



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del Desarrollo Rural  
Sostenible

**TESIS DOCTORAL**

**Estrategias moleculares para la identificación de genes  
implicados en el control de caracteres agronómicos en  
garbanzo (*Cicer arietinum* L.)**

**Employment of molecular approaches for the identification of  
genes involved in the control of agronomic traits in chickpea  
(*Cicer arietinum* L.)**

**Directoras**

Teresa Millán Valenzuela

Josefa Rubio Moreno

**Doctoranda**

Cristina Caballo Linares

**Córdoba, septiembre 2019**

---

TITULO: *Estrategias moleculares para la identificación de genes implicados en el control de caracteres agronómicos en garbanzo (Cicer arietinum L.).*

AUTOR: *Cristina Caballo Linares*

---

© Edita: UCOPress. 2019  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

---





**TÍTULO DE LA TESIS:** “Estrategias moleculares para la identificación de genes implicados en el control de caracteres agronómicos en garbanzo (*Cicer arietinum* L.)”

**DOCTORANDO/A:** Cristina Caballo Linares.

### **INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

Esta tesis se ha basado en profundizar en el conocimiento de dos caracteres que son muy importantes en la mejora de garbanzo: la resistencia a fusarium y el carácter simple/doble vaina. Para llevarla a cabo ha sido necesario desarrollar nuevos materiales segregantes empleando cruzamientos que se han comprobado con marcadores moleculares. Este trabajo inicial ha servido a la doctoranda para familiarizarse con metodología clásica en programas de mejora y ha dado lugar a la primera publicación de esta tesis en la revista *Euphytica*. En cuanto a la búsqueda de genes responsables de la resistencia a fusarium, se ha conseguido saturar la región donde se localizan genes de resistencia a esta enfermedad permitiendo a la doctoranda adquirir experiencia en desarrollo de marcadores moleculares, análisis de ligamiento y utilización de herramientas bioinformáticas para la comparación de mapas genéticos y físicos. De este trabajo ha surgido una publicación en la revista *Molecular Breeding*. A partir de estos resultados se han seleccionado genes candidatos para analizar su expresión, realizando ensayos bajo condiciones controladas y análisis con RT-qPCR. Los resultados se han enviado a la revista *PlosOne*. Finalmente, se han abordado estudios para determinar el gen candidato del carácter simple/doble vaina en garbanzo empleando diferentes metodologías. Los resultados indican que el gen *CaRAX2* es el que controla este carácter.

La doctoranda ha mostrado un gran espíritu de trabajo y dedicación, así como habilidades para trabajar en equipo. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, septiembre de 2019

Firma del/de los director/es

Fdo.: Teresa Millán Valenzuela

Fdo.: Josefa Rubio Moreno



El presente trabajo se enmarca dentro de los proyectos INIA RTA2013-00025 titulado “Empleo de herramientas genómicas para la revalorización y mejora de leguminosas (habas y garbanzos)” y RTA2017-00041 titulado “Integración de herramientas genómicas y bioinformáticas para la mejora de leguminosas tradicionales (habas y garbanzos)” en los que han participado los grupos de investigación andaluces AGR237 (Dpto. de Genómica y Biotecnología del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera) y AGR114 (Dpto. de Genética de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes de la Universidad de Córdoba).  
La doctoranda agradece la concesión de una beca predoctoral INIA-CCAA.



A mi familia





## Agradecimientos

Siempre he pensado que los agradecimientos de las tesis es la única parte que todo el mundo se lee. Cuando orgulloso de tu trabajo le das tu tesis encuadernada a alguien cercano a ti, pero ajeno a tu tema de estudio, puedes dar por sentado que lo primero (si no lo único) que leerá son los agradecimientos buscando su nombre...yo también lo he hecho.

Le he dado muchas vueltas a como quería escribir este apartado, a cómo hacerlo de una manera personal sin caer en tópicos, y cuáles eran los nombres de todas las personas a las que quería agradecer su compañía en este camino, y he llegado a la conclusión de que no puedo, no puedo nombrar a cada una de las personas a las que tengo algo que agradecer porque no terminaría nunca, así que con el fin de evitar hacer esto demasiado largo y olvidarme de nombrar a alguien, no daré nombres, solo diré que GRACIAS, gracias a ti que me has ayudado, me has enseñado, has sembrado en mí la semilla de la investigación, has estado conmigo en mis penas y alegrías, has aguantado mis agobios, me has abrazado cuando he reído o he llorado, gracias a ti por los momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio, gracias a todos aquellos que traspasaron la frontera de compañeros a amigos y a aquellos amigos con los que ya contaba y me han seguido acompañando.

Gracias sinceras a mis compañeros del departamento de Fisiología Vegetal donde empecé mis andadas, gracias a los compañeros del IBMCP de Valencia que me acogieron y me hicieron sentir como en casa, gracias a mis grupos de la UCO y del IFAPA con los que tanto he compartido y gracias a mis Amigos, sin cada uno de vosotros este trabajo no habría sido posible.

Gracias de corazón a mis directoras Teresa y Jose, no podría haber imaginado unas directoras mejores, con vuestro apoyo y vuestra cercanía me habéis facilitado enormemente este, a veces arduo, camino. Gracias por transmitirme vuestros conocimientos y ayudarme en cada paso de esta etapa. Gracias por confiar en mí.

Gracias a mi familia por escuchar mis quejas sobre PCRs, SNPs y microsatélites y darme la razón aún sin saber muy bien de que les estaba hablando, gracias por ayudarme y acompañarme.

Y por último, gracias a Cristian mi compañero de vida, que ha celebrado conmigo mis logros al igual que ha sufrido mis fracasos. Esta tesis también es tuya.

A cada uno de vosotros, GRACIAS!



**Nota:** A fin de establecer una coherencia formal a lo largo del presente documento, se han uniformado las referencias y se han editados los trabajos originales, eliminando de los mismos el apartado de referencias, el cual ha sido agrupado al final del documento.



# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>5</b>
1. El garbanzo: aspectos generales .....	7
1.1. Origen e importancia económica .....	9
2. Mejora del garbanzo .....	10
2.1. Caracteres estudiados.....	12
2.1.1. Resistencia a fusarium .....	12
2.1.2. Carácter simple/doble vaina.....	15
3. Empleo de herramientas genómicas en la mejora del garbanzo.....	16
3.1. Mapas genéticos.....	16
3.2. Secuenciación del genoma de garbanzo y mapas saturados .....	17
4. Métodos y técnicas empleados en esta tesis .....	18
4.1. Cruzamientos .....	18
4.2. PCR convencional y RT-qPCR .....	19
4.3. Hibridación <i>in situ</i> (ISH) .....	20
4.4. Microscopía electrónica.....	21
5. Bioinformática.....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>USO DE LOS MARCADORES MOLECULARES STMS (SEQUENCE TAGGED MICROSATELLITE SITE) PARA CONFIRMAR CRUZAMIENTOS CONTROLADOS EN LOS PROGRAMAS DE MEJORA DE GARBANZO (<i>Cicer arietinum</i> L.)</b> .....	<b>27</b>
Resumen .....	29
Abstract .....	31
1. Introduction .....	33
2. Materials and methods.....	35
2.1. Plant materials .....	35
2.2. DNA extraction and analysis with molecular markers .....	36
3. Results .....	39
4. Discussion .....	43
Acknowledgements .....	45

## **CAPÍTULO II**

### **SATURACIÓN DE LA REGIÓN GENÓMICA IMPLICADA EN LA RESISTENCIA A FUSARIUM (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*) RAZA 5 EN GARBANZO ..... 47**

Resumen .....	49
Abstract .....	51
1. Introduction .....	53
2. Materials and methods .....	55
2.1. Plant material .....	55
2.2. Evaluation of resistance to Foc5 .....	55
2.3. DNA extraction and marker analysis .....	56
2.4. Cluster analysis .....	58
3. Result .....	58
4. Discussion .....	63
Acknowledgements .....	67
Supplementary material .....	68

## **CAPÍTULO III**

### **ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS ASOCIADOS A LA RAZA 5 DE FUSARIUM EN GARBANZO ..... 79**

Resumen .....	81
Abstract .....	83
1. Introduction .....	85
2. Materials and methods .....	86
2.1. Plant material .....	86
2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> race 5 inoculation .....	87
2.3. RNA isolation, cDNA synthesis and quality controls .....	87
2.4. Primer design and quality controls .....	88
2.5. Real-time qPCR assays .....	91
2.6. Reference genes selection and qPCR data analysis .....	91
3. Results and Discussion .....	92
3.1. Disease development .....	92
3.2. qPCR assays .....	93
3.3. Analysis of the interaction time course .....	94
3.4. Higher expression levels in the resistant NIL .....	95
3.5. Higher expression levels in susceptible NIL .....	98
4. Concluding remarks .....	99

Acknowledgements .....	100
Supplementary material.....	101
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>EL GEN <i>SFL</i>/Ca<i>RAX2</i> CONTROLA EL CARÁCTER SIMPLE/DOBLE VAINA EN GARBANZO.....</b>	<b>105</b>
Resumen .....	107
1. Introducción.....	109
2. Material y métodos .....	111
2.1. Material vegetal .....	111
2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	112
2.3. Evaluación fenotípica .....	112
2.4. Genotipado y secuenciación .....	112
2.5. Análisis bioinformático .....	113
2.6. Hibridación <i>in situ</i> .....	113
2.7. Cruzamientos .....	114
3. Resultados .....	114
3.1. Efecto de las mutaciones de <i>SFL</i> en el desarrollo del garbanzo.....	114
3.2. Identificación de candidatos para el gen <i>SFL</i> .....	116
3.3. Identificación y análisis de nuevos alelos de doble vaina .....	117
3.4. Hibridación <i>in situ</i> .....	120
4. Discusión .....	120
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN GENERAL

- Figura 1.** Flores y semillas de garbanzo tipo desi (izquierda) y kabuli (derecha) ..... 7
- Figura 2.** Serie histórica de la superficie cultivada y producción del cultivo de garbanzo en España (MAPAMA 2018) ..... 10
- Figura 3.** Cultivo de garbanzo con ataque de fusarium en Escacena del Campo, Huelva ..... 12
- Figura 4.** Vainas de garbanzo simple (izquierda), doble (centro) y triple (derecha) ..... 15
- Figura 5.** Pasos empleados en la realización de cruzamientos en garbanzo ..... 19

## CAPÍTULO I

- Figure 1.** Amplification profile of STMS marker TA80 for parental genotypes and F1 plants in case of the B (OF) ..... 41
- Figure 2.** Amplification profile of the STMS marker TA14 in case of the C (DP). a) homozygous female parent b) homozygous male parent c) the F1 plant presenting alleles from both parents (heterozygous) confirming its hybrid nature and d) the F1 plant presenting only the female allele (homozygous) indicating its self-nature ..... 43

## CAPÍTULO II

- Figure 1.** (a) Schematic diagram of the target region associated to Foc5 showing the distribution of the markers used by their physical positions in chickpea Ca2. (b) NILs recombination events, where black boxes represent different alleles than expected according to their phenotype, narrowing down the area between TA110 and CaGM07922. (c) RILs recombination events, where black boxes represent alleles different alleles than expected according to their phenotype showing that the target region is flanked by TA59 and CaGM07922 markers. (d) Patterns of SNPs in four representative accessions of the collection. SNPs useful for MAS are in bold and underlined ..... 59
- Figure 2.** UPGMA dendrogram obtained from cluster analysis of 32 chickpea genotypes with different reactions to Foc5, based on Jaccard's coefficient of similarity using 29 SNPs markers ..... 64

## CAPÍTULO III

- Figure 1.** Cross-sectioned stems after six weeks of inoculation. (A) Resistant line to fusarium race 5 (RIP8-94-5). (B) Susceptible line to fusarium race 5 (RIP8-94-11) ..... 93
- Figure 2.** Hierarchical clustering analysis. (A) The heatmap was constructed using the log<sub>2</sub>-transformed expression levels. Columns represent sample comparisons, while rows represent candidate genes. Color scale,

representing log<sub>2</sub> expression differences between inoculated/non-inoculated plants, is shown in the bar. R and S represent resistant and susceptible NILs; 24, 48 and 72 represent hours after inoculation. (B) Expression profiles of differentially expressed genes peaked at 24 hpi in roots of the resistant genotype. (C) Expression profiles of differentially expressed genes peaked at 48 hpi in roots of the susceptible genotype. The mean expression average of each cluster is shown in black ..... 95

**Figure 3.** Expression profile of candidate genes in roots of chickpea over the time-course experiment. Red line shows the averaged expression level in resistant NILs, whereas blue line describes the averaged level in the susceptible NILs..... 97

#### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Inflorescencias de garbanzo A) silvestre (NIL5-1V, simple vaina) y B) mutante *sfl-d* (NIL5-2V, doble vaina). Micrografías electrónica de barrido del ápice de inflorescencia en los genotipos C) NIL5-1V y D) NIL5-2V. Meristemo I1 (I1), meristemo I2 (I2) y meristemo floral (F) ..... 115

**Figura 2.** Región en el Ca6 de garbanzo asociada al carácter simple/doble vaina que incluye siete genes (Ali et al. 2016). En amarillo se indica la delección detectada en este estudio que afecta a tres de los siete genes..... 117

**Figura 3.** Alineamiento de las secuencias de proteínas *CaRAX2-like* en diez especies de plantas. El cambio de aminoácidos observado en los genotipos doble vaina AOS1, LINE6560 y LINE6581 aparece resaltado en amarillo ..... 119

**Figura 4.** Hibridaciones *in situ* en cortes seriados de meristemos de una pareja de NILs (NIL5-1V/2V) con los genes A) *CaRAX2-like* y *CaVEG1* y B) *CaRAX2-like* y *CaPIM* ..... 120

# ÍNDICE DE TABLAS

## CAPÍTULO I

**Table 1.** Microsatellite markers (STMS) used in this study, their fluorescent dye, amplification range (bp), genome location, physical map position and primers sequences ..... 38

**Table 2.** Crosses realised in case A (AB-FW), F<sub>1</sub> seeds obtained and their hybrid nature verified using STMS markers TA78 and TA96 ..... 40

**Table 3.** Crosses performed in case B (OF), F<sub>1</sub> seeds obtained and their hybrid nature verified by STMS marker TA80 ..... 41

**Table 4.** Crosses realised in case C (DP), F<sub>1</sub> seeds obtained and their hybrid nature verified by STMS marker TA14 ..... 42

## CAPÍTULO II

**Table 1.** Molecular markers used to screen chickpea segregant material, type of marker, primer pairs sequences, marker physical positions and source . 57

**Table 2.** List of genes in the reduced interval delimited by TA59 and CaGM07797 ..... 61

**Table 3.** Results of indicative NILs and RILs screening using SNPs following the physical position. Shaded areas indicate different alleles than expected because of a recombination event ..... 62

## CAPÍTULO III

**Table 1.** Primers for RT-qPCR. Chickpea identifier annotation NCBI, primer sequences, amplicon size and chromosome position. Primer PCR efficiency and PCR product T<sub>m</sub> data represent mean values ± sd. PCR efficiencies (E) calculated according to the equation  $(1 + E) = 10^{\text{slope}}$  ..... 89

## CAPÍTULO IV

**Tabla 1.** Valores medios de ramificaciones (media ± error típico) evaluados en la pareja NIL5-1V/2V ..... 116

# ÍNDICE DE MATERIAL SUPLEMENTARIO

## CAPÍTULO II

- Table S-1.** Chickpea genotypes phenotyped for resistance reaction to Foc5 used in this study. This plant material include near isogenic lines (NILs), recombinant inbred line populations (RIPs) and accessions from a collection ..... 68
- Table S-2.** Primer pairs sequences, size (bp) of amplicons, annealing temperature, extend primers, SNP variation and physical positions in Ca2 of SNPs markers used to narrow down the target region associated to Foc5 resistance ..... 74
- Table S-3.** Results of resistance reaction to Foc5 (R=resistant and S=susceptible) and genotype in markers analysed in three RIL populations (RIP 5, 8 and 12) (a=mother allele, b=father allele, m= missing values)..... 75
- Table S-4.** Results of the 29 informative SNPs ordered by their physical position evaluated in a collection of 32 genotypes differing in their resistant reaction to Foc5. CDC-Frontier was used as reference..... 77

## CAPÍTULO III

- Figure S-1.** Modeling of secondary structures of the amplicons for the assays designed in this study. Thermodynamic stability ( $\Delta G$ , kcal/mol) is presented in the figure. Primers are indicated by black arrows. Although some secondary structures might be present where primers anneal for some assays, they have a positive  $\Delta G$  value and  $T_m < 60$  °C, and hence will not influence the amplification efficiency..... 101
- Figure S-2.** Dissociation curves for the 22 PCR products..... 101
- Figure S-3.** Stability ranking of four reference genes from chickpea series. Numbers on top of the bars indicate the CV values of the reference involved in the normalization. References showing the highest stable expression ( $M < 0.5$  and  $CV < 0.25$ ) are represented in black colour. .... 102
- Figure S-4.** Evaluation of reference genes for chickpea samples. .... 102
- Table S-1.** Expression ratios of genes in resistant and susceptible plants over the time-course experiment. Values indicate  $\log_2$  average expression ratios of infected plants (resistant / susceptible). Bold text indicates statistically significant regulation (  $P < 0.05$ ). .... 103

## CAPÍTULO IV

- Tabla S-1.** Nomenclatura, temperatura de fusión al ADN y secuencias de los cebadores utilizados en este estudio..... 126
- Tabla S-2.** Secuencia de las sondas empleadas para la hibridación *in situ* de 3 genes en meristemos apicales de garbanzo ..... 128
- Tabla S-3.** Número de ramificaciones de NIL5-1V y NIL5-2V ..... 129



## RESUMEN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa de grano más cultivada en el mundo. Las principales enfermedades que afectan a este cultivo son el fusarium y la rabia. Tradicionalmente el método más eficaz para controlar estas enfermedades ha sido el desarrollo de cultivares resistentes para estabilizar los rendimientos del cultivo. Desde que se demostró que las plantas tenían sexo, en los programas de mejora vegetal se incluye la realización de cruzamientos para la obtención de individuos con nuevas combinaciones de genes. En el capítulo I de esta tesis se muestra un estudio de programas de cruzamientos y el uso de marcadores moleculares STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site) para evaluar la naturaleza híbrida de las F<sub>1</sub> obtenidas. Estos marcadores resultaron ser una valiosa herramienta para la detección de híbridos, ya que son fáciles de visualizar y tienen un bajo coste. Fusarium en garbanzo está causada por el hongo del suelo *Fusarium oxysporum*. sp. *ciceris* (Foc), siendo la raza 5 (Foc5) la más importante en la Cuenca Mediterránea. En el capítulo II, ha sido posible delimitar a 820 kb el área relacionada con la resistencia a Foc5 en el cromosoma 2 de garbanzo. Para ello se han analizado marcadores STMS, marcadores específicos de genes y SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), ubicados en la región interés, en RILs (líneas recombinantes) y NILs (líneas casi isogénicas). En esta región del genoma hay 26 genes, entre ellos una proteína quinasa (LOC101511605) que podría considerarse un gen candidato por su posible implicación en reacciones de resistencia. En el mismo estudio, se analizó una colección de 32 genotipos que diferían en su reacción a Foc5 utilizando marcadores SNPs. El análisis de estos marcadores con métodos de agrupamiento mostró cuatro grupos principales de genotipos, tres de ellos agruparon los genotipos resistentes y el cuarto los genotipos susceptibles. Seis de los SNPs utilizados en este estudio mostraron el mismo patrón entre las líneas resistentes y diferente de las susceptibles, por lo que podrían ser interesantes para su uso en selección asistida por marcadores. Continuando con este contexto, en el capítulo III, utilizando una pareja de NILs que difiere en su reacción a Foc5, se realizaron estudios de expresión de los genes candidatos con PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados mostraron que la NIL resistente indujo un grupo de genes a las 24 horas después

de la inoculación, mientras que la NIL susceptible indujo un segundo grupo de genes, diferentes a los inducidos por la línea resistente, a las 48 horas. En el último capítulo (IV) se ha identificado y caracterizado el gen implicado en el control del carácter simple/doble vaina. El garbanzo normalmente tiene una flor por nudo, pero se han descrito mutantes con dos o más flores, característica interesante desde el punto de vista agronómico. En estudios previos, la mutación doble vaina del genotipo JG62 (doble vaina) se localizó en el cromosoma 6 en una región de 92,6 kb con 7 genes, señalando a *CaRAX2-like* por su función como principal candidato en el control de este carácter. En este trabajo se ha identificado una deleción de 44 kb en JG62 que incluye, entre otros, a *CaRAX2-like*, este alelo se ha denominado *sfl-d<sub>1</sub>*. Por otro lado, utilizando líneas doble vaina procedentes de una colección del USDA se ha encontrado un nuevo alelo para doble vaina en el mismo locus con una mutación puntual en *CaRAX2-like*, denominado *sfl-d<sub>2</sub>*. Se ha realizado una caracterización funcional mediante microscopía SEM e hibridación *in situ* y se ha utilizado diferente material vegetal para realizar cruzamientos controlados. Todo esto nos ha permitido confirmar a *CaRAX2* como el gen que controla el carácter simple/doble vaina en garbanzo.

