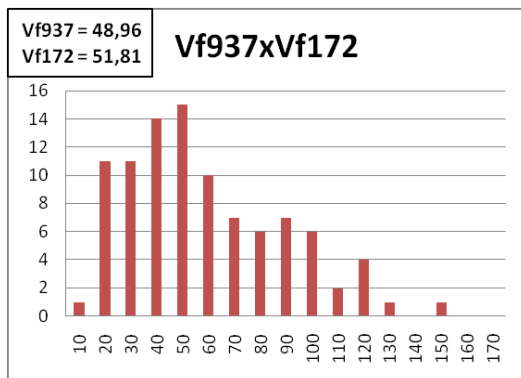
Cruzamiento Vf422xVf172

F₂



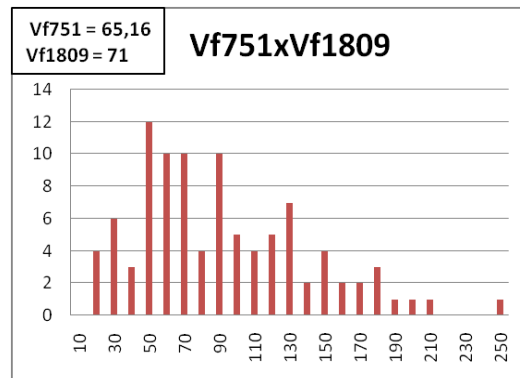
Cruzamiento Vf937xVf172

F₂



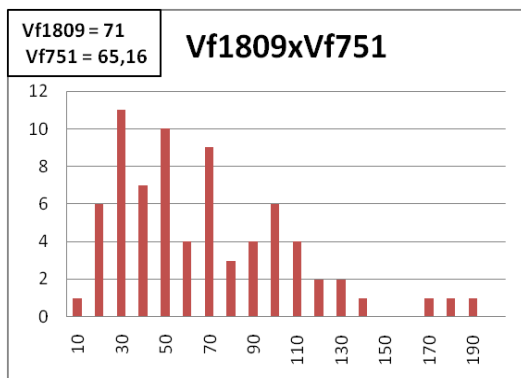
Cruzamiento Vf751xVf1809

F₂



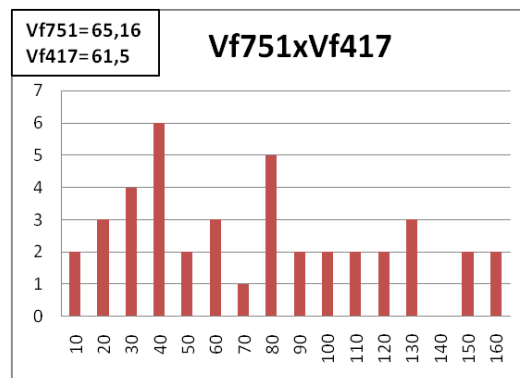
Cruzamiento Vf1809xVf751

F₂



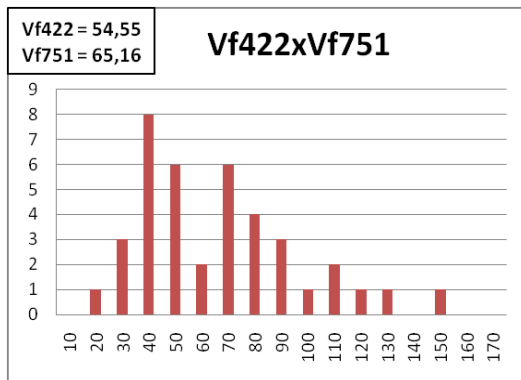
Cruzamiento Vf751xVf417

F₂



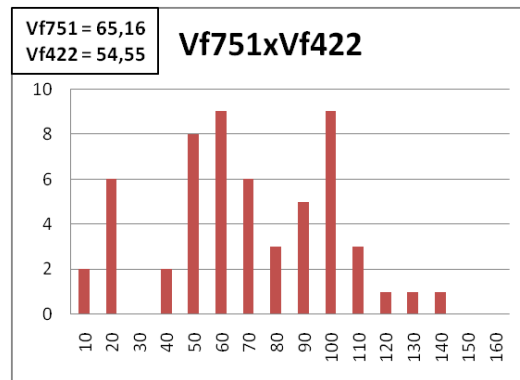
Cruzamiento Vf422xVf751

F₂



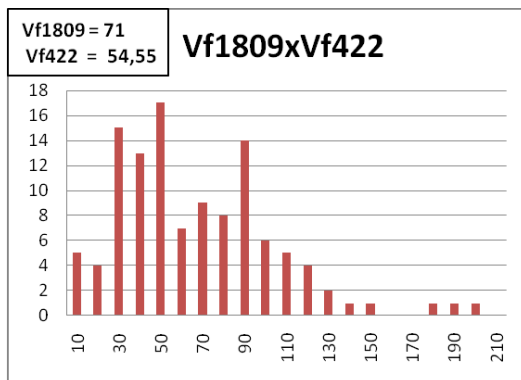
Cruzamiento Vf751xVf422

F₂



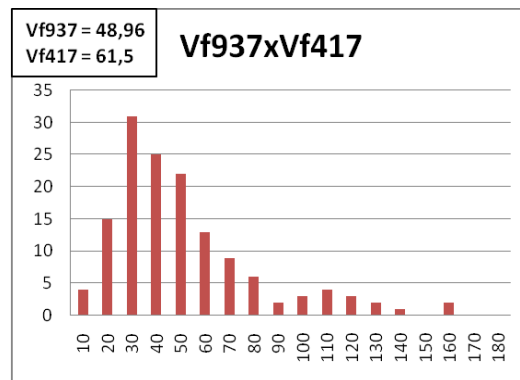
Cruzamiento Vf1809xVf422

F₂



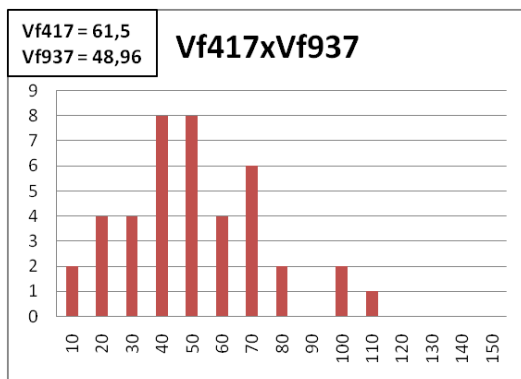
Cruzamiento Vf937xVf417

F₂



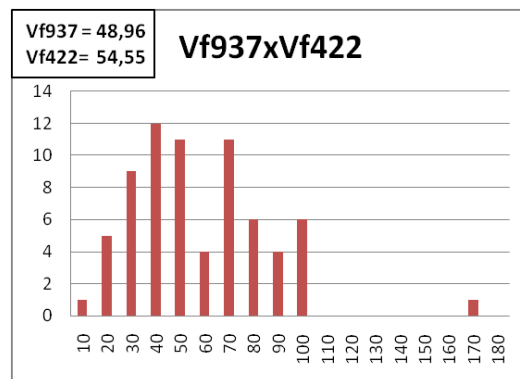
Cruzamiento Vf417xVf937

F₂

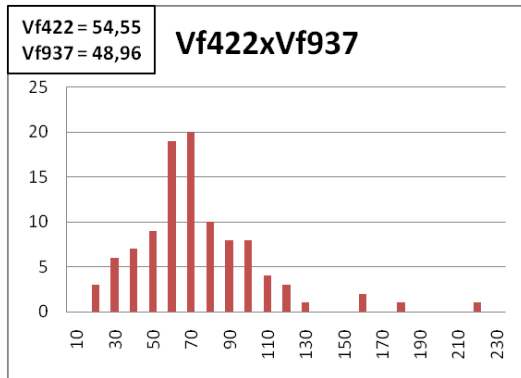


- Cruzamiento Vf937xVf422

F₂



Cruzamiento Vf422xVf937

F₂

ANEXO III

Marcadores para la validación de QTLs en diferentes poblaciones

Tabla 1: Nombre y secuencias de los marcadores testados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Cebador Fw	Cebador Rev	T ^o	Crom ²
M1U059	mtmt_GEN_01106_02_1 (GLIP263)	CACTGGTGCAGAACAAGGAA	CAGAGAAACCCCAACCAAGA	58	I
M1U061	FENR	ATGCTTATGCCAAAAGATCCAAATGC	ATCTTGTCCACCGGGATCAAGCACACA	58	I
M1U063	AnMtL10	CCCGGTTACGAATCTTCGCATC	GATCTAGAGTTGGATTTTGCAAGATC	58	I
M1U064	mtmt_GEN_00446_01_1 (GLIP063)	TCTTCAGGAGGTAGCTGGGA	CAAGGCGAAGAAAGAACGAC	58	I
M1U068	Lup246	ACTAATGCAGATGAGAGGTCTT	ATCCTTGTCCAGAGAGAGTTCC	58	I
M1U079	ASNEP	GAAGAAAAACATGCTTCTGGATCATATA	ATCTTTAACCAATTTATATTGCTGGTGCA	58	I
M1U093	Lup052	CTGGTCTGTCTTCAACTGTA	GTCATATCCTTTCCATGCAC	58	I
M1U094	PEPCASE	TGGCAGCTATATAAGGCTCAGGAG	GAAATACTCAACAAAACGTGGTTCCCTTGA	58	I
M2U345	PRCE	ATGGTGAACCCGCGAAGGGTACTA	CCAAGCATGTACGGATTAATTTCAATA	58	I
MCo002	mtmt_GEN_00036_02_1/a	AATGACGGTAGCTTGGATGG	GAACCCCTTCTCTGGACCTC	60	I
MCo005	mtmt_GEN_00995_01_1 (GLIP331)	ATGGCTAAAGCTCCTGTCCA	TACCAACCATGACCGCTGTA	58	I
MCo006	mtmt_GEN_01102_02_1 (GLIP419)	TCTTGCTATGGCAACTCGTG	GTTGAATCCAGGCTCAGGAA	58	I
MCo027	Pis_GEN_7_1_2_1	TTGATGGCAGCTACAGCAAG	AGTGCTCCTAGCATAGCCCA	60	I
MCo034	psat_EST_00180_01_2	CTTAGCAAACGCCGGAATTA	CGCCTTTGCAAATGAAAGAT	56	I
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_3 (GLIP065)	CAGAAGATGTGCCAAAAGCA	GCTTCCAATGCTTTCCATGT	58	I
MCo058	BGAL	AGACTTGTCTTGGCAGAAATGGTCTTACA	AATATGATACCATTTCTGTGTTGGTTCTCCA	58	I
MCo061	LG007	TTGACGTTGATCTTTACAGCCAGG	TGCAAGAAGAACCTCTTGGACCAG	58	I
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	ATGTCCTTCAAGGCGAGAGA	CCTGGTCTTGGTGTGCGATT	60	I
MCo070	mtmt_GEN_01965_03_1b (GLIP651b)	TTGTTGCAAGCAATGGAGAG	AAGAAGGCCAAGCAAGTTGA	58	I
M1U071	mtmt_GEN_00999_01_1 (GLIP337)	TGCAATGATTTGGGCACTTA	CTTTTGGCCAAGTACCAGGA	58	II
M1U072	Lup123	GCTCTCAGATCTTATCAACCTT	ACTTCACTATCTTCTCCAGGG	58	II
M1U077	Lup242	TTGTCTCTGGTAATTCTCACAC	AGACATGTATGACACCTGATTG	58	II
M1U095	Ms_U515	GTTAAGGGAACCATGACAACCACA	CATTCATTGTCATACCAAGCAACCA	58	II
M1U096	AIGPa	CTGATAGGGCCAGGAGGCAGGGAAGA	GTTTTTTAGCATTTGGACGAATGGTTGGT	58	II
M1U097	LG102	GCCACACCTTGGTTCTAGAGGGC	GGCGTTTGAAGGAGCGTAAAGC	58	II