## SUMMARY

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the second most important cultivated grain legume in the world in terms of cultivated area. The most important diseases affecting this crop are fusarium wilt and ascochyta blight. The development of resistant cultivars is the most effective method of managing these diseases and stabilizing chickpea yields. Since it was shown that plants had sex, the use of crosses were included in breeding programs to obtain individuals with new combinations of genes. Chapter I of this thesis shows a study about the use of STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site) molecular markers to test the hybrid nature of the F<sub>1</sub> obtained in crossing programs. These markers have been proved to be a valuable tool to detect hybrids, being simple to visualize and having a low cost. Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* (Foc), is the major soil-borne fungus affecting this crop, being race 5 (Foc5) the main problem in the Mediterranean basin. In chapter II it describes how it has been possible to delimit the area related to resistance to Foc5 on chromosome 2 of chickpea at 820 kb. For this purpose, STMS markers, gene-specific markers and SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), located in the region of interest, were analyzed in RILs (Recombinant Inbred Lines) and NILs (Near Isogenic Lines). In this window there are 26 genes, including a protein kinase (LOC101511605) that could be considered a candidate gene for their possible implication in resistance reactions. In the same study a collection of 32 genotypes differing in their reactions to Foc5 were analyzed using SNPs markers. The analysis of these markers with clustering methods showed four main groups, three of them grouped resistant genotypes since the fourth one just included susceptible lines. Six of those SNPs were coincident among resistant lines and different from the susceptible ones so, they would be useful in marker-assisted selection. In continuity with this topic, in chapter III, we carried out expression studies by quantitative real-time PCR to analyze the candidate genes in the target region using a pair of NILs differing in their sensitivity to Foc5. Results showed that a cluster of genes were induced by the resistant NIL at 24 hpi (hours post-inoculation), whereas a second cluster contained genes induced by the susceptible NIL at 48 hpi. In the last chapter (IV) the identification and characterization of the gene implicated in the



character simple/double pod has been carried out. Usually, chickpea has one flower per node but mutants with two or more flowers have been reported, an interesting feature from an agronomic point of view. In previous studies the double pod mutation in the genotype JG62 was located on chromosome 6 in a 92,6 kb region with 7 genes, pointing *CaRAX2-like* as the mayor candidate controlling this character. In this study we have identify a deletion around 44 kb in JG62 that includes, among others, *CaRAX2-like*, this allele has been named *sfl-d<sub>1</sub>*. On the other hand, using double pod lines from USDA germoplasm collection, a new double pod allele has been found in the same locus with a point mutation in *CaRAX2-like*, named *sfl-d<sub>2</sub>*. A functional characterization by SEM microscopy and *in situ* hybridization has been carried out and different plant material has been used to perform controlled crossings. All those analyses allowed us to confirm *CaRAX2* as the gene that controls the single/double pod character in chickpea.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---



## 1. El garbanzo: aspectos generales

El género *Cicer* en el cual está incluido el garbanzo cultivado, pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionaceae* y tribu *Cicereae*. Este género comprende 9 especies anuales y 34 perennes siendo *Cicer arietinum* L. la única especie cultivada (Singh et al. 2008). El garbanzo es una leguminosa de grano anual, autógena y diploide, con una dotación cromosómica de  $2n = 2x = 16$ . Su cariotipo consta de un par de cromosomas largos ( $>3.5\mu\text{m}$ ) submetacéntricos, seis pares metacéntricos o submetacéntricos de tamaño medio (1.6-2.75  $\mu\text{m}$ ) y un par metacéntricos muy cortos ( $<1.5\mu\text{m}$ ) (Ocampo et al. 1992; Ahmad y Chen 2000).

Tradicionalmente el garbanzo ha sido utilizado tanto para consumo humano como para alimentación animal. Actualmente su producción se dedica prácticamente en su totalidad al consumo humano, dedicándose para alimentación animal los garbanzos de destrío. Incluir el garbanzo en la dieta diaria puede ser una fuente importante de proteínas y carbohidratos además de grasas, vitaminas, fibra y minerales. Su contenido en proteínas es menor que el de otras leguminosas (20-30%) pero son de las más digestibles, el de carbohidratos, constituido en gran parte por almidón, es bastante elevado (40%), el contenido en grasa es de un 3-6% y es rico en ácidos grasos insaturados (ácido oleico y linoleico) (Wood y Grusak 2007; Jukanti et al. 2012). Es lamentable que se haya abandonado como grano para pienso dado su alto valor biológico y la práctica ausencia de compuestos no nutritivos.

Los mejoradores distinguen principalmente dos tipos morfológicamente diferentes dentro del garbanzo cultivado, el tipo “desi” y el “kabuli” (Figura 1).



**Figura 1.** Flores y semillas de garbanzo tipo desi (izquierda) y kabuli (derecha)

Esta clasificación se corresponde respectivamente con las razas *microsperma* y *macrosperma* propuestas por Moreno y Cubero (1978) que las diferenciaron teniendo en cuenta caracteres cualitativos y cuantitativos. El tipo kabuli (similar a *macrosperma*) se caracteriza por tener las flores blancas y semillas de mayor tamaño y de colores claros, con cubierta lisa y generalmente fina y se cultiva tradicionalmente en la Cuenca Mediterránea y más recientemente en América del Norte y del Sur. El tipo desi (similar a *microsperma*), tiene flores rosas y semillas oscuras, con cubierta habitualmente gruesa y rugosa y su principal producción se centra en India, Pakistán y Etiopía, constituyendo casi el 85% de la producción mundial de garbanzo y actualmente también en Australia. Estos dos términos, desi y kabuli, son de origen hindú, el primero se refiere a garbanzos de origen local de la India (desi=local) y el segundo hace referencia a la capital de Afganistán (Kabul) desde donde se introdujeron en la India en el siglo XVIII (Van der Maesen 1987). Ambos tipos difieren también para caracteres agronómicos, siendo más frecuente el hábito de crecimiento erecto, la resistencia a rabia, y la tolerancia al frío en el tipo kabuli, mientras que la floración temprana, la resistencia a fusarium, la tolerancia a elevadas temperaturas y sequía es más frecuente en el tipo desi (Singh 1987). Además, el tipo kabuli presenta menor variabilidad y sus caracteres se consideran más evolucionados, por lo que se piensa que se desarrolló a partir del tipo desi y que caracteres oligogénicos como el color de la flor, el grosor de la cutícula y el tamaño de la semilla tuvieron un papel importante en su evolución (Moreno y Cubero 1978; Gil y Cubero 1993). Estudios citológicos y análisis con marcadores moleculares han confirmado las diferencias entre los fondos genéticos de estos dos tipos de garbanzos (Iruela et al. 2002; Zatloukalová et al. 2011).

Al igual que otras leguminosas el garbanzo mejora la fertilidad y la estructura del suelo ya que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico gracias a su asociación simbiótica con la bacteria *Rhizobium leguminosarum*, esto favorece al siguiente cultivo que necesitaría menos aportes de fertilizantes, por lo tanto, su cultivo contribuye a una agricultura más sostenible. Esto explica la importancia del uso de leguminosas en la rotación de cultivos como es el sistema trigo-garbanzo donde la fijación de N<sub>2</sub> es de aproximadamente 30

kg/ha/año (López-Bellido et al. 2011). Se considera un cultivo rústico ya que muestra gran resistencia al calor y a la sequía y es capaz de producir en suelos con baja fertilidad. Aunque es sensible al frío, algunos cultivares pueden tolerar bajas temperaturas (Croser et al. 2003).

### **1.1. Origen e importancia económica**

El garbanzo fue una de las primeras especies de plantas que se domesticaron en el Próximo Oriente durante el Neolítico, junto con el trigo, la cebada, el lino y otras leguminosas como el guisante, la lenteja y los yeros (cultivos fundadores) (Zohary y Hopf 2000). Su centro de origen se sitúa en Hacillar en el sureste de Turquía (Ladizinsky y Adler 1976) donde se encontraron dos especies silvestres estrechamente relacionadas con el garbanzo cultivado, *Cicer echinospermum* P.H. Davis y *Cicer reticulatum* Ladiz (Van der Maesen 1987), siendo este último el que actualmente se considera como el progenitor silvestre de *C. arietinum* (Ladizinsky y Adler 1976). Los cruzamientos entre la especie cultivada y *C. reticulatum* forman híbridos totalmente fértiles (Singh et al. 2008).

El garbanzo, con más de 14 millones de hectáreas, es la segunda leguminosa de grano que más se cultiva en el mundo después de la judía. Se encuentra distribuido por todos los continentes y desde hace unos años se ha expandido por Australia, EE.UU, Canadá y Argentina, donde la producción se dedica prácticamente a la exportación. Actualmente el principal productor es la India donde se cultivan más de 9,5 millones de ha y se producen en torno a unos 9 millones de toneladas (FAOSTAT 2017).

España, con una superficie de 69.700 ha y una producción de 75.900 t, es el principal productor de Europa (562.648 ha y 560.355 t) siendo Andalucía con 28.322 ha la comunidad autónoma que más superficie le dedica a este cultivo. En España el cultivo del garbanzo ha sufrido grandes oscilaciones debido fundamentalmente a los cambios sufridos en la Política Agraria Comunitaria (PAC) que ha causado un incremento notable en los últimos años (MAPAMA 2018) (Figura 2). A pesar de ello España importa casi tanto como lo que produce. En 2017 se importaron 41.758 t, indicando la importancia que tiene este cultivo en nuestro país. Los garbanzos han estado presentes a lo largo

de nuestra historia y forman parte de nuestra cultura, ello explica que seamos el mayor productor y consumidor de Europa.



**Figura 2.** Serie histórica de la superficie cultivada y producción del cultivo de garbanzo en España (MAPAMA 2018)

Aunque el rendimiento medio mundial ha mejorado en los últimos años, desde 790,7 kg/ha en el año 2000 a los 1000 kg/ha en la actualidad (FAOSTAT 2017), aún sigue siendo bajo. Los principales factores limitantes causantes de estos bajos rendimientos son los estreses bióticos, como la rabia y el fusarium y los abióticos entre los que se encuentran fundamentalmente la sequía, la salinidad y el frío.

## 2. Mejora del garbanzo

La mejora de plantas ha dado lugar a cambios importantes en la calidad, la estructura de la planta y en la adaptación de los cultivos, permitiendo incrementar notablemente el rendimiento. Al igual que para el resto de los cultivos, el principal objetivo de la mejora del garbanzo es incrementar y estabilizar el rendimiento y minimizar los insumos necesarios para ello. Los principales inconvenientes para aumentar la producción radican en la mejora de características agronómicas relacionadas con la adaptación a determinados sistemas de cultivos. En España, como en el resto de la Cuenca Mediterránea, el garbanzo es un cultivo que tradicionalmente se siembra en primavera,

presentando un ciclo corto (marzo-julio), esto implica que las plantas no desarrollan mucha biomasa, limitando así su producción de semilla, siendo este uno de los motivos fundamentales que hacen que el garbanzo presente unos bajos rendimientos. Sería interesante sembrar en invierno y alargar el ciclo lo que implicaría un aumento en las producciones. Pero las siembras invernales están muy limitadas por la susceptibilidad del garbanzo a la rabia, enfermedad causada por el hongo aéreo *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab, ya que es en esta época cuando el hongo encuentra las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad ( $T^a$  aprox 5-15°C y humedad alta). El desarrollo de líneas resistentes a rabia iniciadas en ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) ha permitido la introducción de siembras de invierno en climas Mediterráneos (Singh et al 1997). Es importante considerar que la resistencia a rabia no es total, es de naturaleza cuantitativa, por lo tanto, para que sea eficaz el uso de variedades resistentes no podemos olvidarnos de otras medidas de lucha dirigidas a evitar o reducir la infección inicial como puede ser una buena rotación de cultivos o el uso de semillas de siembra certificadas libres de enfermedad (Sharma y Ghosh 2016). La inestabilidad del cultivo del garbanzo también está afectada por fusarium, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f. sp. *ciceris*, que junto con la rabia son las dos enfermedades más importantes. Este trabajo de tesis se ha centrado en fusarium, enfermedad de la cual se hablará en más profundidad en apartados posteriores.

A pesar de que la rabia y el fusarium son las enfermedades más importantes en garbanzo, los estreses abióticos también ocasionan pérdidas en la producción del garbanzo. Entre ellos la salinidad y la sequía son los más importantes (Jha et al. 2014). Así pues, el obtener genotipos resistentes o tolerantes a enfermedades y adaptados a condiciones ambientales extremas y con buena producción es uno de los objetivos clave en la mejora del garbanzo. Conocer el control genético de caracteres agronómicos importantes permite elegir la estrategia de mejora más adecuada para cada carácter. La mayoría de estos caracteres, como por ejemplo el rendimiento y sus componentes (semillas/planta, semillas/vaina, etc), son caracteres complejos y están controlados por muchos genes. Otros caracteres como fecha de floración,



simple/doble vaina y el porte, de herencia mendeliana simple, también se ha comprobado que tienen un papel importante sobre el rendimiento y su estabilidad en garbanzo (Rubio et al. 2004; Upadhyaya et al. 2007).

Aunque gran parte de la mejora del garbanzo se ha realizado empleando metodologías tradicionales, actualmente gracias al desarrollo de la genómica se están incluyendo nuevas herramientas que permiten ayudar a aumentar su eficacia. El avance de las nuevas técnicas biotecnológicas ha permitido desarrollar en este cultivo, en un primer lugar mapas genéticos y posteriormente secuenciar su genoma facilitando un mayor conocimiento de la estructura y función de regiones genómicas implicadas en la regulación de caracteres de interés agronómico (Varshney et al. 2019). En esta tesis se han aplicado estas técnicas para profundizar en el estudio de las regiones implicadas en la resistencia a fusarium y el carácter simple/doble vaina.

## 2.1. Caracteres estudiados

### 2.1.1. Resistencia a fusarium

La fusariosis del garbanzo está causada por el hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuto & K. Sato. El hongo penetra por la raíz y colapsa los vasos conductores de la planta, impidiendo el paso de fluidos por el interior del xilema produciendo la muerte de la planta. En condiciones favorables puede ser una enfermedad devastadora causando grandes pérdidas en la producción (Castro et al. 2012; Jendoubi et al. 2017) (Figura 3).



**Figura 3.** Cultivo de garbanzo con ataque de fusarium en Escacena del Campo, Huelva

El hongo puede permanecer en el suelo durante años y tiene la capacidad de sobrevivir, incluso en ausencia de huéspedes, sobre restos orgánicos como hongo saprófito dificultando su control (Haware et al. 1996). Por lo tanto, el método más económico y efectivo para controlar la enfermedad es a través de genotipos resistentes. Se han identificado fuentes de resistencia generalmente en tipos desi y en menor medida en tipos kabuli y silvestres (Jiménez-Díaz et al. 2015).

Sobre cultivares susceptibles *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede producir dos síntomas patológicos, distinguibles entre sí tanto por los síntomas como por la cronología con que estos se desarrollan: marchitez y amarilleamiento vascular. La marchitez vascular se caracteriza por el desarrollo rápido de la flacidez de las hojas en cualquier nivel de la planta y la posterior desecación de foliolos adquiriendo una coloración verde-grisácea que se extiende a la planta completa. La flacidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, que adquieren un color castaño claro y finalmente se produce la muerte de la planta, quedando los foliolos necrosados adheridos al raquis. El amarilleamiento vascular se expresa con más lentitud que la marchitez vascular y se caracteriza por el desarrollo de clorosis, amarillez y necrosis de los foliolos de las hojas inferiores, que van progresando a lo largo de la planta y dan lugar a la defoliación de ésta. A diferencia de la marchitez vascular los foliolos necrosados se desprenden del raquis (Jiménez-Díaz et al. 2015).

*F. oxysporum* se caracteriza por su gran variabilidad patogénica. Basándose en la reacción diferencial del hongo sobre diferentes genotipos de garbanzo, se han descrito, hasta el momento, ocho razas fisiológicas: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6 (revisado en Jendoubi et al. 2017). Las razas 2, 3 y 4 se han descrito en la India (Haware y Nene 1982), mientras que las razas 0, 1B/C, 5 y 6 se han encontrado principalmente, en España y California (Jiménez-Díaz et al. 1989; Kaiser et al. 1994). La raza 1A se ha descrito en India, California y en la zona Mediterránea (Haware y Nene 1982; Jimenez-Gasco et al. 2001).

La raza 0 (la menos virulenta) y la 1B/C inducen el síntoma de amarilleamiento vascular, el resto de las razas, económicamente más importantes, inducen la marchitez vascular (Jiménez-Díaz et al. 2015). Aunque ambos síntomas se han considerado específicos de raza, en algunos estudios se

ha observado que una única raza puede causar los dos síntomas dependiendo del genotipo del huésped (Sharma y Muehlbauer 2007). En algunos genotipos susceptibles se ha descrito la “marchitez tardía” o “late wilting” que se caracteriza por un prolongado periodo de latencia (periodo desde la inoculación hasta la aparición de síntomas) seguido de un desarrollo normal de la enfermedad. Por el contrario, también se ha descrito la “marchitez lenta” o “slow wilting” en el que no existe periodo de latencia y el desarrollo de la enfermedad es muy lento desde la presencia de los primeros síntomas (Castro et al. 2012). Por lo tanto, dentro del síntoma de la marchitez se han descrito tres tipos, “Early, Late y Slow wilting”.

El conocimiento de la herencia de la resistencia es de gran importancia en los programas de mejora ya que ayuda a diseñar la metodología a seguir para transferir genes de resistencia a nuevos cultivares. La resistencia a fusarium se considera como un carácter cualitativo y específico de cada raza. Los primeros trabajos sobre genética de la resistencia en esta enfermedad revelaron que la raza 1A está controlada por tres genes que segregan de forma independiente (*h1*, *h2* y *H3*) (Upadhyaya et al. 1983; Kumar 1998). Un control genético similar, basado en dos o tres genes independientes, se observó en la raza 2 (Kumar 2000a) aunque Sharma et al. (2005) concluyeron que estaba controlada por un solo gen recesivo. Las razas 3 y 5 son monogénicas (Tekeoglu et al. 2000; Sharma et al. 2004) y la raza 4 digénica (Tullu et al. 1999). La raza 0 está controlada por dos genes que segregan independientemente (*foc01* y *foc02*) y la presencia de cualquiera de ellos confiere resistencia (Rubio et al. 2003a). Además de estos genes mayores que confieren resistencia vertical, podrían estar implicados otros genes menores que podrían dar lugar a las reacciones de marchitez lenta (Sharma y Muehlbauer 2007). Sería interesante piramidar diferentes genes de resistencia en una misma variedad para hacer que esta sea más duradera.

La mayoría de los genes asociados con la resistencia a las razas 0, 1, 2, 3, 4 y 5 se encuentran localizados en el grupo de ligamiento (GL) 2 del mapa genético de garbanzo, solo uno de los genes que controla la resistencia a la raza 0 (*foc01*) se ha localizado en el GL5 (Cobos et al. 2005; Halila et al. 2009a).

### 2.1.2. Carácter simple/doble vaina

Casi todos los genotipos de garbanzo cultivado tienen una flor por nudo y como consecuencia una vaina, sin embargo, existen mutaciones naturales que presentan dos, tres o múltiples flores/vaina por nudo (Knights 1987; Singh y Chaturvedi 1998; Gaur y Gour 2002) (Figura 4).

La presencia de dos vainas por nudo (o doble vaina) es una mutación espontánea que tiene gran interés desde el punto de vista agronómico ya que los genotipos con doble vaina pueden aumentar la producción (Singh y van Rheenen 1994; Kumar 2000b; Ali et al. 2010) e influyen positivamente en su estabilidad (Rubio et al. 1998, 2004). Este carácter es más frecuente encontrarlo en los garbanzos tipo desi que en los kabuli (Muehlbauer y Singh 1987).



**Figura 4.** Vainas de garbanzo simple (izquierda), doble (centro) y triple (derecha)

Existen dos genes independientes que controlan el número de flores por nudo en garbanzo (*Cym* y *SFL*). El gen *Cym* controla el carácter multiflor, y es el responsable de la inflorescencia cimosa, en la cual cada eje da lugar a múltiples flores. El gen *SFL* controla el carácter simple, doble o triple flor/vaina, siendo el alelo de vaina simple dominante sobre doble o triple vaina, y el de doble vaina dominante sobre el triple según Srinivasan et al. (2006). El locus *SFL* se ha localizado en el GL6 del mapa genético de garbanzo próximo al marcador STMS (Sequence Tagged Microsatellites Site) TA80 o flanqueado por los marcadores TR44 y TR1/TR35 o NCPGR33 y NCPGR47 con intervalos de 19,3 y 3,4 cM, respectivamente (Cho et al. 2002; Rajesh et al. 2002; Radhika et al. 2007). El marcador TA80 ha sido utilizado con éxito en un programa de retrocruzamientos para introducir el carácter doble vaina en cultivares de garbanzo (Taran et al. 2013). Posteriormente, Ali et al. (2016), utilizando cuatro

poblaciones de líneas recombinantes (RIPs) segregando para el carácter y líneas casi isogénicas (NILs) para simple/doble vaina y haciendo uso de la secuencia del genoma de garbanzo consiguieron refinar la posición del locus simple/doble vaina (*SFL/sfl*) entre los marcadores SDSNP1 y CAGM27777 en una región de 92.560 pares de bases (pb) del cromosoma 6 en la cual se identificaron siete genes. Los autores sugieren que CaRAX2 (Regulator Axillary Meristem) podría ser el gen candidato responsable del carácter. Este trabajo realizado en nuestro grupo ha sido el punto de partida para desarrollar el capítulo IV de esta tesis.

### **3. Empleo de herramientas genómicas en la mejora del garbanzo**

En los últimos años, el uso de marcadores moleculares ha revolucionado los programas de mejora de grandes cultivos como el trigo (Rasheed y Xia 2019), el girasol (Dimitrijevic y Horn, 2017) o el maíz (Kadam y Lorenz 2018) al igual que en leguminosas (Varshney et al. 2018). El enorme desarrollo de métodos de secuenciación masiva hace posible el desarrollo de mapas muy saturados y la asociación de marcadores a caracteres de interés agronómico con una mayor eficacia.

#### **3.1. Mapas genéticos**

Los primeros mapas genéticos de garbanzo se publicaron a principios de los años 90 empleando marcadores isoenzimáticos y caracteres fenotípicos de herencia simple como el color de la flor o el grosor de cutícula. Las poblaciones que se utilizaron en estos mapas fueron F<sub>2</sub> derivadas de cruzamientos interespecíficos (*C. arietinum* x *C. reticulatum* ó *C. echinospermum*) debido al bajo nivel de polimorfismo encontrado entre líneas de garbanzo cultivado con los marcadores disponibles (Gaur y Slinkard 1990a, b; Kazan et al. 1993). Simon y Muehlbauer (1997) fueron los primeros en incluir en los mapas marcadores RFLP (Restriction Frangment Lenght Polymorphism) y marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pudiendo establecer por primera vez relaciones de sintenia con otras leguminosas. Los marcadores basados en la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) como los RAPDs, ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) o SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) mostraron un nivel de polimorfismo algo

mayor en cruzamientos intraespecíficos y fue posible detectar marcadores asociados a genes y QTLs de interés, principalmente relacionados con resistencia a rabia y fusarium (revisado por Rubio et al. 2012). El desarrollo de marcadores STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site) por Hüttel et al. (1999) y Winter et al. (1999) aumentó la posibilidad de detectar polimorfismos dando un gran impulso a la obtención de mapas más saturados. El primer mapa de referencia fue el desarrollado por Winter et al. (2000), donde por primera vez se localizaron genes de resistencia a fusarium raza 4 y 5 en el grupo de ligamiento (GL) 2 cercanos al marcador TA59. A partir de este momento, diferentes autores obtuvieron nuevos marcadores STMS aumentando las posibilidades de obtener mapas más saturados (Sethy et al. 2003, 2006a, b; Lichtenzveig et al. 2005; Choudhary et al. 2006).