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. *Gl correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba L.* (Satovic et al. 2013).

Tabla 1 (Continuación): Nombre y secuencias de los marcadores testados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Cebador Fw	Cebador Rev	Tº	Crom ²
M1U098	JUNBP	TCTTCGTCATCATCTTCGGCGATAGCACA	GGATGTGAATGATACCATCCCACGACA	58	II
M1U099	LG107	CAGGCCTTCCTCCTCACATATCTG	GGTACTTGTGATAATTGGTTGGCTCC	58	II
M1U225	mtmt_GEN_01114_05_1	CTGGAGGGATGATGACTGGT	TTGTAGAGCCATTGTCACGC	58	II
M2U305	Pis_GEN_4_3_1	TTGGAGGCGAGTTTCAGTCT	GAAGTTGGTGTCCGGTCTTA	60	II
M2U306	Pis_GEN_58_3_4_1	TGGTGAACCACCAAAGGAAT	CCAAGCAATGGAACCAAAT	58	II
M3U002	Pis_GEN_21_1_1	GTTGAAGATCCTTCCACCGA	CTTCATTCGCAAATCCCAT	56	II
M3U006	psat_EST_00161_01_1	CTGTTGACCTGAGAACGCAA	AAGTCGGGATACCGTGACAG	60	II
MCo009	6DCS	CTCACGAAAGCCATTGGAGCCAGCAACT	TGCCATGAGCATCAGCCAATTCTTTGA	58	II
MCo025	Pis_GEN_20_1_1	CACTTCGCTGGTGTGCTTA	ATCATTCTGCATGGACCACA	58	II
MCo028	Pis_GEN_23_5_6_1	AAGGAGTTGGCTCAAACGA	GCATCAGACAACCTCTGCAA	58	II
MCo030	Pis_GEN_57_1_2_1	ATCCGCAATTGGCGTAATAG	GCCTGTGGTGTATCCATGTG	58	II
MCo033	mtmt_GEN_00103_01_1	TAGAGCAGCAAGTGCTTCCA	CATCCATTGCTTTTCGCTTT	56	II
MCo066	mtmt_GEN_00022_02_1	CCCTCAAGAAAAGCCATTTG	AAGACCAGCAAATGGGACAC	58	II
M1U029	ATCP	AACCAATTGGTATTGCAGCTCAGAGCCA	TTCTTGCCAAGAACAACCGAATGTCA	58	III
M1U030	LSSR9b	CAAAGGATGGTTTCTTGTAGGTC	CCTCGCACATTTCTACCCA	58	III
M1U031	Lup185	GAAGGAGAATTAGGGAGCTTAC	CCACTTCCATGACAAATCT	58	III
M1U033	Lup346	GTCAAGCCGGTATTCAAGT	CCAGATCTACAAATATAGCACG	58	III
M1U036	REP	GCCAATTTCTCGTCGCTACTTC	GCTAAAAGATTCATCTCCGGTATCCA	58	III
M1U044	PTSS4	TGGGATTTTGTCTTTTGTGATAAGGATCAG	TTGGACCATCTCCCAAGTACTTTTGTGTA	58	III
M1U222	mtmt_GEN_00914_04_3	TTGCACTTGCAGAAATGGAG	TGGTAGGGGTATCCGTCGTA	58	III
M1U224	mtmt_GEN_01090_01_1	AGCGTGTATTTCGTCAAGGG	TCAGGTCATCGTCACCGATA	58	III
M1U263	Pis_GEN_8_1_1	GGAATTCAAGGCAACTGAGC	TCACAAAGATCCCACCAACA	58	III
M3U059	SECA (GLIP549)	ATGATCCACGAGAACAATGGGCTTCA	CATAGGTTTGTGTTAGGCACGATTGTA	58	III
MCo001	mtmt_GEN_00012_03_1	CCCAATGGTGGAAATTTGAC	GGATTTTCTGCACGAGGTGT	58	III
MCo014	Lup066	GCTATCTATGACATTTGCAGG	ATTCTAGGATAAGGGACCAAGT	58	III

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. *Gl correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba* L. (Satovic et al. 2013).

Tabla 1 (Continuación): Nombre y secuencias de los marcadores testados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Cebador Fw	Cebador Rev	Tº	Crom ²
MCo029	Pis_GEN_25_2_3_1	TGGGAATGTTCTGCATTGGA	TCCACTGTCCCAGCATTGTA	56	III
MCo050	psat_EST_00190_01_1	CAGGTTGTTGAAGCTCCTGA	GGGAACCTCTTGATCCCAAT	60	III
MCo055	mtmt_GEN_00477_04_1 (GLIP 301)	GACCGGAAAACAATGATGCT	GTAGCCCCAAAAGGACTTC	58	III
M1U002	28d22-5	CCAACCTCTTTTCAAGGGCAGC	TGTCCCAAGCTCCAATTTCC	58	IV
M1U004	PRAT	AGGAGGTAGTTGAGTACATGTCTGACA	GGAAGGAAATGTGTCAAATTCCTCATCA	58	IV
M1U009	28d22-4	CCAACCTCTTTTCAAGGGCAGC	TGTCCCAAGCTCCAATTTCC	58	IV
M1U010	CNGC4	AGAGATGAGAATCAAGAGGAGGGATGCA	CATGATGAAGAGCATTTCGTCCACTGGA	58	IV
M1U016	Lup210	GCGCTCTCTTGACATTGA	TGAAGTGGATTCTAGGATAAGG	58	IV
M1U019	FIS1	TTGCCACAGTAGAAGCAGAAGAGATA	CTGTTTTCATCAACTTCAGCAACTTT	58	IV
M1U022	Ms_U182	TACTGGGAGGTTTTGCAATGGCA	CAAATAAAGTCCTTGCAGCAGGTAG	58	IV
M1U024	LG085	GTGCCAGTCCACCATCATAGCC	CAGCTCCAATCCAGCATCTTGC	58	IV
M1U227	mtmt_GEN_01947_02_1 (GLIP613)	GTAAGTTGCCAGCCCATGT	GCAGCACGGTGTCTCTCTC	58	IV
MCo011	mtmt_GEN_01951_11_1a (GLIP621a)	CATGCTGCTGCATTTGCTAT	AGGAACAGCTACAAGGGGGT	58	IV
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	ACTGGAAAAGGCTCGGAAAT	GTTGCACCTTTCTCTTTCGC	58	IV
MCo053	mtmt_GEN_00861_03_1 (GLIP223)	CTGAGAACACGGAGCACAAA	ATTCCCAGCTTACACGCAAC	58	IV
M1U085	mtmt_GEN_00547_02_2 (GLIP099)	CTTCATGCCAAAATGCTGA	GAAGAAGCACCAAGAGCACC	58	V
M1U087	PESR1	ACAAGCCTAGAAAATCCATTC	CGATATGAGTGTACTCAATTTGTGGTC	58	V
M1U088	Lup036	CTGATATCCATTCACTCAAG	AACACCTGGAAGTCCAATA	58	V
M1U089	CPCB2	AGAAAGAGTGAAGTCTGTGGATCTACATC	GGATGAACAGCCACACACCTAATGTAATC	58	V
M2U304	mtmt_GEN_00016_01_1	TGCCACCAGTTTTAGGTTC	CTTGACCCGTTTGGGTACTT	60	V
M2U307	Pis_GEN_9_3_1	GGCAAGCCTTATTCAGCAAG	CTCCACCTTCTGTGCTCC	60	V
M3U008	psat_EST_00178_01_1	GCGAGAGGAAAACAATTTGGA	CAATTCTCTCCCCAAAGCAG	58	V
M3U057	mtmt_GEN_00768_01_1 (GLIP191)	ATGGATTCAGAACCAGTGGC	GTCAGATTTCCCTCCAGCAG	58	V
MCo042	UNK28	GTAGATTCAATTCAGTGCAGAAAGGCTTTC	TACCAACCCATCAATGTTCTTCTAATTTG	58	V
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	ATCAAAGTTGTCTCCGACCG	CTCCCTGCACCTTCTCTGTC	60	V

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. *Gl correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba L.* (Satovic et al. 2013).