Al utilizar marcadores STMS en diferentes poblaciones de mapeo y por diferentes autores, fue posible establecer un mapa consenso para determinar con mayor exactitud los marcadores asociados a caracteres de interés agronómico (Millan et al. 2010). Por otro lado, Nayak et al. (2010) pudieron incluir marcadores específicos de genes en el mapa de garbanzo y establecer relaciones de sintenia con los grupos de ligamiento de la especie modelo de leguminosas *Medicago truncatula*, facilitando la búsqueda de genes de interés en garbanzo (Madrid et al. 2012; Ali et al. 2014). En estos años el gran desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing, NGS) facilitó la obtención de mapas genéticos altamente saturados con marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) publicados en garbanzo a partir del año 2010 (Gujaria et al. 2011; Thudi et al. 2011; Gaur et al. 2012; Hiremath et al. 2012).

### **3.2 Secuenciación del genoma de garbanzo y mapas saturados**

En el año 2000 se obtuvo la secuencia de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, siendo el primer genoma de planta secuenciado (Arabidopsis Genome Initiative 2000). Actualmente ya hay secuenciadas 390 especies de plantas en el NCBI entre las que se encuentran las dos especies modelo: *M. truncatula* (Young et al. 2011) y *Lotus japonicus* (Sato et al. 2008), y cuatro especies de leguminosas cultivadas: *Cajanus cajan* (Varshney et al. 2011), *Glicine max* (Kim et al. 2010), *C. arietinum* (Jain et al. 2013; Varshney et al. 2013; Parween

et al. 2015; Gupta et al. 2017a) y *Phaseolus vulgaris* (Schmutz et al. 2014). Actualmente están en proceso la secuenciación de otras leguminosas como el guisante (*Pisum sativum*) y las habas (*Vicia faba*).

En garbanzo, los genomas de referencia de los genotipos kabuli (CDC Frontier) y desi (ICC4958) con un tamaño de genoma 738 y 740 Mb respectivamente, se han completado con la secuenciación del genoma de su ancestro silvestre *C. reticulatum*, genotipo PI 489777, con 327.07 Mb (Gupta et al. 2017a). Esta información junto con las re-secuenciaciones de diferentes genotipos de garbanzo (Varshney et al. 2019), abren un enorme abanico de posibilidades para detectar nuevos marcadores microsatélites y SNPs en regiones concretas del genoma. Combinando las posiciones de los marcadores con la información disponible de los genomas es posible proponer genes candidatos involucrados en el control del carácter que se esté estudiando. En los últimos cinco años se han obtenido mapas muy saturados en poblaciones RILs o en poblaciones F<sub>4</sub> y F<sub>5</sub> empleando marcadores SSR, SNPs o InDels obtenidos bien con la técnica GBS (Genotyping By Sequencing) o resecuenciaciones. En estos mapas se ha podido hacer mapeo fino y proponer genes candidatos relacionados con resistencia a rabia, y tolerancia a sequía, salinidad y frío (revisado por Jha 2018).

En el desarrollo de esta tesis la comparación de mapas genéticos con el mapa físico ha sido esencial para detectar nuevos marcadores moleculares y determinar genes candidatos asociados a la resistencia a fusarium y el carácter simple/doble vaina.

## **4. Métodos y técnicas empleados en esta tesis**

Para abordar los objetivos de esta tesis se han empleado diversos métodos y técnicas entre las que podemos destacar cuatro:

### **4.1. Cruzamientos**

En los programas de mejora vegetal, de manera habitual, se realizan cruzamientos dirigidos entre individuos que presenten diferentes características agronómicas. Estos pueden ser intra o interespecíficos permitiéndonos aumentar la variabilidad genética. En este último caso, si el cruzamiento es con

especies filogenéticamente alejadas, a veces, es necesario utilizar rescate de embriones (Saha et al. 2015). La extracción de embriones y su siembra en medios de cultivo *in vitro* también puede realizarse con el fin de conseguir un mayor número de generaciones al año y por lo tanto acortar el tiempo para desarrollar nuevos materiales en los programas de mejora (Dagustu et al. 2010; Wang et al. 2011).

Realizar cruzamientos en garbanzo es un proceso tedioso debido al tamaño y la fragilidad de la flor. Los pasos a seguir se muestran en la Figura 5. En primer lugar, es necesario seleccionar flores en el estadio adecuado, posteriormente se eliminan los sépalos y se realiza la emasculación; una vez se ha comprobado que no ha quedado ningún grano de polen, se procede a la polinización con el polen del parental masculino. Es muy importante ser meticuloso a la hora del etiquetado para evitar errores. La metodología y el porcentaje de éxito obtenidos en tres casos de nuestro programa de mejora (buen tamaño de semilla y resistencia a fusarium y rabia, resistencia a *Orobanche foetida* y carácter simple/doble vaina) se encuentran recogidos en el capítulo I de esta tesis.



**Figura 5.** Pasos empleados en la realización de cruzamientos en garbanzo

## 4.2. PCR convencional y RT-qPCR

En 1993, Kary Mullis recibió el Premio Nobel de química por inventar la reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés. La PCR constituye una tecnología poderosa que implica la síntesis *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN (Mullis 1990). Esta técnica es considerada la más revolucionaria del último cuarto del siglo



XX y en la actualidad sigue siendo una de las técnicas más utilizadas de manera habitual en los laboratorios.

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) es una variante de la PCR convencional que se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación. La RT-qPCR ofrece la posibilidad de detectar, en tiempo real, el nivel de amplificación de una secuencia de interés, con el objeto de estimar la cantidad de esa secuencia presente en la muestra original. Las razones para emplear la RT-qPCR frente a otras metodologías en el análisis de expresión génica son numerosas, ya que se generan datos cuantitativos muy precisos, altamente repetitivos y con una sensibilidad mayor que la dada por otros métodos de hibridación, es 1.000 veces más sensible que los “northern blot” o hibridaciones ARN/ARN (Malinen et al. 2003) y al menos 100 veces más sensible que la técnica de “microarrays” basados en hibridación de ADN (Czechowski et al. 2004), pudiendo llegar a detectar una única copia del transcrito (Palmer et al. 2003). Todo esto unido a los bajos costes que ocasiona esta técnica, la ha convertido en un método generalizado para caracterizar o confirmar los patrones de expresión génica y comparar el nivel de transcritos. La calidad de los análisis con RT-qPCR dependen de la calidad del material vegetal de partida, el diseño de los cebadores y el manejo del proceso (Hellemans et al. 2007; Die y Román 2012). A esto hay que sumarle, los cálculos de la eficiencia en las reacciones, así como una sólida estrategia de normalización, utilizando varios genes control validados en la especie a estudiar (Derveaux et al. 2010).

En el capítulo III de esta tesis se ha utilizado esta técnica para analizar los perfiles de expresión de genes candidatos seleccionados como responsables del control de la resistencia a fusarium.

### **4.3. Hibridación *in situ* (ISH)**

Esta técnica fue desarrollada en el año 1969 por Pardue y Gall e independientemente por John et al. y se basa en la utilización de una sonda de unas 300 pb, generalmente cDNA, que hibrida directamente sobre cortes de tejido y en ocasiones sobre órganos enteros. La detección de la sonda se realiza

con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina o con fluorocromos. La hibridación *in situ* de ARN resulta útil para describir los patrones temporales y espaciales de expresión de un determinado gen a nivel celular o subcelular. Es decir, detectar cuándo y dónde se expresa un determinado gen (Levitus et al. 2010). La principal limitación de esta técnica radica en que generalmente solo se puede analizar una sonda por cada hibridación.

#### **4.4. Microscopía electrónica**

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope), permite la observación y caracterización de materiales orgánicos e inorgánicos en una escala de nanómetro (nm) a micrómetro ( $\mu\text{m}$ ). El SEM es un instrumento compuesto por un sistema óptico-electrónico que explora la muestra por medio de un haz móvil de electrones. Las aplicaciones del SEM son muy variadas, y van desde la industria petroquímica o la metalurgia hasta la medicina forense. Sus análisis proporcionan datos como textura, tamaño o forma de la muestra. Entre las ventajas del SEM podemos destacar su gran versatilidad, rapidez y fácil manejo, ya que no es necesario cortar la muestra para la observación y en general no requiere preparación. Sin embargo, el principal inconveniente de esta técnica es lo engorroso que resulta analizar gran cantidad de muestras y que se requiere un equipamiento altamente costoso (Goldstein et al. 2017).

Las técnicas descritas en los dos apartados anteriores se han empleado en estudios de desarrollo de inflorescencias o tipo de hoja en leguminosas (Champagne et al. 2007; Prenner 2013; Jiao et al. 2019). En el capítulo IV de esta tesis se han realizado tanto hibridaciones *in situ* como microscopía electrónica de barrido, utilizando como material meristemas florales de garbanzo, para aclarar el proceso de formación de flores en los mutantes doble vaina.

#### **5. Bioinformática**

La bioinformática es la aplicación de técnicas informáticas a datos biológicos. Estas técnicas incluyen la generación, anotación, análisis y archivo de datos biológicos, utilizando conceptos de biología, informática y matemáticas. Los primeros datos biológicos recopilados en grandes cantidades fueron secuencias de proteínas y ácidos nucleicos, que se almacenaron junto con sus anotaciones

(especie, función bioquímica, papel fisiológico...) (Acquaah 2012). A medida que aumentó la cantidad de datos de secuencias también creció la necesidad de compartir estos datos entre laboratorios.

Una de las herramientas utilizadas en el análisis de secuencias es la herramienta de búsqueda básica de alineación local (BLAST). Esta permite comparar una secuencia desconocida de nucleótidos (BLASTn) o de proteínas entre otros con las bases de datos y establecer similitudes (Johnson et al. 2008). La alineación de secuencias múltiples muestra los patrones de conservación y variación de residuos entre las secuencias, lo que proporciona información detallada de posiciones funcionales y estructurales para los genes que las codifican. Tales inferencias son más fuertes si la alineación contiene secuencias de especies muy diversas (Nicholas et al. 2000).

Las bases de datos se han utilizado por la comunidad científica desde el inicio de las iniciativas genómicas para facilitar la organización y la difusión de los datos. Una buena base de datos debe incluir dos partes críticas: la secuencia original y una descripción de la anotación del contexto biológico de los datos. Una de las principales entidades del mantenimiento de las bases de datos de secuencias de genes es el GeneBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Durante el desarrollo de los estudios plasmados en esta tesis, además de la web del NCBI, se han utilizados programas como el Geneious® y el visor IGV (Integrative Genomics Viewer).

Geneious es una herramienta bioinformática intuitiva para el análisis, la interpretación y la aplicación de datos de secuencias moleculares que permite trabajar directamente con datos de ADN. La aplicación proporciona módulos básicos para permitir la visualización, manipulación y transferencia de secuencias de ADN, secuencias de aminoácidos, alineamientos, árboles filogenéticos, etc (Kearse et al. 2012). En esta tesis, este programa ha sido particularmente útil para la comparación de secuenciaciones de genes o fragmentos del genoma con la intención de encontrar diferencias entre genotipos parentales que difieren entre sí en el carácter a estudiar.

Por otro lado, el IGV es una herramienta de visualización de alto rendimiento para la exploración interactiva de grandes conjuntos de datos genómicos integrados. Admite una amplia variedad de tipos de datos, incluidos datos de secuenciación masiva y anotaciones genómicas (Robinson et al. 2011). Este programa nos ha permitido la selección de SNPs encontrados entre re-secuenciaciones de genotipos parentales de garbanzo (ILC3279 y WR315) que han sido utilizados como marcadores moleculares para ayudarnos a delimitar una zona de interés asociada con la resistencia a fusarium.

En esta tesis se han combinado metodologías tradicionales de un programa de mejora con herramientas biotecnológicas para profundizar en el conocimiento de los genes implicados en la resistencia a fusarium y en el control del carácter simple/doble vaina en garbanzo



## OBJETIVOS

---

Por todo lo expuesto anteriormente el objetivo general de esta tesis ha sido aplicar distintas herramientas genómicas para identificar genes candidatos asociados a caracteres de interés agronómico en garbanzo

Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Uso de marcadores moleculares para comprobar la naturaleza híbrida de cruzamientos para obtener material de interés en el programa de mejora de garbanzo (Capítulo I)
- Identificación de genes potencialmente implicados en la resistencia a fusarium mediante saturación con marcadores moleculares, físicamente posicionados en la región de interés, y su confirmación mediante estudios de expresión (Capítulos II y III)
- Identificación, caracterización y validación del gen responsable del carácter simple/doble vaina utilizando aproximaciones genéticas, moleculares y bioinformáticas (Capítulo IV)



## CAPÍTULO I

---

### **USO DE LOS MARCADORES MOLECULARES STMS (SEQUENCE TAGGED MICROSATELLITE SITE) PARA CONFIRMAR CRUZAMIENTOS CONTROLADOS EN LOS PROGRAMAS DE MEJORA DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L.)**

**Publicado como:**

Caballo C, Castro P, Gil J, Izquierdo I, Millán T, Rubio J (2018) STMS (sequence tagged microsatellite site) molecular markers as a valuable tool to confirm controlled crosses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding programs. Euphytica DOI 10.1007/s10681-018-2314-0





## Resumen

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una leguminosa de grano anual, diploide y autógama. La mayoría de los procesos de mejora desarrollados en este cultivo comienzan con cruzamientos complementarios, pero la hibridación en este cultivo es una operación tediosa, debido probablemente al pequeño tamaño de las flores y a los daños causados en el pistilo durante la emasculación. Un punto importante en los programas de mejora del garbanzo es el éxito obtenido en la formación de vainas después de la hibridación y la posibilidad de comprobar la naturaleza híbrida de las F<sub>1</sub> obtenidas. Los caracteres morfológicos no siempre son adecuados para comprobar el éxito del cruzamiento y en estos casos el uso de marcadores moleculares ayudaría a verificar su naturaleza híbrida. En este estudio, se muestra nuestra experiencia en programas de cruzamientos y el uso de marcadores moleculares para comprobar la naturaleza híbrida en tres casos diferentes (A) obtención de líneas avanzadas que combinan resistencia a rabia y a fusarium; (B) desarrollo de poblaciones segregantes para resistencia a *Orobanche foetida* y (C) desarrollo de un material adecuado para realizar estudios genéticos con mutantes de doble vaina. Un total de 2041 flores polinizadas dieron lugar a 21.7, 16.8 y 8.7% de vainas en cada uno de los tres casos analizados respectivamente. La naturaleza híbrida de las semillas F<sub>1</sub> se comprobó con marcadores STMS (microsatélites) y osciló entre un 86 a un 91% para los tres casos estudiados. Los marcadores STMS fueron una valiosa herramienta para detectar híbridos, ya que son fáciles de visualizar y tienen un bajo coste. La confirmación de la naturaleza híbrida en las etapas iniciales del desarrollo de las plantas F<sub>1</sub> es esencial ya que implica una reducción del tiempo y los costes en los programas de mejora.



**Abstract**

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an annual, diploid and autogamous grain legume. Most breeding processes developed in this crop start with complementary crosses, but artificial hybridization is a tedious operation probably due to the injury of the pistil caused during emasculation due to the small size of the flowers. The success in pod formation after hybridization together with the possibility of testing the hybrid nature of F<sub>1</sub> is a key point to optimize chickpea breeding. Morphological characters are not always adequate to distinguish between progeny, consequently molecular markers are needed to verify hybrid nature. In this study, we show our experience in crossing programs and the use of molecular markers to test hybridization rate in three different cases (A) obtaining advanced lines combining resistance to blight and fusarium wilt; (B) developing segregating populations for *Orobanche foetida* and (C) providing suitable materials to do genetic studies involving double pod mutants. A total of 2041 pollinated flowers produced 21.7, 16.8 and 8.7% of pods in each one of the three cases analyzed. Hybridization nature in F<sub>1</sub> seeds was tested with STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site) markers and ranged from 86 to 91% for the three cases. STMS markers were a valuable tool to detect hybrids, being simple to visualize and having a low cost. The confirmation of hybrid nature at the initial development stages of F<sub>1</sub> plants is critical for reducing time and costs in breeding programs.



## CAPÍTULO II

---

### **SATURACIÓN DE LA REGIÓN GENÓMICA IMPLICADA EN LA RESISTENCIA A FUSARIUM (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*) RAZA 5 EN GARBANZO**

**Publicado como:**

Caballo C, Madrid E, Gil J, Chen W, Rubio J, Millan T. (2019) Saturation of genomic region implicated in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5 in chickpea. Mol Breeding DOI 10.1007/s11032-019-0932-4



## Resumen

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) es un hongo del suelo y uno de los principales problemas del garbanzo. La raza 5 (Foc5) es la más importante en la Cuenca Mediterránea. En el grupo de ligamiento (GL) 2 del mapa genético de garbanzo se ha localizado un gen que controla la resistencia a Foc5 donde también se encuentra una región con genes de resistencia a otras razas de Foc. Se sabe que el marcador microsatélite (STMS) TA59 está estrechamente ligado a genes de resistencia a Foc y está localizado en esta región genómica. En este estudio, nuestro objetivo fue buscar genes candidatos relacionados con la resistencia a Foc5 a partir de la posición física del marcador TA59 considerando la información de la secuencia del genoma del garbanzo. Se seleccionaron un conjunto de marcadores, que cubrían una región de alrededor de 25 Mb que se genotiparon en líneas casi isogénicas y líneas recombinantes que segregaban para el carácter en estudio. Uniendo los datos de diferentes materiales vegetales, fue posible delimitar un área de aproximadamente 820 kb. Uno de los 26 genes anotados en la región seleccionada (LOC101511605) podría considerarse un gen candidato por su posible implicación en las reacciones de resistencia. Además, se analizó una colección de 32 genotipos diferentes en sus reacciones a Foc5 utilizando marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) situados en la región de interés. El análisis de estos marcadores con métodos de agrupamiento mostró cuatro grupos principales de genotipos, tres de ellos agruparon los genotipos resistentes y el cuarto los genotipos susceptibles. La comparación entre los haplotipos de entradas representativas para cada grupo permitió la identificación de seis SNPs coincidentes entre líneas resistentes y diferentes de las líneas susceptibles. Estos SNPs podrían ser interesantes para utilizarlos en selección asistida por marcadores.





**Abstract**

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) is the major soilborne fungus affecting chickpea and race 5 (Foc5) is the most important in the Mediterranean basin. A gene controlling resistant reaction to Foc5 has been located on LG2 of the chickpea genetic map forming a cluster with resistance genes to other Foc races. The sequence-tagged microsatellite site (STMS) marker TA59 is tightly linked to this genomic region. In the current study, our aim was to look for candidate genes related to resistance to Foc5 starting from the physical position of TA59 and taking advantage of the whole chickpea genome sequence information. We selected a set of markers, covering a region of around 25 Mb that were genotyped in near isogenic lines and recombinant inbred lines. Joining data of different plant materials, it was possible to define an area of approximately 820 kb. One of the 26 genes annotated in the selected region (LOC101511605) could be considered a candidate gene for its possible implication in resistance reactions. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) markers selected in the target region were used to screen a collection of 32 genotypes differing in their reactions to Foc5. A cluster analysis showed four main groups, three of them grouping the resistant genotypes and the fourth one, the susceptible lines. The comparison between the haplotypes of representative accessions for each cluster allowed the identification of six SNPs coincident among resistant lines and different from the susceptible lines. These SNPs could be used in markers assisted selection.



## CAPÍTULO III

---

### ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS ASOCIADOS A LA RAZA 5 DE FUSARIUM EN GARBANZO

**Enviado como:**

Caballo C, Castro P, Gil J, Millan T, Rubio J, Die JV. (2019) Candidate genes expression profiling during wilting in chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race. Plos One



## Resumen

La producción de garbanzo puede verse afectada por fusarium, enfermedad causada por el hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. En la Cuenca Mediterránea la raza 5 (Foc5) es la más importante. Recientemente, se ha delimitado a 820 kb en el cromosoma 2 la región responsable de la resistencia a esta raza. Con el fin de obtener una mejor comprensión de esta región genómica, se utilizó un enfoque transcriptómico basado en PCR cuantitativa a tiempo real analizando los perfiles de expresión de genes candidatos seleccionados. Para ello se utilizaron una pareja de líneas casi isogénicas (NILs) que difieren en su reacción a Foc5 (resistente/susceptible) y se observaron sus cambios transcripcionales a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) después de la inoculación (hpi). Se han detectado diferencias en expresión en cuanto al tipo de genes y el tiempo de respuesta. En la NIL resistente se indujeron un grupo de genes a las 24 hpi mientras que en la NIL susceptible se indujeron un grupo diferente de genes a las 48 hpi. Se han discutido las posibles funciones de estos genes en los mecanismos de defensa frente a Foc5. Los genes con expresión diferencial detectados en este trabajo podrían estar implicados en la resistencia a otras razas de fusarium. Este estudio proporciona una nueva perspectiva de la reacción de defensa contra la raza 5 de fusarium en garbanzo y demuestra que las NILs son un material muy útil para detectar genes candidatos.



**Abstract**

Chickpea production may be seriously threatened by fusarium wilt, a disease caused by the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *F. oxysporum* race 5 is the most important race in the Mediterranean basin. Recently, the region responsible for resistance race 5 has been delimited within a region on chromosome 2 that spans 820 kb. To gain a better understanding of this genomic region, we used a transcriptomic approach based on quantitative real-time PCR to analyze the expression profiles of selected candidate genes. We used a pair of near-isogenic lines differing in their sensitivity to fusarium race 5 (resistant vs. susceptible) to monitor the transcriptional changes over a time-course experiment (24, 48, and 72 hours post-inoculation, hpi). Qualitative differences occurred during the timing of regulation. A cluster of genes were induced by the resistant NIL at 24 hpi, whereas a second cluster contained genes induced by the susceptible NIL at 48 hpi. Their possible functions in the molecular defence of chickpea is discussed. Our study provides new insight into the molecular defence against fusarium race 5 and demonstrates that development of NILs is a rich resource to facilitate the detection of candidate genes. The new genes regulated here may be useful against other fusarium races.