Tabla 1 (Continuación): Nombre y secuencias de los marcadores testados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Cebador Fw	Cebador Rev	Tº	Crom ²
MCo065	Pis_GEN_28_1_1	CGGTGACGGTAGGGAAAGTA	ATCACTTTGCAAGGACCACA	58	V
MCo067	mtmt_GEN_00866_02_1 (GLIP225)	AAAGGCCTGGTCTCAAGGAT	ATCCCTCTTGCACCATCTG	58	V
M1U049	NRT2	GGAAGCTCCATGCATGGAGTA	ATTGCACCCATTGCAAGCCTTGAGA	58	VI
M1U052	tRALS	GGTCTGCGAGCTGTTTTGGAGAAG	GCAATTCCTCCTCAGCTAAAAGTG	58	VI
M1U053	Lup280	GGATGTGACAAACAAGGATT	GAACAGACTTTCTCCTACGTTCT	58	VI
M1U223	mtmt_GEN_01121_09_1	CGCCTTGATTTCGAAAGAGC	ATTTTCCCACTTGATGCCAC	58	VI
MCo004	mtmt_GEN_00892_01_3 (GLIP227)	CTGGTGAACCTGCGAAGAAT	CTCCGGTTCAGTTGAAGAGC	58	VI
MCo013	LG068	CGCACAGGATTTGGTGCAGTTCC	TCCTGGATTCAATTTGGAAGACATTG	58	VI
MCo015	Lup299	TAAGCTATGGGAAAGTCGTACC	GCGATATCAAGACCGTTATTAG	58	VI
MCo031	mtmt_GEN_00024_04_1	TTGGTGATGGATGCTGTTGT	CATCGTCATCTGTGTGACCC	58	VI
MCo054	mtmt_GEN_01115_02_1 (GLIP265)	ATGAGCAAAGAAAGGCCAAA	TACCAGCACGTGGTTGATGT	58	VI
MCo060	HBP2	TTTATGGTCTCCAAAAGTGCAAACCTTTGT	ATATTTGAGATTGCTCCATCAGCTCA	58	VI
M1U105	Lup172	ATTATCTTAGCTATCTCTCCCG	CATCAACAGCATTAGTTCCT	58	GL11*
MCo069	GBNP	GCTTCAAGCTTGTCATCGTCGGCGA	GTATCCCAGCAGTAGAAGCGAATCT	58	GL11*
MCo032	mtmt_GEN_00032_01_1/a	CCTGGAGCAGATGGACAAAT	CAAGCGCATACTCCAGAACA	60	GL16*
MCo035	psmt_EST_00196_01_1	TAGTTATGCTCATGGCGCTG	TGGATTGGTAGGAGACTCGG	60	GL14*
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	CAGTCGTGGGCTGATTTAT	TTCTGCAGGCATAGCAAATG	58	GL01**
M3U007	mtca_EST_00216_01_1	TGGTGGTCATGCTAGTTGGA	GGACAGAAATTGGTGGCAGT	60	GL03**
M3U009	psat_EST_00191_01_1	AACCCGAGCCTTCAACTTCT	TGTTGCTAATCGTGCATCTGA	60	GL12**
M3U058	mtmt_GEN_01149_03_1 (GLIP477)	AAATGGGGTATCAAGAGGG	TTCACCAAAGACCACCCAT	58	GL12**
M1U057	SHMT	ACCACAACCTCACAAGTCACTTC	TTGCTGAGAACCTGCTCTTGGTATG	58	No ligado

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. *GL correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba* L. (Satovic et al. 2013).

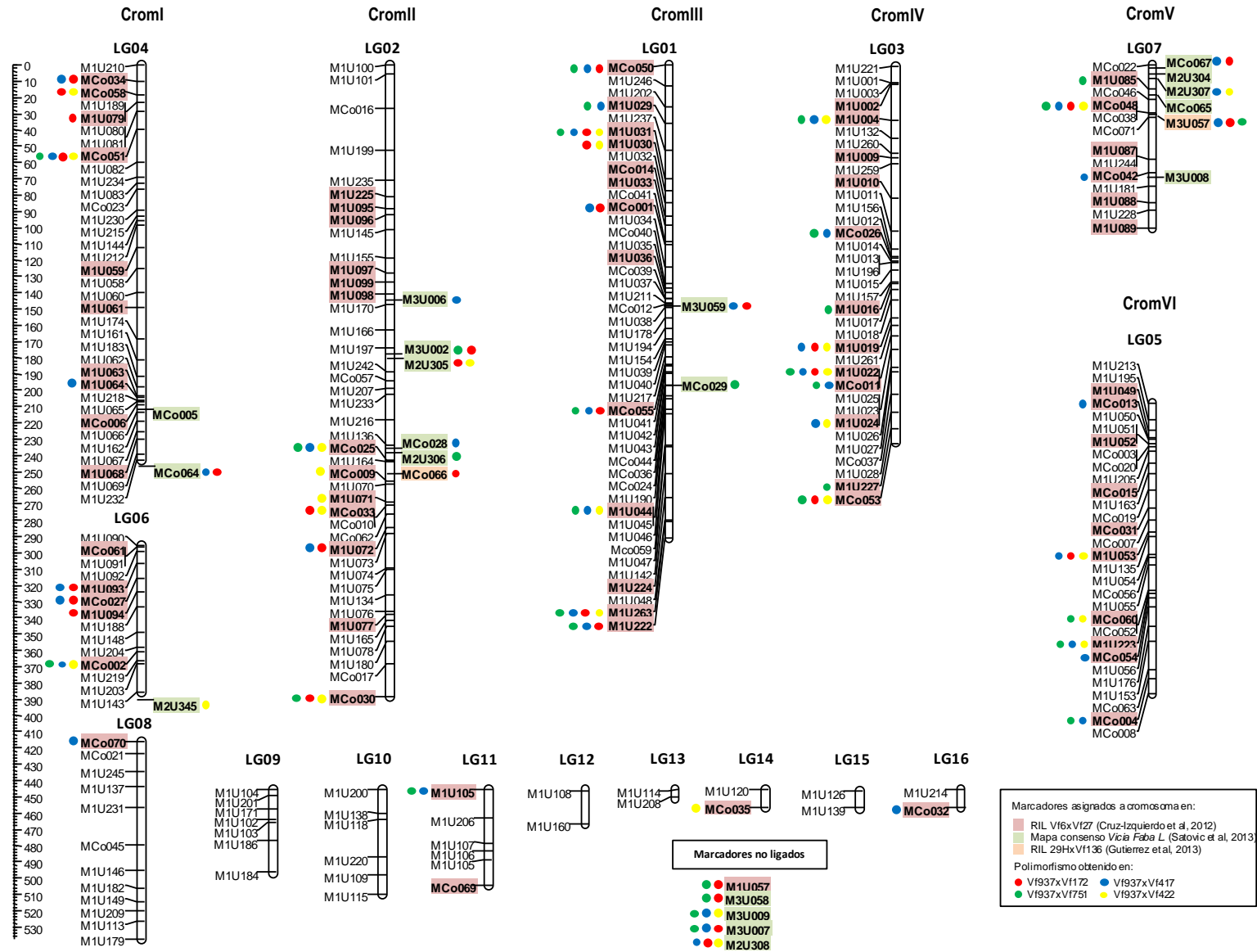


Figura 1: Marcadores testados y polimorfismos encontrados en la validación de QTLs en diferentes poblaciones