## **CAPÍTULO IV**

---

### **EL GEN *SFL*/Ca*RAX2* CONTROLA EL CARÁCTER SIMPLE/DOBLE VAINA EN GARBANZO**

**En preparación**



## Resumen

El tipo básico de inflorescencia en leguminosas es la inflorescencia compuesta, en la cual las flores aparecen en las inflorescencias secundarias (I2) que se forman de la inflorescencia primaria. El número de flores formadas por una inflorescencia secundaria depende de la actividad del meristemo I2 y es característico de cada especie. Las inflorescencias I2 de garbanzo (*Cicer arietinum*) sólo producen una flor. Sin embargo, mutaciones recesivas en el locus *SINGLE FLOWER* (*SFL*) dan como resultado plantas cuyos I2 producen 2 ó 3 flores/vainas. En trabajos previos, la mutación doble vaina del genotipo JG62 de garbanzo se localizó en el cromosoma 6, en una región de 92,6 kb con 7 genes anotados. En este estudio se ha detectado que, en JG62, 3 de estos 7 genes se ven afectados por una deleción de 44 kb. Uno de ellos, *CaRAX2-like*, codifica un factor de transcripción de tipo MYB cuyos homólogos en *Arabidopsis* (*RAX2*) y tomate (*BLIND*) controlan la división de los meristemos axilares del tallo. Para encontrar un alelo mutante diferente del gen *SFL* y poder elucidar qué gen es el responsable del carácter simple/doble vaina, se analizaron nuevas entradas con fenotipo doble vaina del banco de germoplasma del USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) y se identificaron tres genotipos con fenotipo doble vaina que no tenían la deleción encontrada en JG62. En estos tres genotipos, el gen *CaRAX2-like* tiene una mutación puntual en las posiciones 306-307 que origina un cambio en dos aminoácidos de la proteína silvestre implicados en la interacción con el ADN y que aparecen altamente conservados en las proteínas MYB desde plantas hasta humanos. *CaRAX2-like* muestra una expresión específica en el meristemo I2 y en una pequeña porción del meristemo floral de las inflorescencias de garbanzo, apoyando la hipótesis de que este gen controla la actividad del meristemo I2. Nuestros datos demuestran que el gen *SFL/CaRAX2* controla el carácter simple/doble vaina, posiblemente controlando la actividad del meristemo I2. El conocimiento del gen *SFL/CaRAX2* nos permitirá entender con mayor profundidad el control genético del desarrollo de la inflorescencia compuesta de garbanzo.



## 1. Introducción

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) contribuye con el 13% de la producción mundial de leguminosas grano y es una fuente importante de proteínas para el consumo humano. En el mundo se producen unas 14,7 millones de toneladas, siendo la India el mayor productor con un 64,5% del total (FAOSTAT 2017). Los garbanzos cultivados se dividen en dos tipos: desi y kabuli. El tipo desi tiene flores rosas y semillas pequeñas, oscuras y angulares, mientras que el tipo kabuli tiene flores blancas y semillas grandes de color crema. Su distribución geográfica difiere entre ambos tipos, el tipo desi se cultiva principalmente en Asia y el tipo kabuli en los países mediterráneos. Cruzamientos entre ambos tipos se han utilizado frecuentemente en los programas de mejora para aumentar la diversidad en el cultivo (Gaur et al. 2007). En mejora, además de la resistencia a estreses bióticos y abióticos, también son importantes los caracteres adaptativos para aumentar y estabilizar los rendimientos de los cultivos. La arquitectura de las inflorescencias es un carácter importante que puede afectar a la producción final ya que la inflorescencia determina la producción de flores, frutos y semillas y, por tanto, el rendimiento de los cultivos (Wang y Li 2008). La mayoría de las especies de la familia Leguminosae en la que se incluye el género *Cicer*, tienen una inflorescencia compuesta, es decir, las flores se forman en inflorescencias secundarias (o de orden superior). Esto difiere de otras especies con inflorescencias simples, donde las flores derivan del eje de la inflorescencia primaria, como ocurre en *Arabidopsis* (revisado por Benlloch et al. 2007).

Generalmente, en garbanzo, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las leguminosas, las inflorescencias secundarias (I2) producen una sola flor y por consiguiente, una sola vaina. Estas inflorescencias secundarias simplificadas se forman en la axila de una hoja, con estípulas basales y durante el desarrollo cada una produce un único meristemo floral (Prenner 2013). En los años 30 del siglo pasado se describieron mutaciones espontáneas que causaban la formación de dos flores por nudo, comúnmente encontradas en los garbanzos de tipo desi (Khan y Akhtar 1934; Ahmad 1964; Yadav et al. 1978; Muehlbauer y Singh 1987). Ocasionalmente, también se han encontrado mutaciones que causan la producción de tres flores por nudo (Singh y

Chaturvedi 1998; Srinivasan et al. 2006). El carácter simple/doble vaina tiene un gran interés desde el punto de vista agronómico, se ha descrito que un aumento en el número de vainas por nudo podría aumentar las semillas por planta y, consecuentemente, aumentar la producción final (Singh y Van Rheenen 1994; Kumar 2000b; Ali et al. 2010; Yasar et al. 2014). Algunos autores destacan que la presencia de doble vaina podría estar correlacionada negativamente con el tamaño de la semilla (Saxena y Singh 1987). Sin embargo, en ensayos de campo empleando líneas de simple vaina y de doble vaina no se encontraron diferencias significativas para el rendimiento, pero sí un efecto positivo del carácter doble vaina en la estabilidad del mismo (Singh y Van Rheenen 1989; Rubio et al. 1998, 2004).

La herencia del carácter simple/doble vaina en garbanzo se ajusta a un solo gen, designado "S" o "SFL", siendo el alelo recesivo (*sfl*) el que confiere el fenotipo doble vaina (Muehlbauer y Singh 1987; Srinivasan et al. 2006; Adak et al. 2017). La expresividad de la presencia de doble vaina dentro de la planta varía dependiendo del ambiente, pudiéndose encontrar en mayor o menor medida nudos con doble vaina y nudos con una sola vaina (Kumar et al. 2000b; Yasar et al. 2014). El análisis con marcadores moleculares de una pareja de líneas casi isogénicas (NILs) desarrolladas para este carácter en el grupo donde se lleva a cabo este trabajo, reveló que este gen está ligado al marcador STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site) TA80, a una distancia de 4,84 cM (Rajesh et al. 2002), ubicado en el grupo de ligamiento (GL) 6 del mapa genético de garbanzo por varios autores (Cho et al. 2002; Cobos et al. 2005; Radhika et al. 2007). A partir de la publicación de la secuencia completa del genoma del garbanzo (Jain et al. 2013; Varshney et al. 2013) es posible comparar mapas genéticos y físicos y buscar genes candidatos en una determinada región genómica. Ali et al. (2016) combinaron los resultados del análisis de ligamiento en cuatro poblaciones de líneas recombinantes (RIPs) derivadas de cruzamientos entre genotipos de simple y doble vaina (JG62 e ICCV96029) y el análisis de polimorfismo en cinco parejas de NILs con la información de la posición física de los marcadores. De esta forma, fue posible delimitar una región de 92,6 kb donde podría ubicarse el gen *SFL*. Esta región está flanqueada por los marcadores SDSNP1 y CaGM2777, en las posiciones

físicas 29073261 pb y 28927649 pb respectivamente, e incluye siete genes anotados. Entre estos siete genes, *CaRAX2-like*, destaca como posible candidato para el control del carácter simple/doble vaina, ya que *CaRAX2-like* codifica un posible factor de transcripción de tipo MYB que pertenece a la familia R2R3 MYB (Yanhui et al. 2006), cuyo homólogo en *Arabidopsis thaliana* regula la formación de los meristemos axilares del tallo (Müller et al. 2006). No obstante, *a priori* no se puede descartar que otro de los seis genes del intervalo sea el responsable del carácter simple/doble vaina.

En base a la información previa, el objetivo del presente trabajo ha sido identificar el gen *SFL*, que controla el número de flores/vainas formadas en las inflorescencias secundarias de garbanzo.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Material vegetal

Se utilizaron diferentes fuentes de fenotipo doble vaina:

i) JG62, también conocido como ICC4951, es un genotipo de la India mantenido por ICRISAT (International Crops Research for the Semi-Arid Tropics) que se ha incluido como parental en RIPs y NILs desarrolladas por nuestro grupo durante las dos últimas décadas. Las poblaciones RIPs, derivadas de cruzamientos con JG62, se identificaron como RIP-1 (CA2156 × JG62), RIP-7 (ILC3279 × JG62) y RIP-11 (JG62 × ILC3279) con un tamaño de población de 80, 115 y 86 RILs, respectivamente. También se utilizaron cinco parejas de NILs previamente desarrolladas a partir de RIP-1 siguiendo el esquema descrito en Rajesh et al. (2002).

ii) Nueve genotipos descritos como doble vaina en la web del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA): AOS1, CA2969, ICC1083, ICC4958, LINE6560, LINE6581, RPIP12-069-00458, RPIP12-069-06223, RPIP12-071-10065.

Los genotipos de simple vaina empleados en este trabajo han sido:

i) Líneas parentales de RIP-1, RIP-7 y RIP-11: CA2156 es un cultivar local español e ILC3279 es una entrada de la antigua Unión Soviética mantenida por



ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Area), ambas son tipo kabuli.

ii) BT6-17, línea avanzada tipo kabuli que fue utilizada en nuestro programa de cruzamientos.

## **2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Esta técnica se ha empleado con los meristemas de la pareja de NILs, NIL5-1V (simple vaina) y NIL5-2V (doble vaina), los cuales se infiltraron al vacío con formaldehído al 4% (p/v) en una solución salina tamponada con fosfato 1:3 durante 10 minutos, se fijaron con solución fresca durante 16 horas a 4°C y se deshidrataron en etanol. El punto crítico se llevó a cabo con CO<sub>2</sub> líquido, las muestras secas se montaron y se recubrieron con oro-paladio (4:1) en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC). El microscopio utilizado fue un JEOL JSM-5410 (10 kV).

## **2.3. Evaluación fenotípica**

Para la caracterización fenotípica se evaluaron el número de ramificaciones en diez plantas de la pareja de NILs (NIL5-1V/2V). Estos genotipos se sembraron en el suelo en un jaulón durante la primavera en Córdoba. El carácter doble vaina se evaluó como presencia o ausencia, considerando presencia aquellas plantas que mostraron al menos un pedúnculo con doble vaina ya que el fenotipo doble vaina como se ha mencionado anteriormente no se expresa en todos los nudos.

## **2.4. Genotipado y secuenciación**

La extracción de ADN se realizó utilizando el “kit DNeasy Plant” (QiaGen). Las PCRs para amplificar los cebadores diseñados (Tabla S-1) se llevaron a cabo en 10 µl de volumen final que contenían 20 ng de ADN genómico de planta, 1X del tampón HF Phusion, 0,4 µM de dNTPs, 0,4 µM de cada cebador y 0,05 unidades/µl de la ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific™). La reacción de amplificación consistió en una desnaturalización durante 30 s a 98°C y 35 ciclos de: 10 s a 98°C, 30 s a 52–66°C y 30 s a 72°C por kb seguido de una extensión final de 72°C durante 10 min. Los productos

de PCR se analizaron en geles de acrilamida y se visualizaron utilizando la solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe.

La secuenciación de las amplificaciones de PCR se realizó a partir de productos de PCR purificados con SureClean o clonados en el vector pGEMTeasy utilizando tecnología Sanger por la empresa Stabvida (Portugal).

## 2.5. Análisis bioinformático

Con el fin de encontrar diferencias entre las secuencias de los genotipos de doble y simple vaina, se empleó la re-secuenciación del genotipo JG62 (doble vaina) obtenida por la tecnología Ion-Torrent y se comparó con el genoma de referencia de garbanzo CDC-Frontier (simple vaina) disponible en el NCBI (Varshney et al. 2013). Para alinear las secuencias del cromosoma 6, donde se localiza el gen *SFL*, de estos genotipos se utilizó el programa Geneious® 7.1.9 con los siguientes parámetros: minimum mapping quality = 30; maximum gaps per read = 10%; maximum gap size = 50000; word length = 17; Index word length = 14; maximum mismatches per read = 15% y maximum ambiguity = 2.

## 2.6. Hibridación *in situ*

Las hibridaciones *in situ* de ARN se realizaron utilizando la pareja de NILs (NIL5-1V/2V). Secciones longitudinales, de 8 µm de espesor, de ápices de inflorescencia incluidos en parafina, se hibridaron con sondas marcadas con digoxigenina siguiendo el protocolo descrito en Ferrándiz et al. (2000).

Para la síntesis de las ribosondas, se utilizaron como molde fragmentos específicos de ADNc para los tres genes estudiados: i) *CaRAX2*, el gen de interés en este estudio, ii) *CaVEG1* utilizado como marcador del meristemo I2, homólogo del gen *VEGETATIVE1* de guisante, el cual se expresa después de la transición floral en meristemos I2, justo antes de la aparición de *PIM* y la iniciación del meristemo floral (Berbel et al. 2012) y iii) *CaPIM* empleado como marcador del meristemo floral, homólogo del gen *PROLIFERATE INFLORESCENCE MERISTEM* de guisante, y homólogo a su vez del gen *API* de Arabidopsis, (Berbel et al. 2001, 2012; Taylor et al. 2002), cuya función está conservada en otras leguminosas grano (Dong et al. 2005; Benlloch et al. 2006). Los ADNc de estos genes se amplificaron a partir de ARN total de ápices

florales de la línea simple vaina CA2156. El ARN total se aisló utilizando el “kit EZNA (bio-tec)” y para evitar la contaminación con ADN genómico, antes de la síntesis del ADNc, se trató 3 µg del ARN extraído con Ambion DNasa I (Invitrogen). El ADNc se sintetizó utilizando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los fragmentos de ADNc de los distintos genes se clonaron en el plásmido pGEMT easy.

En la tabla S-2 se muestran los fragmentos de ADNc utilizados como molde para la síntesis de las distintas ribosondas empleadas.

## **2.7. Cruzamientos**

Para estudiar la herencia y las relaciones alélicas entre diferentes genotipos se realizaron cruzamientos siguiendo el protocolo descrito en Caballo et al. (2018). Los parentales utilizados fueron: tres líneas con doble vaina procedentes del USDA (AOS1, LINE6560 y LINE6581) y los genotipos JG62 (doble vaina) y BT6-17 (simple vaina), que se utilizaron indistintamente como padre y madre.

## **3. Resultados**

### **3.1. Efecto de las mutaciones de *SFL* en el desarrollo del garbanzo**

En leguminosas, las flores, y por lo tanto las vainas, se producen en inflorescencias secundarias (I2) formadas en los flancos de la inflorescencia primaria principal (I1). En los genotipos de garbanzo con el alelo “silvestre” (*SFL*), cada I2 produce solo una flor/vaina, sin embargo, en las líneas con el gen mutado (*sfl-d*), las I2 producen dos flores/vainas, lo que se conoce como fenotipo de doble vaina (Figura 1A, B). Esta mutación es recesiva y sólo las plantas homocigotas para el alelo *sfl-d* producen dos flores/vainas en su I2. La presencia de dos flores por pedúnculo sugiere dos posibilidades: i) en los genotipos de doble vaina el meristemo I2 es mayor que los de simple vaina y se divide produciendo más flores o ii) el meristemo I2 está activo durante más tiempo y tiene tiempo para producir más de una flor. Para determinar cuál de estas dos posibilidades ocurre en los mutantes *sfl-d*, utilizamos microscopía

electrónica de barrido (SEM) para analizar la ontogenia de la inflorescencia de NIL5-1V/2V (Figura 1C, D). Como se muestra en la Figura 1D, en la inflorescencia de doble vaina, los meristemos I2 producen dos meristemos florales (F) de manera consecutiva, lo que indica que en el mutante de doble vaina el meristemo I2 está activo durante un período más largo que en los genotipos “silvestres” (simple vaina).

***Figura 1 no mostrada (pendiente de publicación)***

Para comprobar si la mutación *sfl-d* afectaba a la ramificación en los fenotipos mutantes se realizó una caracterización fenotípica de la misma pareja de NILs mencionada anteriormente, en las que NIL5-2V contiene la mutación *sfl-d*, al igual que el genotipo JG62. Como era de esperar, todas las plantas de NIL5-1V mostraron simple vaina y las de NIL5-2V doble vaina. No se observaron diferencias significativas en las ramificaciones de primer y segundo orden, sin embargo, NIL5-2V presentó un mayor número de ramificaciones de tercer orden que el genotipo de simple vaina, con alguna ramificación de cuarto orden (Tabla 1). El error estándar en el número de ramificaciones de tercer y cuarto orden en ambos genotipos fue elevado debido a datos fuera de rango de algunas de las plantas evaluadas (Tabla S-3).

**Tabla 1.** Valores medios de ramificaciones (media  $\pm$  error típico) evaluados en la pareja NIL5-1V/2V

NIL	Ramificaciones			
	1º orden	2º orden	3º orden	4º orden
<b>NIL5-1V</b> (simple vaina)	11,4 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	26,7 $\pm$ 8,27 <sup>a</sup>	4,3 $\pm$ 4,35 <sup>a</sup>	-
<b>NIL5-2V</b> (doble vaina)	11,2 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 7,09 <sup>a</sup>	18,2 $\pm$ 13,06 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 2,06*

Medias con la misma letra dentro de columnas indica no diferencias significativas, medias con diferentes letras diferencias significativas al nivel  $P < 0.01$

En resumen, estos resultados sugieren que la mutación *sfl-d*, además de causar la formación de doble vaina, también podrían causar otras alteraciones fenotípicas como mayor nivel de ramificación.

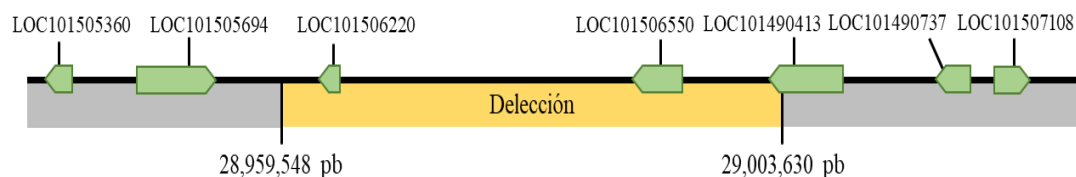
### 3.2. Identificación de candidatos para el gen *SFL*

El gen *SFL* fue previamente mapeado por Ali et al. (2016) en una región de 92,6 kb en el cromosoma 6 (Ca6), que incluye 7 genes anotados. Para comprobar si existían diferencias entre los genotipos de simple vaina (CA2156 y ILC3279) y doble (JG62) en la secuencia de estos genes, se diseñaron cebadores específicos (Tabla S-1) que se utilizaron en la amplificación de ADN genómico. En los genotipos de simple vaina todos los fragmentos amplificados tuvieron el tamaño esperado, sin embargo, en JG62 no se observó amplificación para los genes LOC101506220 (*CaRAX2-like*) y LOC101506550 (N-lisina metiltransferasa *METTL21A*). Para comprobar la ausencia de amplificación del gen *CaRAX2-like* se emplearon otros genotipos doble vaina con JG62 en su pedigrí: NIL1-2V, NIL2-2V, NIL3-2V, NIL4-2V, NIL5-2V y una selección de RILs derivadas de las poblaciones RIP-1, RIP-7 y RIP-11. En ningún caso se obtuvo amplificación del gen *CaRAX2-like* confirmando su ausencia en genotipos doble vaina con JG62 en su pedigrí. El hecho de no poder amplificar *CaRAX2-like* ni *METTL21A* en los genotipos mutantes de doble vaina, sugiere que estos genes podrían estar delecionados en el genoma de estas plantas.

Para comprobar esta hipótesis, se realizó un alineamiento entre la re-secuenciación del Ca6 de JG62 (doble vaina) y el Ca6 del genoma de referencia de garbanzo CDC-Frontier (simple vaina). La comparación de las dos secuencias permitió detectar una deleción de alrededor de 44 kb en la secuencia

de JG62, localizada en la región que controla el carácter simple/doble vaina descrita por Ali et al. (2016). Esta deleción incluye dos genes completos: LOC101506220 (*CaRAX2-like*) y LOC101506550 (N-lisina metiltransferasa *METTL21A*), lo que apoya nuestra hipótesis, y parte de un tercer gen, LOC101490413 (*serine carboxipeptidase-like*) (Figura 2).

Para confirmar los resultados observados *in silico*, mediante la comparación de las dos secuencias, se diseñaron cebadores en los límites de la deleción (Del\_Fw y Del\_Rev, Tabla S-1) y se probaron en genotipos simple y doble vaina. Como era de esperar, en genotipos de simple vaina no se obtuvo amplificación debido al gran tamaño de la región afectada por la deleción. Por el contrario, en genotipos de doble vaina se obtuvo un fragmento de 642 pb, que corresponde al tamaño esperado según el diseño de los cebadores en los límites de la deleción. Este fragmento se secuenció y se alineó con el Ca6 del genoma de referencia de la línea simple vaina CDC-Frontier, confirmando la deleción predicha por los resultados *in silico* (Figura 2).



**Figura 2.** Región en el Ca6 de garbanzo asociada al carácter simple/doble vaina que incluye siete genes (Ali et al. 2016). En amarillo se indica la deleción detectada en este estudio que afecta a tres de los siete genes

Estos resultados apuntan a los tres genes afectados por la deleción, *CaRAX2-like*, *METTL21A* y *serine carboxipeptidase-like*, como probables candidatos a ser el gen *SFL*, responsable del carácter simple/doble vaina.

### 3.3. Identificación y análisis de nuevos alelos de doble vaina

Para determinar de manera clara cuál de los genes candidatos identificados es el gen *SFL*, tratamos de identificar nuevos alelos mutantes de dicho gen, distintos al alelo *sfl-d* presente en los genotipos relacionados con JG62. Para ello, se evaluaron nueve genotipos de la colección del USDA descritos como doble vaina. Se observó que todos eran doble vaina excepto tres de ellos

(ICC4958, RPIP12-069-00458 y RPIP12-071-10065) que presentaron simple vaina.