ANEXO IV

Polimorfismos detectados en las poblaciones

Tabla 1: Polimorfismo hallados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Crom ²	Vf937xVf172		Vf937xVf751		Vf937xVf417		Vf937xVf422	
			Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo
M1U059	mtmt_GEN_01106_02_1 (GLIP263)	I	303	Monomórfico	303	Monomórfico	303	Monomórfico	303	Monomórfico
M1U061	FENR	I	577/726	M/A	577/726	M/A	726	M/A	377/726	M/A
M1U063	AnMtL10	I	231	Monomórfico		N/A		N/A	231	Monomórfico
M1U064	mtmt_GEN_00446_01_1 (GLIP063)	I	388	Monomórfico	388	Monomórfico	388	CAP(Hinfl)	388	Monomórfico
M1U068	Lup246	I	306	Monomórfico	306	Monomórfico	306	Monomórfico	306	Monomórfico
M1U079	ASNEP	I	704	CAP(HindIII)	704	M/A	704	Monomórfico	704	M/A
M1U093	Lup052	I	1278	CAP(Hinfl)	1278	Monomórfico	623	CAP(HhaI)	1278	Monomórfico
M1U094	PEPCASE	I	417	CAP(Hpy8I)	417	Monomórfico	417	Monomórfico	417	Monomórfico
M2U345	PRCE	I	277/303/456	Monomórfico	277/303/456	Monomórfico	277/303/456	Monomórfico	298/315	ALP
MCo002	mtmt_GEN_00036_02_1/a	I	819	Monomórfico	819	CAP(Asel)	819	CAP(BglII)	819	CAP(BglII)
MCo005	mtmt_GEN_00995_01_1 (GLIP331)	I	356	Monomórfico	356	Monomórfico	356	Monomórfico	356	Monomórfico
MCo006	mtmt_GEN_01102_02_1 (GLIP419)	I	273	Monomórfico	273	Monomórfico	273	Monomórfico	273	Monomórfico
MCo027	Pis_GEN_7_1_2_1	I	775	CAP(Eco130I)	775	M/A	775	CAP(Eco130I)	775	Monomórfico
MCo034	psat_EST_00180_01_2	I	456	CAP(AIuI)	456	Monomórfico	456	ALP	456	Monomórfico
MCo051	mtmt_GEN_00447_04_3 (GLIP065)	I	589/629	ALP	686	CAP(ApoI)	632/662	ALP	603/644	ALP
MCo058	BGAL	I	611	CAP(HpaII)	611	Monomórfico	611	Monomórfico	611	CAP(sau96I)
MCo061	LG007	I	456	Monomórfico	456	Monomórfico	456	Monomórfico	456	Monomórfico
MCo064	Pis_GEN_14_7_1	I	422/460	ALP	304	Monomórfico	422/460	ALP	304	Monomórfico
MCo070	mtmt_GEN_01965_03_1b (GLIP651b)	I	413	Monomórfico	413	Monomórfico	413	CAP(MboII)	413	Monomórfico
M1U071	mtmt_GEN_00999_01_1 (GLIP337)	II	527	Monomórfico	527	Monomórfico	527	Monomórfico	537	CAP(Hinfl)
M1U072	Lup123	II	741	CAP(Hinfl)	741	Monomórfico	741	CAP(NdeI)		N/A
M1U077	Lup242	II		N/A	654	Monomórfico	654	Monomórfico		N/A
M1U095	Ms_U515	II	550	Monomórfico	550	Monomórfico	550	Monomórfico	550	Monomórfico

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. * GI correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba* L (Satovic et al. 2013). NL: No ligado. CAP: Cleaved Amplified Polymorphism. ALP: Amplicon Length Polymorphism, N/A: No Amplifica. M/A: Mala amplificación que hace imposible su lectura.