Para genotipar la presencia de la delección presente en JG62, se utilizaron dos parejas de cebadores, los diseñados en los límites de la delección y los específicos del gen *CaRAX2-like*. Como era de esperar, los tres genotipos fenotipados como simple vaina no mostraron amplificación con los cebadores que detectan la delección, mientras que sí con los del gen *CaRAX2-like*. Tres de los seis genotipos doble vaina (ICC1083, RPIP12-069-06223 y CA2969) amplificaron con los cebadores para la delección, indicando que contienen el alelo *sfl-d*. Sin embargo, los genotipos de doble vaina AOS1, LINE6560 y LINE6581, al igual que los de simple vaina, no mostraron amplificación con los cebadores de la delección, pero sí con los de *CaRAX2-like*, lo que sugiere que estas líneas no contienen la delección y que, por tanto, estos tres genotipos podrían contener un alelo diferente a *sfl-d* en el mismo locus o en otro diferente. Para confirmarlo, estas tres líneas se cruzaron con JG62 observándose que todas las plantas F<sub>1</sub> fueron doble vaina, demostrando que no hay complementación entre estos tres genotipos del USDA y JG62, y que, por tanto, corresponden a otro alelo mutante del mismo locus *SFL* y diferente a *sfl-d*. Asimismo, cruzamientos entre los genotipos AOS1, LINE6560 y LINE6581 y la línea de simple vaina BT6-17 confirmaron la naturaleza recesiva de este alelo, ya que todas las plantas F<sub>1</sub> fueron de simple vaina.

En los tres genotipos doble vaina, AOS1, LINE6560 y LINE6581 la secuencia de los genes LOC101506550 (N-lisina metiltransferasa *METTL21A*) y LOC101490413 (*serine carboxipeptidase-like*) fue idéntica a la de la referencia simple vaina CDC-Frontier, indicando que estos dos genes no son responsables del fenotipo doble vaina.

Por el contrario, la secuenciación en esos genotipos del gen *CaRAX2-like* y su alineamiento con la secuencia de referencia de CDC-Frontier mostró cambios en las bases 306-307 de la secuencia codificante, variando de C-A en la referencia a A-C en los mutantes del USDA. Este cambio de bases produce una variación en los aminoácidos 102-103 de la proteína codificada, cambiando

de aspartato (D)-asparagina (N) en la referencia a glutamato (E)-histidina (H) en los mutantes del USDA.

Al comparar la secuencia de *CaRAX2-like* de diez especies diferentes de plantas, desde dicotiledóneas a monocotiledóneas, se observó que los dos aminoácidos afectados se encuentran en una región muy conservada, sugiriendo que esta región es relevante para la función de la proteína (Figura 3). De hecho, la mutación afecta al dominio de unión al ADN de estos factores de transcripción y la asparagina afectada participa en el contacto directo al ADN y se halla conservada en los MYBs desde levaduras hasta humanos (Martin y Paz-Ares 1997).

Estos resultados demuestran que *CaRAX2* corresponde al gen responsable del carácter simple/doble vaina en garbanzo.

*Figura 3 no mostrada (pendiente de publicación)*



### 3.4. Hibridación *in situ*

Para confirmar y profundizar en la comprensión de la función del gen *SFL/CaRAX2* se analizó su expresión en el ápice de la inflorescencia mediante hibridación *in situ*.

Se realizaron hibridaciones *in situ* en ápices de inflorescencias de plantas de las NILs NIL5-1V (simple vaina, silvestre) y NIL5-2V (doble vaina). En cada caso se hibridaron cortes seriados consecutivos de un mismo ápice, comparando por un lado *CaRAX2* y *CaVEG1* (marcador de meristemo I2) y por otro *CaRAX2* con *CaPIM* (marcador de meristemo floral). En ambos genotipos no se observó expresión de *CaRAX2* en el meristemo de inflorescencia primario I1. La expresión de *CaRAX2* en NIL5-1V solapó en parte con *CaVEG1*, indicando expresión en meristemos I2 (Figura 4A). Por otro lado, la expresión de *CaRAX2* solapó parcialmente con la de *CaPIM*, indicando expresión en parte del meristemo floral (Figura 4B). Finalmente, los ápices de NIL5-2V no mostraron expresión con *CaRAX2* como se esperaba, debido a la ausencia de este gen en esta línea.

*Figura 4 no mostrada (pendiente de publicación)*

## 4. Discusión

Desde el punto de vista agronómico, algunos autores han destacado la importancia que la mutación doble vaina (*sfl-d*) en garbanzo puede tener sobre la producción en este cultivo. Se ha comprobado su efecto positivo sobre la

estabilidad del rendimiento (Kumar et al. 2000b; Rubio et al. 1998, 2004). Estudios previos mapearon el gen *SFL* en el GL6 del mapa genético de garbanzo (Cho et al. 2002; Rajesh et al. 2002; Cobos et al. 2005; Radhika et al. 2007) y posteriormente Ali et al. (2016) lo acotaron a una región de 92,6 kb en el Ca6, donde estaban incluidos siete genes anotados. Entre ellos, el gen *CaRAX2-like* destacaba como un buen candidato cuya mutación sería responsable del carácter doble vaina, ya que se ha descrito que los genes *RAX* están involucrados en la formación de meristemos axilares del tallo en especies como *Arabidopsis* y tomate (Müller et al. 2006; Keller et al. 2006). No obstante, *a priori* en absoluto se asumió que el gen *SFL* no correspondiese a alguno de los otros seis genes presentes en la región de 92,6 kb del Ca6, por lo que también había que considerar a esos otros seis como posibles candidatos a responsables del carácter simple/doble vaina. En el presente estudio, se ha tratado de aclarar la identidad del gen *SFL* y entender cómo funciona. Este trabajo ha permitido confirmar concluyentemente que *CaRAX2-like* es el gen *SFL*, responsable del carácter simple/doble vaina. Asimismo, los resultados obtenidos han mostrado que *CaRAX2-like/SFL* se expresa específicamente en el meristemo de inflorescencia secundaria I2, donde se forman las flores, lo que indica que *CaRAX2-like/SFL* actúa en el meristemo I2 controlando su actividad.

Hasta la fecha, los mejoradores han utilizado el marcador STMS TA80 en selección asistida por marcadores; de hecho, este marcador se ha usado con éxito en un programa de retrocruzamientos para introducir doble vaina en variedades canadienses (Taran et al. 2013). Sin embargo, a pesar de su gran utilidad, dicho marcador está situado a 4,8 cM del gen, pudiendo aparecer, aunque con baja frecuencia, recombinantes, lo que generaría cierto error en los procesos de selección. En este estudio, la identificación del gen que controla el carácter simple/doble vaina y el desarrollo de marcadores específicos que detecten mutaciones en este gen, permitirán evitar los eventos de recombinación y realizar una selección más precisa de fenotipos doble vaina.

Las NILs han sido un material de gran utilidad para este trabajo, estas líneas se caracterizan por tener el mismo fondo genético y diferir sólo en la región asociada con el carácter en estudio, por lo que son muy eficaces en estudios de expresión y mapeo fino (Ali et al. 2016; Wang et al. 2017; Liller et

al. 2017; Lee et al. 2018; Basu et al. 2019; Zhao et al. 2019). Las NILs empleadas en este estudio fueron caracterizadas molecularmente por Rajesh et al. (2002) utilizando 600 marcadores STMS y de ellos solo TA80 mostró polimorfismo, confirmando que sólo una pequeña región del genoma está segregando en este par de líneas.

La ausencia de amplificación de los genes *CaRAX2-like* y *METTL21A* en genotipos derivados de JG62 (doble vaina, con la mutación *sfl-d*), sugirió que estos genes, localizados en la región de 92,6 kb donde mapea el gen *SFL* (Ali et al. 2016), podrían estar delecionados en los genotipos con la mutación *sfl-d*. Análisis bioinformáticos empleando el genoma de referencia y la resecuenciación de JG62 confirmaron la existencia de esta deleción. La secuenciación de genomas junto con los avances en las tecnologías de secuenciación masiva, han revelado variaciones en el número de copias (CNV, Copy Number Variations) relacionadas con deleciones y duplicaciones de genes cuando se comparan diferentes accesiones. Estas CNV pueden tener implicaciones funcionales como se ha descrito en patata (Hardigan et al. 2016), maíz (Springer et al. 2009; Swanson-Wagner et al. 2010) y cebada (Muñoz-Amatriain et al. 2013). Más recientemente en arroz, Wu et al. (2018) observaron que las diferencias para arquitectura de la planta y rendimiento entre el arroz cultivado asiático (*Oryza sativa*) y el ancestro silvestre (*Oryza rufipogon*) se deben a una deleción de 110 kb situada en el brazo corto del cromosoma 7. Las CNV tampoco son infrecuentes en el germoplasma de garbanzo (Thudi et al. 2016; Varshney et al. 2019), identificándose deleciones en regiones reguladoras o codificantes que afectan a caracteres como la resistencia a rabia (Madrid et al. 2012), fecha de floración (Ridge et al. 2017) o tolerancia a estreses abióticos (Sen et al. 2017). Hasta la fecha, y a pesar del alto número de CNV encontradas en el germoplasma de garbanzo, no hay ejemplos de cambios fenotípicos atribuidos a una deleción de un gen completo. En este estudio la deleción completa del gen *CaRAX2-like* se muestra como la base molecular para el control del carácter de doble vaina en JG62 y genotipos derivados.

El disponer de marcadores que nos detectan la deleción y el gen *CaRAX2-like* nos ha permitido caracterizar genotípicamente un conjunto de

líneas de doble vaina del banco de germoplasma del USDA. Como resultado nos permitió conocer que algunas de ellas tenían su origen en JG62. Esto se confirma porque una de ellas, CA2969, es una línea de doble vaina tipo kabuli obtenida en nuestro grupo empleando JG62 como donador de doble vaina (Rubio et al. 2003b). Por otro lado, nos permitió detectar un nuevo alelo para doble vaina en el mismo locus en líneas del USDA relacionadas con una mutación puntual en el *CaRAX2-like*, lo que sugiere un origen distinto para estas líneas. Todos estos resultados confirman que *CaRAX2* es el gen que regula simple o doble vaina en garbanzo. En este trabajo se han encontrado dos alelos recesivos de este gen, ambos responsables del fenotipo doble vaina, estos alelos podrían denominarse *sfl-d<sub>1</sub>* correspondiente a la delección completa del gen y *sfl-d<sub>2</sub>* correspondiente a la mutación puntual, siguiendo la nomenclatura propuesta por Srinivasan et al. (2006).

Como ya se ha señalado anteriormente *CaRAX2* pertenece a la familia de proteínas MYB, esta familia es grande, funcionalmente diversa y está representada en todos los eucariotas. La mayoría de las proteínas MYB funcionan como factores de transcripción con un número variable de repeticiones del dominio MYB que confieren su capacidad para unirse al ADN. Los dos aminoácidos, el ácido aspártico y la asparagina, que se han encontrado cambiados en las líneas mutantes *sfl-d<sub>2</sub>*, se encuentran extremadamente conservados en las proteínas MYB de diferentes especies, desde levaduras a humanos (revisado en Lai et al. 2013) y, según Martin y Paz-Ares (1997), la asparagina está directamente implicada en la unión al ADN. Es por tanto, esperable que cambios en esos aminoácidos conduzcan a la pérdida de la función de la proteína.

Los resultados de microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron que los meristemos I2 de las inflorescencias de las plantas doble vaina generaron de manera secuencial dos meristemos florales. Esto coincide con lo observado en el análisis macroscópico de las inflorescencias, donde el desarrollo de las dos flores que crecen de un mismo pedúnculo es diferente. Es decir, la producción de dos flores por los meristemos I2 de los genotipos doble vaina no se debe a que estos meristemos sean más grandes que en los genotipos simple vaina sino a que en los genotipos doble vaina los meristemos I2 se hallan

activos durante más tiempo. La formación de los meristemos florales a partir del meristemo I2 es un proceso que no se ha descrito con detalle en muchas especies. En otras leguminosas como guisante o alfalfa sus inflorescencias secundarias (I2s) maduras están formadas por un tallo alargado con flores en posiciones laterales, sugiriendo que la formación de los meristemos florales en las I2s sigue un orden secuencial (Berbel et al. 2012; Benlloch et al. 2015), tal como sucede en los genotipos doble vaina de garbanzo. Por el contrario, la ontogenia de la inflorescencia de *Lotus japonicus*, muestra que los meristemos florales parecen producirse por división del meristemo I2 (Feng et al. 2006). El modo en que se forman los meristemos florales a partir del meristemo I2 parece variar entre distintas especies de leguminosas.

En este trabajo, hemos observado que la línea doble vaina NIL5-2V presenta más ramificaciones que su pareja simple vaina NIL5-1V, lo que sugiere que el gen que controla el carácter simple/doble vaina también podría afectar al número de ramas que se producen. Esta diferencia en la producción de ramas recuerda a lo que ocurre en mutantes para genes *RAX* en otras especies. Müller et al. (2006) observaron una reducción en el número de brotes axilares de *Arabidopsis* promovida por la pérdida de función del gen *RAX2*. En tomate y pimiento el gen *BLIND (BL)*, otro factor de transcripción tipo MYB ortólogo a los genes *RAX* de *Arabidopsis*, controla el inicio de los meristemos axilares del tallo (Schmitz et al. 2002; Jeifetz et al. 2011). Sin embargo, según los resultados obtenidos sería interesante repetir la evaluación aumentando el tamaño de muestra para confirmar los resultados obtenidos.

El análisis de expresión mediante hibridación *in situ* en ápices de inflorescencia, nos permitió ver que *CaRAX2* se expresa específicamente en los meristemos I2 y en parte del meristemo floral en el genotipo de vaina simple. Esto sugiere que *CaRAX2* actúa específicamente en el meristemo I2 posiblemente controlando su actividad. Puesto que las plantas con la mutación *sfl-d1* parecen mostrar un mayor nivel de ramificación, sería interesante analizar si *CaRAX2* también se expresa en los meristemos axilares del tallo.

En conclusión, los resultados obtenidos de este estudio han puesto de manifiesto que diferentes entradas de doble vaina tienen afectado el gen *CaRAX2*, ya sea por un cambio en su secuencia o por estar deletado. Con el

propósito de entender mejor el control de las inflorescencias en leguminosas y determinar si este gen es responsable del número de flores por I2 en diferentes especies de leguminosas, sería interesante abordar el estudio de CaRAX2 en material vegetal con variabilidad para este carácter en diferentes especies de esta familia, como por ejemplo el cultivar de lenteja con múltiples vainas obtenido por rayos gamma (Laskar et al. 2018). La mejora clásica se ha basado tradicionalmente en el uso de variaciones genéticas que ocurren de manera espontánea para seleccionar plantas con caracteres de interés, por este motivo la mutagénesis inducida se utiliza para incrementar la frecuencia mutacional y acelerar este proceso, aunque hay que tener en cuenta que las mutaciones no son dirigidas si no que son aleatorias (Tadele 2016). Sin embargo, la aparición de nuevas técnicas de edición del genoma, como la tecnología CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), ha posibilitado introducir de manera dirigida cualquier cambio deseado en el genoma de un organismo (Kawall 2019). En nuestro caso el conocimiento del gen responsable del número de flores por pedúnculo unido a la tecnología CRISPR permitirá controlar el número de flores/vaina en leguminosas, carácter que puede ser interesante desde el punto de vista agronómico.

El trabajo realizado ha contribuido a mejorar el conocimiento de las redes genéticas que controlan el desarrollo de la inflorescencia en leguminosas que, junto al uso de herramientas y recursos genómicos, es clave para la generación de nuevas variedades mejor adaptadas a diferentes condiciones ambientales y con un mejor rendimiento, que serán fundamentales para el desarrollo de una agricultura sostenible en el futuro.

**Tabla S-1.** Nomenclatura, temperatura de fusión al ADN y secuencias de los cebadores utilizados en este estudio

<b>Cebadores</b>	<b>T<sup>a</sup> de fusión</b>	<b>Secuencia</b>
LOC101507108_Fw	64.04	ACGGAGTAACCGTTGAATGGGGT
LOC101507108_Rev	64.37	AGCAGATATGGCGGTGGCTTCA
LOC101490737_Fw1	65.3	TCGTTTCTTGGTGGTTCCGATAAGCC
LOC101490737_Rev1	64.43	TCACCACTGCAACCTGGACCTC
LOC101490737_Fw2	64.24	TGGGTTTCATGCCATGGAGTGGT
LOC101490737_Rev2	64.55	ACCATATGTCCAGCCCCTTTCACC
LOC101490413_Fw	65.67	TCCCAGGCTGTCAGGATGCCA
LOC101490413_Rev	64.33	ACACAGGTCCCCATCACATTGCT
LOC101506550_Fw	63.31	AGGTCCACCTGTGTCCACGAGAA
LOC101506550_Rev	64.75	TGTCAGCAGCAGCTTGACCTGAA
LOC101506220_RAX2_Fw	64.6	ACATGGCACTGGTGGGAATTGGA
LOC101506220_RAX2_Rev	59.29	GAGGCTGCAAATTATTCTATCTTCCT
LOC101505694_Fw1	56.42	TGGCAATTCTGATCCTCGT
LOC101505694_Rev1	58.95	CCCCATAAAGTATAAGCTGAACTTCA
LOC101505694_Fw2	64.42	CCCTTCAGAGCAATGCAGGGAGA
LOC101505694_Rev2	63.77	AGCCAGACTGCCAGAAAGGGT
LOC101505360_Fw	64.72	ACGGTGAAGGTGTAAGGGTACAATGG
LOC101505360_Rev	65.75	ACCACCACCACCACCACCCT
RAX2_Fw1	63.29	GTTCTCTCTGACCTTGAGTACCCTTCT
RAX2_Fw2	64.6	ACATGGCACTGGTGGGAATTGGA
RAX2_Fw3	64.68	GCTCAATTGCCAGGTAGGACCGA
RAX2_Fw8	56.42	TCCTAATAAAGCTGGTAATTAAGATCA
RAX2_Fw9	57.36	ATGTTAGTCCTAAAATACCAAATTACCA
RAX2_Fw10	56.97	TCATAGATGTCTCGAATATTTAGTGATAG
RAX2_Fw11	56.87	TTTTTATATTAATTTGTAGGTGGTCAGTTAT
RAX2_Fw12	58.43	GAGTACTCAATGATTAGTGTTAATAATCCAA
RAX2_Fw13	59.79	ACCACTACTGATTTCAAATGATGCAA
RAX2_Rev1	64.68	TCGGTCCTACCTGGCAATTGAGC
RAX2_Rev2	65.52	TGCCATGGCTAAGAGTGCAACTTCC
RAX2_Rev3	63.79	TTTGCCGCCTTATAGTCATCGCAC
RAX2_Rev4	61.13	TCACTTGCATCGTATTCGTAGCTTT
RAX2_Rev5	61	TCTCTGATTTCACTTCTAGTGAGTTGC
RAX2_Rev6	59.52	CAACTTTTTCCACATCTTTTGAGACC
RAX2_Rev7	58.7	GGATTTAAACTAGACACGCAAGTTC
RAX2_Rev8	58.92	TCCACTCACAAGACAAACAAACA
RAX2_Rev11	60.52	TGTGATATAGGAAGTTGCAAACCCA
RAX2_Rev12	59.33	CCATTACTAGACATGTGATGATAACCAA
RAX2_Rev13	56.08	AAATTAATGAAACTTTACCATAAGAAATGT
Del_Fw	60	CTGCCAAACTCAACTGAACCG
Del_Rev	59.05	GAAGTGGTCGGGTCAAACC
Seq_promoter_RAX2_Fw1	61.76	ACGTGGCATTAAATTTGTGTCTTCGA

Seq_promoter_RAX2_Rev1	61.62	TCACAACATGGAGCTCTTCCCA
Seq_promoter_RAX2_Fw2	62.31	TGGGTATCCCTTCCAACACTCTCA
Seq_promoter_RAX2_Rev2	61.52	TGCAAGAAGGGTACTCAAGGTCA
Seq_promoter_RAX2_Fw3	61.04	TCAGTGGTGTAAACAGAAAACAACCA
Seq_promoter_RAX2_Rev3	56.43	AAAGAATATCTTGTAAAGCTTGTAAGG
Seq_promoter_RAX2_Fw4	64.63	AGCAGAAGAATGCTAGGCCAATCGT
Seq_promoter_RAX2_Rev4	61.15	AGTTGAAGGATGTTTCGTTTCACCT
Seq_LOC101506550 Fw1	57.96	AGAGACTAAAACCGTTTGTGTTTAA
Seq_LOC101506550 Rev1	59.7	AGTACATGCAAATTCACAGTGACAA
Seq_LOC101506550 Fw2	61.12	TGATCTCATGGAAGCTGACAGGTA
Seq_LOC101506550 Rev2	61.18	GCTGACATGAACCGGGTCAAATA
Seq_LOC101506550 Fw3	60.62	GCAAGCAAATTAATGTACAGCCTGA
Seq_LOC101506550 Rev3	60.92	TGACAAGACTTTCAGAGCATTGTA
Seq_LOC101506550 Fw4	60.02	CCCAAATCTAAACACCTGGGAAC
Seq_LOC101506550 Rev4	60.62	CAGCCAGCTCCTAGTTCAATTACA
Seq_LOC101506550 Fw5	59.42	AACGTAATTGCAGAAAAGGAAGGT
Seq_LOC101506550 Rev5	58.38	TCCAAGACATAGATGATGACAAAAGA
Seq_LOC101506550 Fw6	60.68	GTAATGAGATCAGGTCCACCTGTG
Seq_LOC101506550 Rev6	59.96	CATTCAACTTCTCTGAAACACTCACA
Seq_LOC101490413 Fw1	65.2	GTGTTGGGCCGGCCTGTAA
Seq_LOC101490413 Rev1	64.21	TGCACTTTTGGAAACGAGGAAGCG
Seq_LOC101490413 Fw2	63.08	TTCACCAAATGAACGAGCTGAAAAGC
Seq_LOC101490413 Rev2	65.65	TACTGCAACCTGGCCCTCCAGT
Seq_LOC101490413 Fw3	66.16	ACTGGAGGGCCAGGTTGCAGT
Seq_LOC101490413 Rev3	63.27	TGAGACCAGAACTGGGGAGAAACA
Seq_LOC101490413 Fw4	65.63	AGCTGAATCGCGAAAGTAGTCTCCTCA
Seq_LOC101490413 Rev4	65.85	ACTCGAGACGCAAGAGCGGGA
Seq_LOC101490413 Fw5	63.54	TCATAGGCATTTTTCAAGCAGCACTCT
Seq_LOC101490413 Rev5	65.67	TGGCATCCTGACAGCCTGGGA
Seq_LOC101490413 Fw6	63.4	TGCTATTGGTAATGGATGGACAAACCC
Seq_LOC101490413 Rev6	64.02	ACATTCCAACACCTAAAGCCTCCT
Seq_LOC101490413 Fw7	64.33	AGCAATGTGATGGGGACCTGTGT
Seq_LOC101490413 Rev7	64.71	AGTCGAGGAAAACCCACACCCG
Seq_LOC101490413 Fw8	63.18	TGGATGGATGTGGGCGGAGA
Seq_LOC101490413 Rev8	64.85	GCATGACAACATGGCAGAGCGG
Seq_LOC101490413 Fw9	64.64	ACTATTTGGCGTCTCCTCTTGGAAAC
Seq_LOC101490413 Rev9	64.81	CGCAAATGGTTTTGACCCGACCA
Seq_LOC101490413 Fw10	64.06	TGCCATGAAGTGGTCCGGTCA
Seq_LOC101490413 Rev10	63.98	TGTTTGAGGGACCAAAACTGAGGAGA
Seq_LOC101490413 Fw11	63.27	GACCAAAAGACTCGGGCTATGTTGT
Seq_LOC101490413 Rev11	65.94	CCAGCCCCATTCACCTGTGGC
Seq_LOC101490413 Fw12	65.55	GGGGGACTACTTTCGCGATTCAGC
Seq_LOC101490413 Rev12	65.65	TGCCACTTGCCCTCACTACCCCT



**Tabla S-2.** Secuencia de las sondas empleadas para la hibridación *in situ* de 3 genes en meristemos apicales de garbanzo

<b>Gen</b>	<b>Sonda (5'-3')</b>
<b>RAX2-like (CaRAX2-like)</b>	TTGCAACTTCCTATATCACATCAAAGAAAATCACCAT TTCCACCTCCTAATTCTTCTCATTTATTTTCATTAGAC TACTTTAGTCACACTCCAATACCCTTCACAAATCTTG AACCAATTTCACTTCCTTCAAATAATAATAAATAACTA TGCAAACACAAGTTTCACTCCTTTTTACAAAACCAA GAGTACTCAATGATTAGTGTTAATAATCCAATGCAAT ATAATTACCCTATCAAAGACAACATGTTTATGTTTGG AAGTGAAGGAAGTTGTAGTTCATCCGATGGAAGTTG CACTCTTAGCCATGGCAAGGAAATCAAGCAAGAAGA AAATATTGGTTATCATCACATGTCTAGTAATGGATTT GATGATTACAACAATAACTTTATGATTAGTTGTAATA ATGGTGGTGA
<b>VEGETATIVE1 (CaVEG1)</b>	TGGAGCTAACACTGAAGCACAGGGAAACTGGTCTTA TGAATACATGAAGCTAACTGCTAAAGTTCAAGTCTTG GAGAGGAAGTTGAGGAACTTTGTGGGACATGATCTT GATCCTTTGAGTGTGAAAGAGCTTCAGAGTTTGGAGC AACAGCTTGACATGTCGCTAAAGCGCATCCGAACAA GAAAGAACCAAGTTATGAACCAATCCATCTCAGAGC TGCATAAAAGGGCAAGGGCATTGCAGGATCAAACA GCAAGCTAGCAAAGACAAAAGGAGAAAGAGAAAACA GTGAGTGAACATCCACAGAGATTCCCAGAAACCATA GGCATAGGACAATGTTTCAGCCACCTTCAACTTAACTT GTCAACCTGATCTGCTACCACCACAAAGACTGGTTCC TTCTCTAACTCTCAGTGGAACCTTACAAGCAAGAGGG TCATTGGAATTTGAAGAAAGGGGT
<b>PROLIFERATIVE INFLORESCENCE MERISTEMS (CaPIM)</b>	TATGAAAGGTATTCATATGCAGAGAGGCAGCTAGTT GCAAATGATTCGGAGTCTCAGGGAAATTGGACCATT GAGTATACTAGACTGAAGGCAAAGATTGATCTTTTGC AGAGAACTATAGGCATTACATGGGAGAAGATTTGG GTTCAATGAGTCTCAAAGA ACTTCAGAGTCTGGAAC AGCAGTTAGATACTGCTCTCAAACAAATTCGTACACG CAGAAACCAACTCATGTATGAGTCTATTTTCAGAGCTT CAGAAAAGGAGAAAGTGATACAGGAGCAGAATAG CATGCTTGCAAAGAAGATCAAGGAGAAAGAAAAGAT TGCAGCTCAACAACAGGCACAATGGGAGCACCCAAA CCATGGAGGAGTTAAT

**Tabla S-3.** Número de ramificaciones de NIL5-1V y NIL5-2V

NIL	Nº planta	Ramificaciones			
		1º orden	2º orden	3º orden	4º orden
NIL5-1V					
	1	13	43	13	0
	2	12	32	1	0
	3	13	36	6	0
	4	13	25	7	0
	5	11	24	1	0
	6	10	25	7	0
	7	10	24	0	0
	8	10	15	1	0
	9	11	18	7	0
	10	11	25	0	0
NIL5-2V					
	1	10	37	31	6
	2	11	32	18	0
	3	13	44	32	3
	4	11	30	12	2
	5	11	31	4	0
	6	12	32	11	1
	7	10	24	13	0
	8	12	25	18	1
	9	11	19	1	0
	10	11	26	42	4



## **DISCUSIÓN GENERAL**

---



En los últimos años la irrupción de nuevas tecnologías de secuenciación, junto con el progresivo abaratamiento de los costes de genotipado están permitiendo avances sin precedentes en el campo de la mejora genética. La secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido obtener la secuencia del genoma de garbanzo y la generación de enormes recursos genómicos en esta especie, tanto a nivel funcional como estructural (Jain et al. 2013; Varshney et al. 2013; Gupta et al. 2017a). También ha permitido un progreso rápido en el desarrollo de mapas genéticos ultra-densos, generación a gran escala de SNPs mediante GBS (genotipado por secuenciación), recursos transcriptómicos, mapeo de regiones genómicas de interés y GWAS (estudios de asociación de genoma) (Jha 2018). El resultado de todos estos recursos genómicos permitirá la selección asistida por genómica de caracteres de interés en el garbanzo.

A pesar de que la mejora clásica ha sido muy eficaz a lo largo de la historia de la agricultura, es un proceso largo que requiere entre 10 y 15 años para la obtención de variedades. En la actualidad la Mejora Asistida por Marcadores (MAS), se utiliza para seleccionar en generaciones tempranas o en estado de plántula, acelerando así la obtención de genotipos que incluyan los caracteres deseados, lo que ayuda a aumentar la eficiencia en los programas de mejora (Morris et al. 2003). Para que la selección del genotipo deseado se realice con el menor error posible se recomienda que exista una distancia genética menor de 5 cM (5% de recombinación) entre el marcador y el gen o QTL de interés (Collard y Mackill 2008), por este motivo la mejor manera de evitar la recombinación sería desarrollando marcadores diagnóstico, es decir, marcadores diseñados en el gen responsable del cambio fenotípico.

Una de las aplicaciones básicas pero fundamental de la MAS en mejora es su utilización en los programas de cruzamientos, necesarios para el desarrollo de poblaciones segregantes y para el aumento de la variabilidad dentro de un cultivo. Durante el proceso de la domesticación del garbanzo cultivado, al igual que ocurre con otras especies, se ha ido reduciendo su variabilidad genética (Abbo et al. 2003), para ampliarla se han realizado cruzamientos entre diferentes fondos genéticos como desi x kabuli o entre especies diferentes (Sharma et al. 2013; Koseoglu et al. 2017).

En esta tesis se han utilizado marcadores microsatélites para comprobar la naturaleza híbrida de las F<sub>1</sub> obtenidas en tres casos concretos del programa de mejora de garbanzo de Córdoba. Aunque hoy día con la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de garbanzo los marcadores más utilizados son los SNPs (Varshney et al. 2018), en este trabajo, los microsatélites han sido muy eficaces. Estos marcadores a diferencia de los SNPs no necesitan una alta calidad de ADN, ni instrumentos de laboratorio sofisticados para su amplificación y visualización (Adhikari et al. 2017). Esto unido a su abundancia en el genoma, la disponibilidad de sus secuencias en páginas webs como <https://cegresources.icrisat.org/CicArMiSatDB> (Doddamani et al. 2014) y su alto polimorfismo hacen que los microsatélites sean ideales para la comprobación rutinaria de la naturaleza híbrida de material vegetal.

*F. oxysporum* f. sp *ciceris* (Foc) es uno de los factores más limitantes de la producción en garbanzo. En la Cuenca Mediterránea la raza 5 (Foc5) está causando grandes pérdidas en el cultivo, se ha descrito que su resistencia es monogénica por lo que el conocimiento del gen que la controla nos brindaría la posibilidad de una selección más rápida y eficaz, mediante el uso de un marcador diagnóstico (Jiménez-Díaz et al. 2015; Li et al. 2015; Jendoubi et al. 2017).

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado variedades resistentes a este patógeno y material segregante de gran utilidad para buscar asociación entre regiones del genoma y la resistencia al patógeno. Concretamente se han desarrollado parejas de NILs (Castro et al. 2010) y poblaciones RIPs que junto con la información genética generada de su estudio (Iruela et al. 2007, Cobos et al. 2009) nos han permitido acotar a 1 Mpb la región de interés a partir de los recombinantes encontrados. La búsqueda de recombinantes no es tarea fácil, en este trabajo sólo 4 de 17 NILs y 9 de 304 RILs fueron útiles para delimitar la zona de interés, debido a que las recombinaciones por cromosomas son poco probables (Mercier et al. 2015). En garbanzo Bayer et al. (2015) observaron que el cromosoma 6 presentó un mayor promedio de sobrecruzamientos con 1,44 y el cromosoma 3 el más bajo con 0,19 sobrecruzamientos.

Otro factor clave en este estudio ha sido la disponibilidad de la secuencia del genoma de garbanzo (Jain et al. 2013; Varshney et al. 2013), que junto con los datos de re-secuenciación de genotipos que difieren en su reacción a Foc5, nos ha permitido el desarrollo de marcadores SNPs con los que continuar acotando la zona relacionada con la resistencia a fusarium. El avance en la tecnología NGS y los métodos de genotipado de alto rendimiento facilitan enormemente la detección de un gran número de SNPs, esto hace que se utilicen eficazmente en la construcción de mapas genéticos de alta densidad y en la detección de genes candidatos (Adhikari et al. 2017). En este trabajo los SNPs permitieron reducir la región candidata a 820 kbp y se identificaron un conjunto de seis de ellos asociados con la reacción de resistencia. Estos SNPs, sin poder considerarse marcadores diagnóstico, podrían utilizarse para identificar genotipos resistentes a Foc5, ya que todos los genotipos resistentes de la colección analizada presentaban el mismo haplotipo distinto a los genotipos susceptibles.

Como siguiente paso a este trabajo se realizó un estudio de expresión de los genes que se encontraban físicamente posicionados en la región de interés y que por su descripción podrían estar implicados en reacciones de resistencia. En los últimos años son varios los estudios de expresión realizados en garbanzo para la raza 1 (Foc1) mediante RNA-Seq (Singh et al. 2013; Garg et al. 2015; Sharma et al. 2016; Gupta et al. 2017b), técnica que ha permitido señalar rutas implicadas en el control de su resistencia. Sin embargo, en nuestro caso se ha utilizado RT-qPCR ya que la zona de interés estaba previamente delimitada y los genes a examinar no eran muy numerosos. Para ello se empleó una pareja de NILs, material que tiene la ventaja de tener el mismo fondo genético y diferir sólo en la región genómica relacionada con el carácter de interés, siendo muy útiles para hacer mapeo fino y estudios de expresión (Ali et al. 2016; Wang et al. 2016; Liller et al. 2017; Lee et al. 2018; Basu et al. 2019; Zhao et al. 2019). Este estudio no nos ha permitido identificar un gen como único responsable de la resistencia a Foc5. No obstante, ha puesto de manifiesto que las plantas resistentes llevan a cabo una estrategia activa de defensa contra este patógeno regulando la expresión de tres genes: un factor de transcripción tipo MADS-box, una proteína de la familia MATE y una serina



hydroxymethyltransferasa con los identificadores LOC101509359, LOC101495941 y LOC101510206 respectivamente, todos estos genes juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de la planta. La NIL susceptible induce la expresión de un grupo de genes diferente, y además lo hace en un tiempo posterior al detectado en la NIL resistente como pico de expresión (Figura 2, Capítulo III). Esto nos permite especular si la NIL susceptible induce una batería de genes eficientes para la penetración del hongo y/o si lo hace en el tiempo preciso.

Respecto al carácter simple/doble vaina y partiendo de un estudio previo realizado por Ali et al. (2016), se ha podido señalar al gen *CaRAX2* como responsable de su control. Este gen destacó como principal candidato ya que, en otras especies, como *Arabidopsis* y tomate, los genes *RAX* están directamente relacionados con la formación de los meristemos axilares (Müller et al. 2006; Schmitz et al. 2002). En garbanzo existe una familia de genes *RAXs* distribuidos en seis de los ocho cromosomas, esto podría indicar que tienen una función redundante al igual que ocurre en *Arabidopsis* en la cual los análisis fenotípicos sugieren que *RAX1*, *RAX2* y *RAX3* codifican proteínas con funciones similares que regulan la formación de meristemos axilares durante la fase vegetativa y al comienzo del desarrollo reproductivo (Müller et al. 2006). Sin embargo, en garbanzo los estudios de genética clásica señalan que sólo existe una región del genoma relacionada con este carácter situada en el Ca6 (Cho et al. 2002; Radhika et al. 2007; Ali et al. 2016).

Las diferentes técnicas empleadas en este trabajo han servido para ampliar la información del carácter simple/doble vaina en garbanzo y para demostrar que *CaRAX2* corresponde al gen *SFL*: i) con SEM se concluyó que los meristemos I2 están activos durante más tiempo permitiendo el desarrollo de dos flores consecutivas, concordando con la caracterización fenotípica donde se observaron diferencias en el desarrollo de dos flores de un mismo pedúnculo; ii) con análisis bioinformáticos se pudo detectar una delección de 44 kpb en JG62 (doble vaina), que afectaba a 3 de los 7 genes de la región candidata siendo uno de ellos *CaRAX2-like*; iii) con la secuenciación de estos 3 genes en líneas doble vaina solicitadas al USDA, se observó que *CaRAX2-like*

fue el único que presentó cambios en su secuencia, concretamente un cambio de dos aminoácidos en su proteína que están altamente conservados en otras especies de plantas, hongos y animales y están implicados en los dominios de unión al ADN (Martin y Paz-Ares 1997); iv) la hibridación *in situ*, ha sido la técnica utilizada para abordar los estudios de expresión, ya que debido a la similitud de las secuencias dentro de la familia de genes RAX, el diseño de cebadores para su uso en PCR cuantitativa fue inviable. Esta técnica nos permitió observar que *CaRAX2-like* no se expresa en la NIL de doble vaina (NIL5-2V).

En el futuro sería interesante estudiar *CaRAX2* en otras especies de leguminosas para esclarecer si este gen es el responsable de la diversidad del número de flores por I2. La modificación de este gen mediante la edición del genoma con técnicas como CRISPR permitiría la obtención de leguminosas mutantes con más flores/frutos con fines de investigación o producción, ya que se ha descrito que la doble vaina en garbanzo puede aumentar la producción del cultivo (Singh y Van Rheenen 1994; Kumar 2000b; Ali et al. 2010; Yasar et al. 2014), rasgo de gran interés desde el punto de vista agronómico.

Durante la última década, se han observado grandes avances en la secuenciación y el ensamblaje del genoma del garbanzo gracias a las tecnologías de NGS (Jha 2018). Se han identificado numerosos genes candidatos para varios caracteres y su papel regulador en diferentes rutas metabólicas a través de diversos estudios de genómica funcional (Kumar et al. 2016; Garg et al. 2015; Sharma et al. 2016; Upasani et al. 2017). Sin embargo, en garbanzo, en comparación con otras especies modelo como la soja, el arroz o el maíz, aún existe un gran desconocimiento de las bases moleculares de procesos biológicos básicos. La falta de disponibilidad de genotipos mutantes para determinados caracteres sigue siendo un desafío para la caracterización funcional. La información procedente de las secuencias del genoma del garbanzo junto con la selección genómica, los nuevos esquemas de reproducción, como la "reproducción rápida" (Li et al. 2018) y la posibilidad de edición del genoma, podrían ser herramientas valiosas para avanzar en la comprensión de la genética de este cultivo.



## CONCLUSIONES

---

1. Los marcadores microsatélites han sido útiles para comprobar la naturaleza híbrida de plantas F<sub>1</sub> en garbanzo. El uso de marcadores moleculares en los primeros estadios de los programas de mejora implica un ahorro de tiempo, espacio y dinero.
2. Se ha acotado a 820 kb la región del cromosoma 2 de garbanzo relacionada con la resistencia a fusarium raza 5 (Foc5) utilizando marcadores microsatélites, marcadores específicos de genes y SNPs analizados en diferentes materiales vegetales. El uso de parejas de NILs y la detección de recombinantes en poblaciones RILs ha sido clave para delimitar la zona de interés.
3. El análisis con marcadores SNPs asociados a Foc5 en una colección que difiere para su respuesta a la resistencia, ha permitido identificar 6 SNPs coincidentes en líneas resistentes y diferentes a las susceptibles. Estos SNPs podrían ser útiles para utilizarlos en selección asistida por marcadores y mejorar la eficacia de los programas de mejora de garbanzo.
4. El estudio de expresión para Foc5, llevado a cabo en una pareja de NILs, sugiere que la resistencia/susceptibilidad depende del tipo de genes regulados y del tiempo de regulación tras la infección.
5. El análisis de las inflorescencias de NILs simple/doble vaina mediante SEM concluyó que los meristemos I2 de las inflorescencias de las plantas doble vaina generaron de manera secuencial dos meristemos florales.
6. Aplicando diferentes técnicas tanto de mejora clásica como biotecnológicas se ha demostrado que CaRAX2 corresponde al gen *SFL* responsable del carácter simple/doble vaina en garbanzo. Este gen podría utilizarse en estudios futuros sobre el control del número de flores en leguminosas.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abbo S, Berger J, Turner NC (2003) Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biol* 30:1081–1087. doi: 10.1071/FP03084
- Acquaah G (2012) Principles of plant genetics and breeding. Wiley-Blackwell, New Jersey. doi: 10.1002/9781118313718
- Adak A, Sari D, Sari H, Toker C (2017) Gene effects of *Cicer reticulatum* on qualitative and quantitative traits in the cultivated chickpea. *Plant Breeding* 136:939–947. doi: 10.1111/pbr.12547
- Adhikari S, Saha S, Biswas A, et al (2017) Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus* 60:283–297. doi: 10.1007/s13237-017-0214-7
- Ahmad N (1964) Inheritance of pod characters in *Cicer* species and its economic importance. *West Pakist J Agric Res*, 2 2:58–61.
- Ahmad F, Chen Q (2000) Meiosis in *Cicer* L. Species. The Relationship between Chiasma Frequency and Genome Length. *Cytologia* 65:161–166. doi: 10.1508/cytologia.65.161
- Ali H, Shah TM, Iqbal N, et al (2010) Mutagenic induction of double-podding trait in different genotypes of chickpea and their characterization by STMS marker. *Plant Breeding* 129:116–119. doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01659.x
- Ali L, Madrid E, Varshney RK, et al (2014) Mapping and identification of a *Cicer arietinum* *NSP<sub>2</sub>* gene involved in nodulation pathway. *Theor Appl Genet* 127:481–488. doi: 10.1007/s00122-013-2233-3
- Ali L, Deokar A, Caballo C, et al (2016) Fine mapping for double podding gene in chickpea. *Theor Appl Genet* 129:77–86. doi: 10.1007/s00122-015-2610-1
- Alzate-Marin AL, Baía GS, Martins Filho S, et al (1996) Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. *Braz J Genet* 19:621–623. doi: 10.1590/S0100-84551996000400016
- Anbessa Y, Warkentin T (2005) On improving crossing success in chickpea. *Plant Breeding* 124:608–609. doi: 10.1111/j.1439-0523.2005.01157.x
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815. doi: 10.1038/35048692
- Arora PP, Jeena AS (2000) Hybridization method in chickpea. *Agricultural Science Digest*, 20 20:271–272.
- Ashraf N, Basu S, Narula K, et al (2018) Integrative network analyses of wilt transcriptome in chickpea reveal genotype dependent regulatory hubs in immunity and susceptibility. *Sci Rep* 8:6528. doi: 10.1038/s41598-018-19919-5
- Asif M, Rahman MU, Mirza JI, Zafar Y (2009) Parentage confirmation of cotton hybrids using molecular markers. *Pak J Bot*, 41 41:695–701.