Tabla 1 (continuación): Polimorfismo hallados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Crom ²	Vf937xVf172		Vf937xVf751		Vf937xVf417		Vf937xVf422	
			Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo
M1U096	AIGPa	II	550/696	Monomórfico	550/696/872	Monomórfico	550/696/872	Monomórfico	550/696/872	Monomórfico
M1U097	LG102	II	489	Monomórfico	489	Monomórfico	489	Monomórfico	489	Monomórfico
M1U098	JUNBP	II	576	Monomórfico	576	Monomórfico	576	Monomórfico	576	Monomórfico
M1U099	LG107	II	678	Monomórfico	678	Monomórfico	679	Monomórfico	678	Monomórfico
M1U225	mtmt_GEN_01114_05_1	II		N/A		N/A		N/A		N/A
M2U305	Pis_GEN_4_3_1	II	659	CAPs(Rsal)	659	Monomórfico	659	M/A	659	CAPs(Rsal)
M2U306	Pis_GEN_58_3_4_1	II	1696	Monomórfico	1696	CAP(Asel)	1696	Monomórfico	1775/1696	M/A
M3U002	Pis_GEN_21_1_1	II	442/508	ALP	442/508	ALP	508	Monomórfico	508	Monomórfico
M3U006	psat_EST_00161_01_1	II	1105	Monomórfico	1105	Monomórfico	1105/982	ALP	1105	Monomórfico
MCo009	6DCS	II	372	Monomórfico	372	Monomórfico	372	Monomórfico	372	CAP(Vspl)
MCo025	Pis_GEN_20_1_1	II	743	Monomórfico	743	CAP(Hinfl)	743/589	ALP	743	CAP(Hinfl)
MCo028	Pis_GEN_23_5_6_1	II	566	Monomórfico	566	Monomórfico	566	CAP(Sau961)	566	Monomórfico
MCo030	Pis_GEN_57_1_2_1	II	1089	CAP(Hhal)	1089	CAP(Eco130)	1089	Monomórfico	1089	CAP(Eco130)
MCo033	mtmt_GEN_00103_01_1	II	940	CAP(Vsp I)	940	Monomórfico	940	Monomórfico	940	CAP(Vsp I)
MCo066	mtmt_GEN_00022_02_1	II	473	ALP	473	Monomórfico	473	Monomórfico		N/A
M1U029	ATCP	III	449	Monomórfico	395/449/539	ALP	395/449/539	ALP	449	Monomórfico
M1U030	LSSR9b	III	404	CAP(Hpy8I)	404	Monomórfico	404	Monomórfico	404	CAP(Hhal)
M1U031	Lup185	III	980	CAP(Ssil)	980	CAP(Hhal)	980/1002	ALP	1002	CAP(Hhal)
M1U033	Lup346	III	793	Monomórfico	793	Monomórfico	793	M/A	793	Monomórfico
M1U036	REP	III	370	Monomórfico	370	Monomórfico	370	Monomórfico	370	Monomórfico
M1U044	PTSS4	III	1479/952	Monomórfico	952	CAP(Asel)	1479/1639	ALP	434	CAP(Asel)
M1U222	mtmt_GEN_00914_04_3	III	473	ALP	473	ALP	473	ALP		N/A
M1U224	mtmt_GEN_01090_01_1	III	305	Monomórfico	305	Monomórfico	305	Monomórfico	305	Monomórfico
M1U263	Pis_GEN_8_1_1	III	492/528	ALP	492	CAP(Hinf I)	492/528	ALP	492/528	ALP
M3U059	SECA (GLIP549)	III	1678	CAP(Asel)	1678	Monomórfico	1200/1978	ALP	1678	Monomórfico

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. * GI correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba L* (Satovic et al. 2013). NL: No ligado. CAP: Cleaved Amplified Polymorphism. ALP: Amplicon Length Polymorphism, N/A: No Amplifica. M/A: Mala amplificación que hace imposible su lectura.

Tabla 1 (continuación): Polimorfismo hallados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Crom ²	Vf937xVf172		Vf937xVf751		Vf937xVf417		Vf937xVf422	
			Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo
MCo001	mtmt_GEN_00012_03_1	III	621/646	ALP	621	Monomórfico	621/646	ALP	621	Monomórfico
MCo014	Lup066	III	306	Monomórfico	306	Monomórfico	306	Monomórfico	306	Monomórfico
MCo029	Pis_GEN_25_2_3_1	III	1179	Monomórfico	1179	CAP(Asel)	1179	Monomórfico	1179	Monomórfico
MCo050	psat_EST_00190_01_1	III	368/397	ALP	368	CAP(Hinfl)	368/397	ALP	397	Monomórfico
MCo055	mtmt_GEN_00477_04_1 (GLIP301)	III	473/409	ALP	473/409	ALP	473/409	ALP	409	Monomórfico
M1U002	28d22-5	IV	403	Monomórfico	403	Monomórfico	403	Monomórfico	403	Monomórfico
M1U004	PRAT	IV	406	Monomórfico	406	CAP(Hpy8I)	406	CAP(Hpy8I)	406	CAP(Hpy8I)
M1U009	28d22-4	IV	427	Monomórfico	427	Monomórfico	427	Monomórfico	427	Monomórfico
M1U010	CNGC4	IV	468	Monomórfico	468	Monomórfico	468	Monomórfico	468	Monomórfico
M1U016	Lup210	IV	302/397	Monomórfico	302/397	CAP(ApoI)	274/302/397	Monomórfico	302/397	Monomórfico
M1U019	FIS1	IV	583	CAP(BglII)	583	Monomórfico	583	CAP(MnII)	583	CAP(MbolI)
M1U022	Ms_U182	IV	1291	CAP(Eco130I)	1291	CAP(ApoI)	1291	CAP(Eco130I)	1261/1220	CAP(Eco130I)
M1U024	LG085	IV	398	Monomórfico	398	Monomórfico	398/452	ALP	398/452	ALP
M1U227	mtmt_GEN_01947_02_1 (GLIP613)	IV	597	Monomórfico	574/597	ALP	597	Monomórfico	643	Monomórfico
MCo011	mtmt_GEN_01951_11_1a (GLIP621a)	IV	295	Monomórfico	284/310	ALP	295	CAP(MnII)	295	Monomórfico
MCo026	Pis_GEN_5_4_5_1	IV	468	Monomórfico	468	CAP(AluI)	468	CAP(AluI)	468	Monomórfico
MCo053	mtmt_GEN_00861_03_1 (GLIP223)	IV	558/640	ALP	536/589	ALP	598	Monomórfico	505	CAP(MluI)
M1U085	mtmt_GEN_00547_02_2 (GLIP099)	V	279	Monomórfico	279	CAP(MseI)	279	Monomórfico	279	Monomórfico
M1U087	PESR1	V	275	Monomórfico	275	Monomórfico	275	Monomórfico	275	Monomórfico
M1U088	Lup036	V	277	Monomórfico	277	Monomórfico	277	Monomórfico	277	Monomórfico
M1U089	CPCB2	V		N/A		N/A		N/A		N/A
M2U304	mtmt_GEN_00016_01_1	V	402	Monomórfico	402	Monomórfico	402	Monomórfico	402	Monomórfico
M2U307	Pis_GEN_9_3_1	V	521	Monomórfico	521	Monomórfico	308	ALP	478/521	ALP
M3U008	psat_EST_00178_01_1	V	393	M/A	393	Monomórfico	393	M/A	393	Monomórfico