- Basu U, Narnoliya L, Srivastava R, et al (2019) CLAVATA signaling pathway genes modulating flowering time and flower number in chickpea. *Theor Appl Genet* 132:2017–2038. doi: 10.1007/s00122-019-03335-y
- Bayer PE, Ruperao P, Mason AS, et al (2015) High-resolution skim genotyping by sequencing reveals the distribution of crossovers and gene conversions in *Cicer arietinum* and *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 128:1039–1047. doi: 10.1007/s00122-015-2488-y
- Bejiga G, Tessema T (1981) Identification of the optimum time of emasculation and pollination to increase percentage of hybrid seed set in Chickpea. *Eth. J. Agric. Sci.* 3, 129–134.
- Benko-Iseppon AM, Winter P, Huettel B, et al (2003) Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. *Theor Appl Genet* 107:379–386. doi: 10.1007/s00122-003-1260-x
- Benlloch R, d'Erfurth I, Ferrandiz C, et al (2006) Isolation of *mtpim* proves *Tnt1* a useful reverse genetics tool in *Medicago truncatula* and uncovers new aspects of *API*-like functions in legumes. *Plant Physiol* 142:972–983. doi: 10.1104/pp.106.083543
- Benlloch R, Berbel A, Serrano-Mislata A, Madueño F (2007) Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Ann Bot* 100:659–676. doi: 10.1093/aob/mcm146
- Benlloch R, Berbel A, Ali L, et al (2015) Genetic control of inflorescence architecture in legumes. *Front Plant Sci* 6:543. doi: 10.3389/fpls.2015.00543
- Berbel A, Navarro C, Ferrándiz C, et al (2001) Analysis of *PEAM4*, the pea *API* functional homologue, supports a model for *API*-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *Plant J* 25:441–451.
- Berbel A, Ferrándiz C, Hecht V, et al (2012) *VEGETATIVE1* is essential for development of the compound inflorescence in pea. *Nat Commun* 3:797. doi: 10.1038/ncomms1801
- Bhatti, M. A. (1990). The effects of inoculum density and environmental factors on wilt and root rot of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Ph.D. Dissertation, Department of Plant Pathology, Washington State University, Pullman, Washington, 132 pp.
- Bhatti MA, Kraft JM (1992) Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Dis* 76:50-54. doi: 10.1094/PD-76-0050
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Caballo C, Castro P, Gil J, et al (2018) STMS (sequence tagged microsatellite site) molecular markers as a valuable tool to confirm controlled crosses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding programs. *Euphytica* 214:231. doi: 10.1007/s10681-018-2314-0

- Caballo C, Madrid E, Gil J, et al (2019) Saturation of genomic region implicated in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5 in chickpea. *Mol Breeding* 39:16. doi: 10.1007/s11032-019-0932-4
- Castillo P, Vovlas N, Jiménez-Díaz RM (1998) Pathogenicity and histopathology of *Pratylenchus thornei* populations on selected chickpea genotypes. *Plant Pathology* 47:370–376. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00240.x
- Castro P, Pistón F, Madrid E, et al (2010) Development of chickpea near-isogenic lines for fusarium wilt. *Theor Appl Genet* 121:1519–1526. doi: 10.1007/s00122-010-1407-5
- Castro P, Román B, Rubio J, Die JV (2011) Selection of reference genes for expression studies in *Cicer arietinum* L.: analysis of *cyp81E3* gene expression against *Ascochyta rabiei*. *Mol Breeding* 29:261–274. doi: 10.1007/s11032-010-9544-8
- Castro P, Rubio J, Millán T, et al (2012) Fusarium wilt in chickpea: General aspect and molecular breeding. *Fusarium: Epidemiology, Environmental Sources and Prevention*; Rios, TF, Ortega, ER, Eds 101–122.
- Castro P, Rubio J, Madrid E, et al (2015) Efficiency of marker-assisted selection for ascochyta blight in chickpea. *J Agric Sci* 153:56–67. doi: 10.1017/S0021859613000865
- Champagne CEM, Goliber TE, Wojciechowski MF, et al (2007) Compound leaf development and evolution in the legumes. *Plant Cell* 19:3369–3378. doi: 10.1105/tpc.107.052886
- Chatterjee M, Gupta S, Bhar A, et al (2014) Analysis of root proteome unravels differential molecular responses during compatible and incompatible interaction between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* Race1 (Foc1). *BMC Genomics* 15:949. doi: 10.1186/1471-2164-15-949
- Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ (2011) Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn, USA 164pp
- Choudhary S, Sethy NK, Shokeen B, Bhatia S (2006) Development of sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Ecol Notes* 6:93–95. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01150.x
- Cho S, Kumar J, Shultz J, et al (2002) Mapping genes for double podding and other morphological traits in chickpea. *Euphytica* 128:285–292.
- Cho S, Muehlbauer FJ (2004) Genetic effect of differentially regulated fungal response genes on resistance to necrotrophic fungal pathogens in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64:57–66. doi: 10.1016/j.pmpp.2004.07.003
- Cobos MJ, Fernández MJ, Rubio J, et al (2005) A linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on populations from Kabuli x Desi crosses: location of genes for resistance to fusarium wilt race 0. *Theor Appl Genet* 110:1347–1353. doi: 10.1007/s00122-005-1980-1

- Cobos MJ, Winter P, Kharrat M, et al (2009) Genetic analysis of agronomic traits in a wide cross of chickpea. *Field Crops Res* 111:130–136. doi: 10.1016/j.fcr.2008.11.006
- Collard BCY, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:557–572. doi: 10.1098/rstb.2007.2170
- Croser JS, Clarke HJ, Siddique KHM, Khan TN (2003) Low-Temperature Stress: Implications for Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Improvement. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:185–219. doi: 10.1080/713610855
- Czechowski T, Bari RP, Stitt M, et al (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J* 38:366–379. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02051.x
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, et al (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139:5–17. doi: 10.1104/pp.105.063743
- Dagustu N, Sincik M, Bayram G, Bayraktaroglu M (2010) Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.): Immature embryo. *Helia* 33:95–101. doi: 10.2298/HEL1052095D
- Deokar AA, Ramsay L, Sharpe AG, et al (2014) Genome wide SNP identification in chickpea for use in development of a high density genetic map and improvement of chickpea reference genome assembly. *BMC Genomics* 15:708. doi: 10.1186/1471-2164-15-708
- Deokar A, Tar'an B (2017) Classical genetics and gene mapping. In: Varshney RK, Thudi M, Muehlbauer F (eds) *The Chickpea Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp 69–81
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellems J (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50:227–230. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.11.001
- Die JV, Obrero Á, González-Verdejo CI, Román B (2011) Characterization of the 3':5' ratio for reliable determination of RNA quality. *Anal Biochem* 419:336–338. doi: 10.1016/j.ab.2011.08.012
- Die JV, Román B (2012) RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. *J Exp Bot* 63:6069–6077. doi: 10.1093/jxb/ers276
- Die JV, Rowland LJ (2013) Superior cross-species reference genes: a blueberry case study. *PLoS ONE* 8:e73354. doi: 10.1371/journal.pone.0073354
- Die JV, Gil J, Millan T (2018) Genome-wide identification of the auxin response factor gene family in *Cicer arietinum*. *BMC Genomics* 19:301. doi: 10.1186/s12864-018-4695-9
- Diener AC, Gaxiola RA, Fink GR (2001) Arabidopsis *ALF5*, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell* 13:1625–1638. doi: 10.2307/3871390
- Dimitrijevic A, Horn R (2017) Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection. *Front Plant Sci* 8:2238. doi: 10.3389/fpls.2017.02238

- Doddamani D, Khan AW, Katta MAVSK, et al (2014) CicArVarDB: SNP and InDel database for advancing genetics research and breeding applications in chickpea. Database (Oxford). doi: 10.1093/database/bav078
- Dong Z, Zhao Z, Liu C, et al (2005) Floral patterning in *Lotus japonicus*. Plant Physiol 137:1272–1282. doi: 10.1104/pp.104.054288
- Dreher K, Khairallah M, Ribaut JM, Morris M (2003) Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. Molecular Breeding, 11 11:221–234.
- Engel N, Ewald R, Gupta KJ, et al (2011) The presequence of Arabidopsis serine hydroxymethyltransferase *SHM2* selectively prevents import into mesophyll mitochondria. Plant Physiol 157:1711–1720. doi: 10.1104/pp.111.184564
- FAOSTAT 2017. In: FAOSTAT 2017. <http://faostat.fao.org/>. Accessed 15 Jan 2019
- Feng X, Zhao Z, Tian Z, et al (2006) Control of petal shape and floral zygomorphy in *Lotus japonicus*. Proc Natl Acad Sci USA 103:4970–4975. doi: 10.1073/pnas.0600681103
- Ferrández C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. Development 127:725–734.
- Garg R, Bhattacharjee A, Jain M (2015) Genome-Scale Transcriptomic Insights into Molecular Aspects of Abiotic Stress Responses in Chickpea. Plant Mol Biol Rep 33:388–400. doi: 10.1007/s11105-014-0753-x
- Gaur PM, Slinkard AE (1990a) Genetic control and linkage relations of additional isozyme markers in chick-pea. Theoret Appl Genetics 80:648–656. doi: 10.1007/BF00224225
- Gaur PM, Slinkard AE (1990b) New isozyme markers for chickpea. International Chickpea Newsletter 5–8.
- Gaur PM, Gour VK (2002) A gene producing one to nine flowers per flowering node in chickpea. Euphytica 128:231–235. doi: 10.1023/A:1020845815319
- Gaur PM, Gowda CLL, Knights EJ, et al (2007) Breeding achievements. In: Yadav SS, Redden RJ, Chen W, Sharma B (eds) Chickpea breeding and management. CABI, Wallingford, pp 391–416
- Gaur R, Azam S, Jeena G, et al (2012) High-throughput SNP discovery and genotyping for constructing a saturated linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). DNA Res 19:357–373. doi: 10.1093/dnares/dss018
- Gaur R, Jeena G, Shah N, et al (2015) High density linkage mapping of genomic and transcriptomic SNPs for synteny analysis and anchoring the genome sequence of chickpea. Sci Rep 5:13387. doi: 10.1038/srep13387
- Gil J, Cubero JI (1993) Inheritance of Seed Coat Thickness in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its Evolutionary Implications. Plant Breeding 111:257–260. doi: 10.1111/j.1439-0523.1993.tb00639.x

- Goldstein JI, DE Newbury, Michael JR, Ritchie NWM (2017) Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis
- Gowda CLL (1981) Natural outcrossing in chickpea. International Chickpea Newsletter, 5 5:6–6.
- Gowda SJM, Radhika P, Kadoo NY, et al (2009) Molecular mapping of wilt resistance genes in chickpea. Mol Breeding 24:177–183. doi: 10.1007/s11032-009-9282-y
- Gujaria N, Kumar A, Dauthal P, et al (2011) Development and use of genic molecular markers (GMMs) for construction of a transcript map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Theor Appl Genet 122:1577–1589. doi: 10.1007/s00122-011-1556-1
- Gupta S, Chakraborti D, Sengupta A, et al (2010) Primary metabolism of chickpea is the initial target of wound inducing early sensed *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race I. PLoS ONE 5:e9030. doi: 10.1371/journal.pone.0009030
- Gupta S, Bhar A, Chatterjee M, Das S (2013a) *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* race 1 induced redox state alterations are coupled to downstream defense signaling in root tissues of chickpea (*Cicer arietinum* L.). PLoS ONE 8:e73163. doi: 10.1371/journal.pone.0073163
- Gupta S, Bhar A, Das S (2013b) Understanding the molecular defence responses of host during chickpea–*Fusarium* interplay: where do we stand? Functional Plant Biol 40:1285. doi: 10.1071/FP13063
- Gupta S, Nawaz K, Parween S, et al (2017a) Draft genome sequence of *Cicer reticulatum* L., the wild progenitor of chickpea provides a resource for agronomic trait improvement. DNA Res 24:1–10. doi: 10.1093/dnares/dsw042
- Gupta S, Bhar A, Chatterjee M, et al (2017b) Transcriptomic dissection reveals wide spread differential expression in chickpea during early time points of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* Race 1 attack. PLoS ONE 12:e0178164. doi: 10.1371/journal.pone.0178164
- Gurjar GS, Giri AP, Gupta VS (2012) Gene Expression Profiling during Wilting in Chickpea Caused by *Fusarium oxysporum* F. sp. *ciceri*. AJPS 03:190–201. doi: 10.4236/ajps.2012.32023
- Halila MH, Strange RN (1996) Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 0. Phytopathol Mediterr 67–74.
- Halila I, Cobos MJ, Rubio J, et al (2009) Tagging and mapping a second resistance gene for *Fusarium* wilt race 0 in chickpea. Eur J Plant Pathol 124:87–92. doi: 10.1007/s10658-008-9395-x
- Halila I, Rubio J, Millán T, et al (2010) Resistance in chickpea (*Cicer arietinum*) to *Fusarium* wilt race ‘0.’ Plant Breeding. doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01703.x

- Hardigan MA, Crisovan E, Hamilton JP, et al (2016) Genome Reduction Uncovers a Large Dispensable Genome and Adaptive Role for Copy Number Variation in Asexually Propagated *Solanum tuberosum*. *Plant Cell* 28:388–405. doi: 10.1105/tpc.15.00538
- Haware MP, Nene YL (1982) Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant disease*, 66 66:809–810.
- Haware MP, Nene YL, Natarajan M (1996) The survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in the soil in the absence of chickpea. *Phytopathologia mediterranea* 9–12.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, et al (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19. doi: 10.1186/gb-2007-8-2-r19
- Hiremath PJ, Kumar A, Penmetsa RV, et al (2012) Large-scale development of cost-effective SNP marker assays for diversity assessment and genetic mapping in chickpea and comparative mapping in legumes. *Plant Biotechnol J* 10:716–732. doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00710.x
- Honnareddy N, Dubey SC (2006) Pathogenic and molecular characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. *Current science* 661–666.
- Hüttel B, Winter P, Weising K, et al (1999) Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 42:210–217. doi: 10.1139/g98-122
- Iruela M, Rubio J, Cubero JI, et al (2002) Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet* 104:643–651. doi: 10.1007/s001220100751
- Iruela M, Castro P, Rubio J, et al (2007) Validation of a QTL for resistance to ascochyta blight linked to resistance to fusarium wilt race 5 in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Eur J Plant Pathol* 119:29–37. doi: 10.1007/s10658-007-9121-0
- Jain M, Misra G, Patel RK, et al (2013) A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant J* 74:715–729. doi: 10.1111/tbj.12173
- Jeifetz D, David-Schwartz R, Borovsky Y, Paran I (2011) CaBLIND regulates axillary meristem initiation and transition to flowering in pepper. *Planta* 234:1227–1236. doi: 10.1007/s00425-011-1479-8
- Jendoubi W, Bouhadida M, Millan T, et al (2016) Identification of the target region including the *Foc0 1 /foc0 1* gene and development of near isogenic lines for resistance to *Fusarium* Wilt race 0 in chickpea. *Euphytica* 210:119–133. doi: 10.1007/s10681-016-1712-4
- Jendoubi W, Bouhadida M, Boukteb A, et al (2017) *Fusarium* Wilt Affecting Chickpea Crop. *Agriculture* 7:23. doi: 10.3390/agriculture7030023

- Jha UC, Chaturvedi SK, Bohra A, et al (2014) Abiotic stresses, constraints and improvement strategies in chickpea. *Plant Breeding* 133:163–178. doi: 10.1111/pbr.12150
- Jha UC (2018) Current advances in chickpea genomics: applications and future perspectives. *Plant Cell Rep* 37:947–965. doi: 10.1007/s00299-018-2305-6
- Jiao K, Li X, Su S, et al (2019) Genetic control of compound leaf development in the mungbean (*Vigna radiata* L.). *Hortic Res* 6:23. doi: 10.1038/s41438-018-0088-0
- Jiménez-Díaz RM, Basallote-Ureba MJ, Rapoport H (1989) Colonization and pathogenesis in chickpeas infected by races of *fusarium oxysporum* F. sp. *ciceri*. In: Tjamos EC, Beckman CH (eds) *Vascular wilt diseases of plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 113–121
- Jiménez-Díaz RM, Castillo P, Jiménez-Gasco M del M, et al (2015) Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Prot* 73:16–27. doi: 10.1016/j.cropro.2015.02.023
- Jimenez-Gasco M del M, Pérez-Artés E, Jiménez-Díaz R (2001) Identification of Pathogenic Races 0, 1B/C, 5, And 6 Of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Ciceris* With Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). 107:237–248.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, et al (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36:W5-9. doi: 10.1093/nar/gkn201
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582–587. doi: 10.1038/223582a0
- Jukanti AK, Gaur PM, Gowda CLL, Chibbar RN (2012) Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *Br J Nutr* 108 Suppl 1:S11-26. doi: 10.1017/S0007114512000797
- Kadam DC, Lorenz AJ (2018) Toward Redesigning Hybrid Maize Breeding Through Genomics-Assisted Breeding. In: Bennetzen J, Flint-Garcia S, Hirsch C, Tuberosa R (eds) *The Maize Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp 367–388
- Kaiser WJ, Alcalá-Jiménez AR, Hervas-Vargas A (1994) Screening of wild *Cicer* species for resistance to races 0 to 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant disease* (USA)
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, et al (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334. doi: 10.1007/s10681-010-0286-9
- Kalve S, Tadege M (2017) A comprehensive technique for artificial hybridization in Chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Methods* 13:52. doi: 10.1186/s13007-017-0202-6
- Kawall K (2019) New possibilities on the horizon: genome editing makes the whole genome accessible for changes. *Front Plant Sci* 10:525. doi: 10.3389/fpls.2019.00525

- Kazan K, Muehlbauer FJ, Weeden NE, Ladizinsky G (1993) Inheritance and linkage relationships of morphological and isozyme loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor Appl Genet* 86:417–426. doi: 10.1007/BF00838556
- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Keller T, Abbott J, Moritz T, Doerner P (2006) Arabidopsis REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1 controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development. *Plant Cell* 18:598–611. doi: 10.1105/tpc.105.038588
- Khan AR, Akhtar AR (1934) The inheritance of petal colour in gram. *Agric Livestock India*, 4 4:127–155.
- Khong GN, Pati PK, Richaud F, et al (2015) Osmads26 negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice. *Plant Physiol* 169:2935–2949. doi: 10.1104/pp.15.01192
- Kim MY, Lee S, Van K, et al (2010) Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:22032–22037. doi: 10.1073/pnas.1009526107
- Knights EJ (1987) The double-podded gene in chickpea improvement. *International Chickpea Newsletter*, 17 17:6–7.
- Korzun V (2002) Use of molecular markers in cereal breeding. *Cellular and molecular biology letters*, 7 7:811–820.
- Koseoglu K, Adak A, Sari D, et al (2017) Transgressive segregations for yield criteria in reciprocal interspecific crosses between *Cicer arietinum* L. and *C. reticulatum* Ladiz. *Euphytica* 213:116. doi: 10.1007/s10681-017-1903-7
- Kumar S (1998) Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt (race 2) in chickpea. *Plant Breeding* 117:139–142. doi: 10.1111/j.1439-0523.1998.tb01467.x
- Kumar J (2000a) Brief communication. Inheritance of flower color in chickpea. *J Hered* 91:416–417. doi: 10.1093/jhered/91.5.416
- Kumar J (2000b) Penetrance and expressivity of the gene for double podding in chickpea. *J Hered* 91:234–236. doi: 10.1093/jhered/91.3.234
- Kumar Y, Dholakia BB, Panigrahi P, et al (2015) Metabolic profiling of chickpea-*Fusarium* interaction identifies differential modulation of disease resistance pathways. *Phytochemistry* 116:120–129. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.04.001
- Kumar Y, Zhang L, Panigrahi P, et al (2016) *Fusarium oxysporum* mediates systems metabolic reprogramming of chickpea roots as revealed by a combination of proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnol J* 14:1589–1603. doi: 10.1111/pbi.12522
- Ladizinsky G, Adler A (1976) The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 25:211–217. doi: 10.1007/BF00041547



- Lai Y, Li H, Yamagishi M (2013) A review of target gene specificity of flavonoid R2R3-MYB transcription factors and a discussion of factors contributing to the target gene selectivity. *Front Biol (Beijing)* 8:577–598. doi: 10.1007/s11515-013-1281-z
- Landjeva S, Korzun V, Börner A (2007) Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156:271–296. doi: 10.1007/s10681-007-9371-0
- Langmead B (2010) Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 11:Unit 11.7. doi: 10.1002/0471250953.bi1107s32
- Laskar RA, Wani MR, Raina A, et al (2018). Morphological characterization of gamma rays induced multipodding mutant (*mp*) in lentil cultivar Pant L 406. *Int J Radiat Biol* 94:1049–1053. doi: 10.1080/09553002.2018.1511927
- 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 Mol Biol Rep* 7:116–128. doi: 10.1007/BF02669627
- Lee B, Henderson DA, Zhu J-K (2005) The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* 17:3155–3175. doi: 10.1105/tpc.105.035568
- Lee I, Seo Y-S, Coltrane D, et al (2011) Genetic dissection of the biotic stress response using a genome-scale gene network for rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18548–18553. doi: 10.1073/pnas.1110384108
- Lee YC, Iqbal MJ, Njiti VN, et al (2018) A Fine mapping quantitative trait loci that underlie resistance to soybean sudden death syndrome using NILs and SNPs. *AJB* 583–591. doi: 10.5147/ajb.v0i0.177
- Levitus G, Echenique V, Rubinstein C (2010) Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina
- Lichtenzweig J, Scheuring C, Dodge J, et al (2005) Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR markers for genome analysis of chickpea, *Cicer arietinum* L. *Theor Appl Genet* 110:492–510. doi: 10.1007/s00122-004-1857-8
- Liller CB, Walla A, Boer MP, et al (2017) Fine mapping of a major QTL for awn length in barley using a multiparent mapping population. *Theor Appl Genet* 130:269–281. doi: 10.1007/s00122-016-2807-y
- Liu S, Kandath PK, Warren SD, et al (2012) A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature* 492:256–260. doi: 10.1038/nature11651
- Liu W, Han X, Zhan G, et al (2015) A Novel Sucrose-Regulatory MADS-Box Transcription Factor GmNMHC5 Promotes Root Development and Nodulation in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Int J Mol Sci* 16:20657–20673. doi: 10.3390/ijms160920657

- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Li H, Rodda M, Gnanasambandam A, et al (2015) Breeding for biotic stress resistance in chickpea: progress and prospects. *Euphytica* 204:257–288. doi: 10.1007/s10681-015-1462-8
- Li H, Rasheed A, Hickey LT, He Z (2018) Fast-Forwarding Genetic Gain. *Trends Plant Sci* 23:184–186. doi: 10.1016/j.tplants.2018.01.007
- López-Bellido RJ, López-Bellido L, Benítez-Vega J, et al (2011) Chickpea and faba bean nitrogen fixation in a Mediterranean rainfed Vertisol: Effect of the tillage system. *European Journal of Agronomy* 34:222–230. doi: 10.1016/j.eja.2011.01.005
- Madrid E, Rajesh PN, Rubio J, et al (2012) Characterization and genetic analysis of an *EIN4-like* sequence (*CaETR-1*) located in QTL<sub>AR1</sub> implicated in ascochyta blight resistance in chickpea. *Plant Cell Rep* 31:1033–1042. doi: 10.1007/s00299-011-1221-9
- Madrid E, Seoane P, Claros MG, et al (2014) Genetic and physical mapping of the QTLAR3 controlling blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* 198:69–78. doi: 10.1007/s10681-014-1084-6
- Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A (2003) Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology (Reading, Engl)* 149:269–277. doi: 10.1099/mic.0.25975-0
- MAPAMA 2018. In: MAPAMA 2018. <https://www.mapama.gob.es/>. Accessed 15 Jan 2019
- Mannur DM, Babbar A, Thudi M, et al (2019) Super Annigeri 1 and improved JG 74: two Fusarium wilt-resistant introgression lines developed using marker-assisted backcrossing approach in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Breeding* 39:2. doi: 10.1007/s11032-018-0908-9
- Martin C, Paz-Ares J (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* 13:67–73. doi: 10.1016/S0168-9525(96)10049-4
- Mayer MS, Tullu A, Simon CJ, et al (1997) Development of a DNA marker for fusarium wilt resistance in chickpea. *Crop Sci* 37:1625. doi: 10.2135/cropsci1997.0011183X003700050036x
- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, et al (2015) The molecular biology of meiosis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 66:297–327. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035923
- Miah G, Rafii MY, Ismail MR, et al (2013) A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *Int J Mol Sci* 14:22499–22528. doi: 10.3390/ijms141122499
- Millan T, Winter P, Jüngling R, et al (2010) A consensus genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on 10 mapping populations. *Euphytica* 175:175–189. doi: 10.1007/s10681-010-0157-4