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. * GI correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba L* (Satovic et al. 2013). NL: No ligado. CAP: Cleaved Amplified Polymorphism. ALP: Amplicon Length Polymorphism, N/A: No Amplifica. M/A: Mala amplificación que hace imposible su lectura.

Tabla 1 (continuación): Polimorfismo hallados en las poblaciones evaluadas

Nombre del cebador	Nombre del cebador ¹	Crom ²	Vf937xVf172		Vf937xVf751		Vf937xVf417		Vf937xVf422	
			Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo	Tamaño del fragmento	Tipo de polimorfismo
M3U057	mtmt_GEN_00768_01_1 (GLIP191)	V	308/383	ALP	308/389	Monomórfico	308	ALP	308	Monomórfico
MCo042	UNK28	V	558	Monomórfico	558	Monomórfico	558	CAP(Mboll)	558	Monomórfico
MCo048	Pis_GEN_6_3_1	V	318/615	ALP	318/615	ALP	318/370	ALP	318/615	ALP
MCo065	Pis_GEN_28_1_1	V	598/769	Monomórfico	598/769	Monomórfico	598/769	Monomórfico	598/769	Monomórfico
MCo067	mtmt_GEN_00866_02_1 (GLIP225)	V	440	CAP(Ssil)	440	Monomórfico	277	ALP	440	Monomórfico
M1U049	NRT2	VI	368	M/A	368	M/A	368	M/A	368	M/A
M1U052	tRALS	VI	399	Monomórfico	399	Monomórfico	399	Monomórfico	399	Monomórfico
M1U053	Lup280	VI	898/1042	ALP	898	Monomórfico	907/979	ALP	970/1006	ALP
M1U223	mtmt_GEN_01121_09_1	VI	658	Monomórfico	658/576	ALP	1264/576	ALP	658/576	ALP
MCo004	mtmt_GEN_00892_01_3 (GLIP227)	VI	603	Monomórfico	603	CAP(Hinf I)	770	ALP	603	Monomórfico
MCo013	LG068	VI	270	Monomórfico	270	Monomórfico	270	CAP(Ssil)	270	Monomórfico
MCo015	Lup299	VI		N/A		N/A		N/A		N/A
MCo031	mtmt_GEN_00024_04_1	VI	552	Monomórfico	552	Monomórfico	552	M/A	552	Monomórfico
MCo054	mtmt_GEN_01115_02_1 (GLIP265)	VI	365	Monomórfico	365	Monomórfico	282/365	ALP	365	Monomórfico
MCo060	HBP2	VI	407/509	M/A	407/509	CAP(Apol)	407/509	M/A	407/509	CAP(Apol)
M1U105	Lup172	GL11*		N/A	346	ALP	346	ALP		N/A
MCo069	GBNP	GL11*	228	Monomórfico	228	Monomórfico	228	Monomórfico	228	Monomórfico
MCo032	mtmt_GEN_00032_01_1/a	GL16*	1099	Monomórfico	1099	Monomórfico	1099	CAP(Msel)	1099	M/A
MCo035	psmt_EST_00196_01_1	GL14*	719	M/A	719	Monomórfico	719	Monomórfico	719	CAP(Hpall)
M2U308	mtmt_GEN_00481_05_1	GL01**	979/1078	ALP		N/A	979/1088	ALP	441/1088	ALP
M3U007	mtca_EST_00216_01_1	GL03**	688/767	ALP	688	CAP(HaeIII)	688/767	ALP	688	Monomórfico
M3U009	psat_EST_00191_01_1	GL12**	502	Monomórfico	609/675	ALP	609/675	ALP	502/675	ALP
M3U058	mtmt_GEN_01149_03_1 (GLIP477)	GL12**	227	ALP	227/445,887	ALP	484/955	Monomórfico	484/995	Monomórfico
M1U057	SHMT	NL	750	CAP(Asel)	750	CAP(Ndel)	750	Monomórfico	750	Monomórfico

¹ Nombre empleado para el marcador en trabajos previos (revisado por Satovic et al. 2013). ² Cuando no está asignado a cromosoma se indica a que GL está asignado y en qué población. * GI correspondiente a la población Vf6xVf27 (Cruz-Izquierdo, 2009). ** GL correspondiente al mapa compuesto de *V.faba* L (Satovic et al. 2013). NL: No ligado. CAP: Cleaved Amplified Polymorphism. ALP: Amplicon Length Polymorphism, N/A: No Amplifica. M/A: Mala amplificación que hace imposible su lectura.