- Min X, Jin X, Liu W, et al (2019) Transcriptome-wide characterization and functional analysis of MATE transporters in response to aluminum toxicity in *Medicago sativa* L. *PeerJ* 7:e6302. doi: 10.7717/peerj.6302
- Moreno MT, Cubero JI (1978) Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27:465–485. doi: 10.1007/BF00043173
- Moreno JI, Martín R, Castresana C (2005) Arabidopsis *SHMT1*, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J* 41:451–463. doi: 10.1111/j.1365-3113.2004.02311.x
- Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T, Omote H (2008) Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica* 38:1107–1118. doi: 10.1080/00498250701883753
- Morris M, Dreher K, Ribaut JM, Khairallah M (2003) Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. *Molecular Breeding*, 11 11:235–247.
- Muehlbauer F, Singh K (1987) Genetics of chickpea. In: Saxena MC, Singh KB (eds) *The chickpea*. CABI Publ, Wallingford, pp 99–125
- Müller D, Schmitz G, Theres K (2006) Blind homologous R2R3 Myb genes control the pattern of lateral meristem initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* 18:586–597. doi: 10.1105/tpc.105.038745
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262:56–61, 64. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56
- Muñoz-Amatriaín M, Eichten SR, Wicker T, et al (2013) Distribution, functional impact, and origin mechanisms of copy number variation in the barley genome. *Genome Biol* 14:R58. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-r58
- Nawrath C (2002) EDS5, an Essential Component of Salicylic Acid-Dependent Signaling for Disease Resistance in Arabidopsis, Is a Member of the MATE Transporter Family. *THE PLANT CELL ONLINE* 14:275–286. doi: 10.1105/tpc.010376
- Nayak SN, Zhu H, Varghese N, et al (2010) Integration of novel SSR and gene-based SNP marker loci in the chickpea genetic map and establishment of new anchor points with *Medicago truncatula* genome. *Theor Appl Genet* 120:1415–1441. doi: 10.1007/s00122-010-1265-1
- Nefzi F, Trabelsi I, Amri M, et al (2016) Response of some chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to *Orobanche foetida* Poir. parasitism. *Chilean J Agric Res* 76:170–178. doi: 10.4067/S0718-58392016000200006
- Nicholas HB, Deerfield DW, Ropelewski AJ (2000) Strategies for searching sequence databases. *BioTechniques* 28:1174–8, 1180, 1182 passim. doi: 10.2144/00286bc01
- Ocampo B, Singh KB, Venora G, et al (1992). Karyotype analysis in the genus *Cicer*. *Journal of Genetics and Breeding*
- Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, et al (2003) New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human

- immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 41:4531–4536.
- Palomino C, Fernández-Romero MD, Rubio J, et al (2009) Integration of new CAPS and dCAPS-RGA markers into a composite chickpea genetic map and their association with disease resistance. *Theor Appl Genet* 118:671–682. doi: 10.1007/s00122-008-0928-7
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:600–604. doi: 10.1073/pnas.64.2.600
- Parween S, Nawaz K, Roy R, et al (2015) An advanced draft genome assembly of a desi type chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Sci Rep* 5:12806. doi: 10.1038/srep12806
- Pereira RY, Faria A, da Siva LC, et al (2016) Application of microsatellite markers to confirm controlled crosses and assess genetic identity in common bean. *Crop Breed Appl Biotechnol* 16:234–239. doi: 10.1590/1984-70332016v16n3n35
- Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK (2016) WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Front Plant Sci* 7:760. doi: 10.3389/fpls.2016.00760
- Prenner G (2013) Papilionoid inflorescences revisited (Leguminosae-Papilionoideae). *Ann Bot* 112:1567–1576. doi: 10.1093/aob/mcs258
- Radhika P, Gowda SJM, Kadoo NY, et al (2007) Development of an integrated intraspecific map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) using two recombinant inbred line populations. *Theor Appl Genet* 115:209–216. doi: 10.1007/s00122-007-0556-7
- Rajesh N, Tullu A, Gil J, et al (2002) Identification of an STMS marker for the double-podding gene in chickpea. *Theor Appl Genet* 105:604–607. doi: 10.1007/s00122-002-0930-4
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339:62–66. doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4
- Rasheed A, Xia X (2019) From markers to genome-based breeding in wheat. *Theor Appl Genet* 132:767–784. doi: 10.1007/s00122-019-03286-4
- Recorbet G, Steinberg C, Olivain C, et al (2003) Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytol* 159:73–92. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00795.x
- Ridge S, Deokar A, Lee R, et al (2017) The chickpea early flowering 1 (ef11) locus is an ortholog of arabidopsis ELF3. *Plant Physiol* 175:802–815. doi: 10.1104/pp.17.00082
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29:24–26. doi: 10.1038/nbt.1754
- Rubio J, Moreno MT, Cubero JI, Gil J (1998) Effect of the gene for double pod in chickpea on yield, yield components and stability of yield. *Plant Breeding* 117:585–587. doi: 10.1111/j.1439-0523.1998.tb02214.x

- Rubio J, Hajj-Moussa E, Kharrat M, et al (2003a) Two genes and linked RAPD markers involved in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0 in chickpea. *Plant Breeding* 122:188–191. doi: 10.1046/j.1439-0523.2003.00814.x
- Rubio J, Moreno MT, Martinez C, Gil J (2003b) Registration of CA2969, an Ascochyta Blight Resistant and Double-Podded Chickpea Germplasm. *Crop Sci* 43:1567. doi: 10.2135/cropsci2003.1567
- Rubio J, Flores F, Moreno MT, et al (2004) Effects of the erect/bushy habit, single/double pod and late/early flowering genes on yield and seed size and their stability in chickpea. *Field Crops Res* 90:255–262. doi: 10.1016/j.fcr.2004.03.005
- Rubio J, Gil J, Cobos MJ, Millán T (2012) Chickpea. In: Pérez de la Vega M, Torres AM, Cubero JI, Kole C (eds) *Genetics, Genomics and Breeding of Cool Season Grain Legumes*. Science Publishers, Boca Raton, USA, 205–233
- Ruperao P, Chan C-KK, Azam S, et al (2014) A chromosomal genomics approach to assess and validate the desi and kabuli draft chickpea genome assemblies. *Plant Biotechnol J* 12:778–786. doi: 10.1111/pbi.12182
- Rutherford SL (2003) Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. *Nat Rev Genet* 4:263–274. doi: 10.1038/nrg1041
- Saha G, Park J-I, Jung H-J, et al (2015) Genome-wide identification and characterization of MADS-box family genes related to organ development and stress resistance in *Brassica rapa*. *BMC Genomics* 16:178. doi: 10.1186/s12864-015-1349-z
- Saier MH, Paulsen IT (2001) Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 12:205–213. doi: 10.1006/scdb.2000.0246
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 15:227–239. doi: 10.1093/dnares/dsn008
- Saxena MC, Singh KB (1987) *The Chickpea*. C.A.B. International, UK. pp. 233-270
- Saxena MS, Bajaj D, Das S, et al (2014) An Integrated Genomic Approach for Rapid Delineation of Candidate Genes Regulating Agro-Morphological Traits in Chickpea. *DNA Res* 21:695–710. doi: 10.1093/dnares/dsu031
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–1108.
- Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, et al (2002) The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1064–1069. doi: 10.1073/pnas.022516199
- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, et al (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* 46:707–713. doi: 10.1038/ng.3008
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234. doi: 10.1038/72708

- Sen S, Chakraborty J, Ghosh P, et al (2017) Chickpea WRKY70 Regulates the Expression of a Homeodomain-Leucine Zipper (HD-Zip) I Transcription Factor CaHDZ12, which Confers Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Tobacco and Chickpea. *Plant Cell Physiol* 58:1934–1952. doi: 10.1093/pcp/pcx126
- Sethy NK, Shokeen B, Bhatia S (2003) Isolation and characterization of sequence-tagged microsatellite sites markers in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Ecol Notes* 3:428–430. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00472.x
- Sethy NK, Choudhary S, Shokeen B, Bhatia S (2006a) Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. *Theor Appl Genet* 112:347–357. doi: 10.1007/s00122-005-0135-8
- Sethy NK, Shokeen B, Edwards KJ, Bhatia S (2006b) Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor Appl Genet* 112:1416–1428. doi: 10.1007/s00122-006-0243-0
- Sharma KD, Winter P, Kahl G, Muehlbauer FJ (2004) Molecular mapping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 3 resistance gene in chickpea. *Theor Appl Genet* 108:1243–1248. doi: 10.1007/s00122-003-1561-0
- Sharma KD, Chen W, Muehlbauer FJ (2005) Genetics of Chickpea Resistance to Five Races of *Fusarium* Wilt and a Concise Set of Race Differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis* 89:385–390. doi: 10.1094/PD-89-0385
- Sharma KD, Muehlbauer FJ (2007) *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica* 157:1–14. doi: 10.1007/s10681-007-9401-y
- Sharma S, Upadhyaya HD, Varshney RK, Gowda CLL (2013) Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Front Plant Sci* 4:309. doi: 10.3389/fpls.2013.00309
- Sharma M, Ghosh R (2016) An update on genetic resistance of chickpea to ascochyta blight. *Agronomy* 6:18. doi: 10.3390/agronomy6010018
- Sharma M, Sengupta A, Ghosh R, et al (2016) Genome wide transcriptome profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* conidial germination reveals new insights into infection-related genes. *Sci Rep* 6:37353. doi: 10.1038/srep37353
- Simon CJ, Muehlbauer FJ (1997) Construction of a chickpea linkage map and its comparison with maps of pea and lentil. *J Hered* 88:115–119. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023068
- Singh KB (1987) Chickpea breeding. In: Saxena MC, Singh KB (eds). *The Chickpea*. C.A.B. International, UK. pp. 127-162
- Singh O, Van Rheenen HA (1989) A possible role for the double-podded character in stabilizing the grain yield of chickpea. *Indian J Pulses Res*, 2 2:97–101.

- Singh O, Van Rheenen HA (1994) Genetics and contributions of the multiseeded and double-podded characters to grain yield of chickpea. *Indian Journal of Pulses Research*, 7 7:97–102.
- Singh KB, Malhotra RS, Saxena MC, Bejiga G (1997) Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. *Agron J*, 89 112–118.
- Singh KP, Chaturvedi SK (1998) Genetics of triple floweredness in chickpea. *Indian Journal of Pulses Research*, 11 11:15–17.
- Singh R, Sharma P, Varshney RK, et al (2008) Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 25:267–314. doi: 10.5661/bger-25-267
- Singh VK, Garg R, Jain M (2013) A global view of transcriptome dynamics during flower development in chickpea by deep sequencing. *Plant Biotechnol J* 11:691–701. doi: 10.1111/pbi.12059
- Smaczniak C, Immink RGH, Angenent GC, Kaufmann K (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139:3081–3098. doi: 10.1242/dev.074674
- Solanki RK, Singh S, Kumar J (2010) Molecular marker assisted testing of hybridity of F. *Food Legumes*, 23 23:21–24.
- Song H, Sun W, Yang G, Sun J (2018) WRKY transcription factors in legumes. *BMC Plant Biol* 18:243. doi: 10.1186/s12870-018-1467-2
- Springer NM, Ying K, Fu Y, et al (2009) Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. *PLoS Genet* 5:e1000734. doi: 10.1371/journal.pgen.1000734
- Srinivasan S, Gaur PM, Chaturvedi SK, Rao BV (2006) Allelic relationships of genes controlling number of flowers per axis in chickpea. *Euphytica* 152:331–337. doi: 10.1007/s10681-006-9219-z
- Stefaniak T, McPhee K (2017) Comparison of hybridization techniques in chickpea. *Crop Sci* 57:843. doi: 10.2135/cropsci2016.04.0253
- Sun C-H, Yu J-Q, Wen L-Z, et al (2018) Chrysanthemum MADS-box transcription factor CmANR1 modulates lateral root development via homo-/heterodimerization to influence auxin accumulation in Arabidopsis. *Plant Sci* 266:27–36. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.09.017
- Swanson-Wagner RA, Eichten SR, Kumari S, et al (2010) Pervasive gene content variation and copy number variation in maize and its undomesticated progenitor. *Genome Res* 20:1689–1699. doi: 10.1101/gr.109165.110
- Tadele Z (2016) Mutagenesis and TILLING to dissect gene function in plants. *Curr Genomics* 17:499–508. doi: 10.2174/1389202917666160520104158
- Takanashi K, Shitan N, Yazaki K (2014) The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotechnology* 31:417–430. doi: 10.5511/plantbiotechnology.14.0904a

- Taran B, Warkentin TD, Vandenberg A (2013) Fast track genetic improvement of ascochyta blight resistance and double podding in chickpea by marker-assisted backcrossing. *Theor Appl Genet* 126:1639–1647. doi: 10.1007/s00122-013-2080-2
- Tarikul HM, Chandra DA (2013) Inheritance study of flower color in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Indian J Agric Res* 47:445–448
- Taylor SA, Hofer JMI, Murfet IC, et al (2002) PROLIFERATING INFLORESCENCE MERISTEM, a MADS-box gene that regulates floral meristem identity in pea. *Plant Physiol* 129:1150–1159. doi: 10.1104/pp.001677
- Tekeoglu M, Tullu A, Kaiser WJ, Muehlbauer FJ (2000) Inheritance and Linkage of Two Genes that Confer Resistance to Fusarium Wilt in Chickpea. *Crop Sci* 40:1247. doi: 10.2135/cropsci2000.4051247x
- Theißen G, Gramzow L (2016) Structure and evolution of plant MADS domain transcription factors. *Plant Transcription Factors*. Elsevier, pp 127–138
- Thudi M, Bohra A, Nayak SN, et al (2011) Novel SSR markers from BAC-end sequences, DArT arrays and a comprehensive genetic map with 1,291 marker loci for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PLoS ONE* 6:e27275. doi: 10.1371/journal.pone.0027275
- Thudi M, Khan AW, Kumar V, et al (2016) Whole genome re-sequencing reveals genome-wide variations among parental lines of 16 mapping populations in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Plant Biol* 16 Suppl 1:10. doi: 10.1186/s12870-015-0690-3
- Tiwari M, Sharma D, Singh M, et al (2014) Expression of *OsMATE1* and *OsMATE2* alters development, stress responses and pathogen susceptibility in Arabidopsis. *Sci Rep* 4:3964. doi: 10.1038/srep03964
- Toker C, Canci H, Ceylan FO (2006) Estimation of Outcrossing Rate in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Sown in Autumn. *Euphytica* 151:201–205. doi: 10.1007/s10681-006-9140-5
- Torres AM, Weeden NF, Martín A (1993) Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor Appl Genet* 85:937–945. doi: 10.1007/BF00215032
- Tullu A, Kaiser WJ, Kraft JM, Muehlbauer FJ (1999) A second gene for resistance to race 4 of Fusarium wilt in chickpea and linkage with a RAPD marker. *Euphytica*, 109 109:43–50.
- UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47:D506–D515. doi: 10.1093/nar/gky1049
- Upadhyaya HD, Smithson JB, Haware MP, Kumar J (1983) Resistance to wilt in chickpea. II. Further evidence for two genes for resistance to race 1. *Euphytica* 32:749–755. doi: 10.1007/BF00042155
- Upadhyaya HD, Salimath PM, Gowda CLL, Singh S (2007) New early-maturing germplasm lines for utilization in chickpea improvement. *Euphytica* 157:195–208. doi: 10.1007/s10681-007-9411-9



- Upasani ML, Limaye BM, Gurjar GS, et al (2017) Chickpea-*Fusarium oxysporum* interaction transcriptome reveals differential modulation of plant defense strategies. *Sci Rep* 7:7746. doi: 10.1038/s41598-017-07114-x
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Van der Maesen LJG (1987) Origin, history and taxonomy of chickpea. In: Saxena MC, Singh KB (eds) *The Chickpea*. C.A.B. International, pp 11–34
- Varshney RK, Chen W, Li Y, et al (2011) Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nat Biotechnol* 30:83–89. doi: 10.1038/nbt.2022
- Varshney RK, Song C, Saxena RK, et al (2013) Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat Biotechnol* 31:240–246. doi: 10.1038/nbt.2491
- Varshney RK, Thudi M, Pandey MK, et al (2018) Accelerating genetic gains in legumes for the development of prosperous smallholder agriculture: integrating genomics, phenotyping, systems modelling and agronomy. *J Exp Bot* 69:3293–3312. doi: 10.1093/jxb/ery088
- Varshney RK, Pandey MK, Bohra A, et al (2019) Toward the sequence-based breeding in legumes in the post-genome sequencing era. *Theor Appl Genet* 132:797–816. doi: 10.1007/s00122-018-3252-x
- Verma S, Gupta S, Bandhiwal N, et al (2015) High-density linkage map construction and mapping of seed trait QTLs in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using Genotyping-by-Sequencing (GBS). *Sci Rep* 5:17512. doi: 10.1038/srep17512
- Vieira L de J, Tavares Filho LF De Q, Souza FVD et al (2013) Development of interspecific hybrids of cassava and paternity analysis with molecular markers. *J Agric Sci* 151:849–861. doi: <https://doi.org/10.1017/S0021859612000871>
- Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz C de F (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 39:312–328. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027
- Voll LM, Jamai A, Renné P, et al (2006) The photorespiratory Arabidopsis *shm1* mutant is deficient in *SHM1*. *Plant Physiol* 140:59–66. doi: 10.1104/pp.105.071399
- Wang Y, Li J (2008) Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol* 59:253–279. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092902
- Wang X, Wang Y, Zhang G, Ma Z (2011) An integrated breeding technology for accelerating generation advancement and trait introgression in cotton. *Plant Breeding* 130:569–573. doi: 10.1111/j.1439-0523.2011.01868.x

- Wang L, Yin X, Cheng C, et al (2015) Evolutionary and expression analysis of a MADS-box gene superfamily involved in ovule development of seeded and seedless grapevines. *Mol Genet Genomics* 290:825–846. doi: 10.1007/s00438-014-0961-y
- Wang Y, Xiao L, Guo S, et al (2016) Fine Mapping and Whole-Genome Resequencing Identify the Seed Coat Color Gene in *Brassica rapa*. *PLoS ONE* 11:e0166464. doi: 10.1371/journal.pone.0166464
- Wang J, Hou Q, Li P, et al (2017) Diverse functions of multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters in citric acid efflux and metal homeostasis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 90:79–95. doi: 10.1111/tpj.13471
- Wei B, Cai T, Zhang R, et al (2009) Novel microRNAs uncovered by deep sequencing of small RNA transcriptomes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Funct Integr Genomics* 9:499–511. doi: 10.1007/s10142-009-0128-9
- Wei Z, Sun K, Sandoval FJ, et al (2013) Folate polyglutamylation eliminates dependence of activity on enzyme concentration in mitochondrial serine hydroxymethyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* 536:87–96. doi: 10.1016/j.abb.2013.06.004
- Winter P, Pfaff T, Udupa SM, et al (1999) Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol Gen Genet* 262:90–101. doi: 10.1007/s004380051063
- Winter P, Benko-Iseppon AM, Hüttel B, et al (2000) A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum*×*C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theor Appl Genet* 101:1155–1163. doi: 10.1007/s001220051592
- Wood JA, Grusak MA (2007) Nutritional value of chickpea. In: Yadav SS, Redden RJ, Chen W, Sharma B (eds) *Chickpea breeding and management*. CABI, Wallingford, pp 101–142
- Wu X-Y, Zhou G-C, Chen Y-X, et al (2016) Soybean cyst nematode resistance emerged via artificial selection of duplicated serine hydroxymethyltransferase genes. *Front Plant Sci* 7:998. doi: 10.3389/fpls.2016.00998
- Wu Y, Zhao S, Li X, et al (2018) Deletions linked to *PROG1* gene participate in plant architecture domestication in Asian and African rice. *Nat Commun* 9:4157. doi: 10.1038/s41467-018-06509-2
- Yadav LN, Mahadik CN, Dixit SS (1978) Inheritance of double podded character and petal colour in gram (*Cicer arietinum* L.). *Sci Cult* 44: 537.
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, et al (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* 60:107–124. doi: 10.1007/s11103-005-2910-y
- Yasar M, Ceylan FO, Ikten C, Toker C (2014) Comparison of expressivity and penetrance of the double podding trait and yield components based on

- reciprocal crosses of kabuli and desi chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* 196:331–339. doi: 10.1007/s10681-013-1036-6
- Yin W, Hu Z, Hu J, et al (2017) Tomato (*Solanum lycopersicum*) MADS-box transcription factor *SIMBP8* regulates drought, salt tolerance and stress-related genes. *Plant Growth Regul* 83:55–68. doi: 10.1007/s10725-017-0283-2
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, et al (2011) The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480:520–524. doi: 10.1038/nature10625
- Zatloukalová P, Hřibová E, Kubaláková M, et al (2011) Integration of genetic and physical maps of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome using flow-sorted chromosomes. *Chromosome Res* 19:729–739. doi: 10.1007/s10577-011-9235-2
- Zhang Y, Sun K, Sandoval FJ, et al (2010) One-carbon metabolism in plants: characterization of a plastid serine hydroxymethyltransferase. *Biochem J* 430:97–105. doi: 10.1042/BJ20100566
- Zhao Y, Li X, Chen W, et al (2011) Whole-genome survey and characterization of MADS-box gene family in maize and sorghum. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105:159–173. doi: 10.1007/s11240-010-9848-8
- Zhao H, Basu U, Kebede B, et al (2019) Fine mapping of the major QTL for seed coat color in *Brassica rapa* var. Yellow Sarson by use of NIL populations and transcriptome sequencing for identification of the candidate genes. *PLoS ONE* 14:e0209982. doi: 10.1371/journal.pone.0209982
- Zohary D, Hopf M (2000) Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Oxford University Press
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406–3415. doi: 10.1093/nar/gkg595
- Zuriaga E, Romero C, Blanca JM, Badenes ML (2018) Resistance to *Plum Pox Virus* (PPV) in apricot (*Prunus armeniaca* L.) is associated with down-regulation of two *MATHd* genes. *BMC Plant Biol* 18:25. doi: 10.1186/s12870-018-1237-1



