



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del Desarrollo Rural

Sostenible

TESIS DOCTORAL

**Estudio de caracteres florales reproductivos y de la dehiscencia
de la vaina en leguminosas**

Study of reproductive floral traits and pod dehiscence in legumes

Directoras

Ana M^a Torres Romero

Teresa Millán Valenzuela

Doctorando

David Aguilar Benitez

Córdoba, 2021

TITULO: *Estudio de caracteres florales reproductivos y de la dehiscencia de la vaina en leguminosas*

AUTOR: *David Aguilar Benítez*

© Edita: UCOPress. 2021
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:

Estudio de caracteres florales reproductivos y de la dehiscencia de la vaina en leguminosas

DOCTORANDO/A:

David Aguilar Benitez

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El trabajo titulado: "Estudio de caracteres florales reproductivos y de la dehiscencia de la vaina en leguminosas" se considera finalizado y reúne los requisitos para su exposición y defensa como tesis doctoral. La tesis se ha desarrollado en el Área de Genómica y Biotecnología del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), centro Alameda del Obispo de Córdoba y se ha centrado en el estudio de tres caracteres: dehiscencia, fecha de floración y autofertilidad, de gran importancia para la estabilidad y el rendimiento del cultivo. Los objetivos concretos han sido:

- Identificación y mapeo de genes candidatos de la ruta general de dehiscencia en garbanzo y habas, y análisis de su posible relación con la dehiscencia de la vaina (Capítulos I y II).
- Identificación y mapeo de genes candidatos relacionados con la fecha de floración en habas (Capítulo III).
- Estudio y mapeo de caracteres relacionados con la autofertilidad en habas (Capítulo IV).

Se ha empleado la estrategia de genes candidatos derivados de especies modelo y otras leguminosas cercanas para saturar los mapas genéticos de habas y garbanzos e identificar genes ortólogos en ambos cultivos. Tras realizar un exhaustivo estudio histológico y fenotípico de la dehiscencia, los datos obtenidos se emplearon para realizar un análisis de QTLs que reveló la herencia poligénica o cuantitativa del carácter y su localización en los respectivos cromosomas. Ambos trabajos (capítulos I y II), fueron pioneros, mostrando la conservación de genes y apuntando hacia mecanismos y rutas homólogas en el control de la dehiscencia entre leguminosas, aunque los análisis histológicos evidenciaron una mayor complejidad en el patrón de lignificación de las vainas de habas. En el capítulo III, se aplicó la misma estrategia para identificar QTLs y genes ortólogos reguladores de la fecha de

floración en habas. Se identificaron varios QTLs sinténicos con otras especies (el más importante en el cromosoma V), demostrando el alto grado de conservación de la ruta de control de la floración y apuntando a una posible regulación epigenética del carácter en habas. Por último, en el capítulo IV, se ha realizado un meticuloso estudio de la genética del carácter autofertilidad (capacidad de las flores para autofecundarse en ausencia de polinizadores o de una perturbación mecánica), importante para el éxito reproductivo del cultivo. Se diseccionó el carácter autofertilidad en diferentes características de la flor y del polen, asociados al cuajado de vainas y semillas. Los caracteres florales (polen, ovario y estilo) se analizaron con microscopio convencional y con microscopio electrónico de barrido y los reproductivos se evaluaron en campo en distintas campañas. Los resultados mostraron una clara asociación de la cantidad de polen viable y el ángulo estilo-ovario con la autofertilidad. Del mismo modo, se encontró un gran número de QTLs co-localizando en seis regiones genómicas, las cuales se encuentran flanqueadas por genes funcionalmente relacionados con las medidas de cantidad de polen y cuajado de vainas y semillas.

La calidad y novedad de estos resultados está avalada por tres recientes publicaciones en revistas indexadas en el Journal Citation Reports (JCR) dentro del primer cuartil. Los resultados del capítulo IV se resumen un cuarto manuscrito que será enviado próximamente para su publicación. Dichos trabajos junto a otras actividades científicas relacionadas con las líneas de investigación desarrolladas se reseñan a continuación:

PUBLICACIONES

Aguilar-Benitez D, Rubio J, Millán T, Gil J, Die JV, Castro P (2020). Genetic analysis reveals PDH1 as a candidate gene for control of pod dehiscence in chickpea. *Mol Breeding* 40, 40. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01117-9>

Aguilar-Benitez D, Casimiro-Soriguer I, Torres AM (2020). First approach to pod dehiscence in faba bean: genetic and histological analyses. *Sci Rep* 10, 17678. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74750-1>

Aguilar-Benitez D, Casimiro-Soriguer I, Maalouf F, Torres AM. Flowering time in faba bean: linkage mapping and QTL analysis. *Sci Rep* (en revisión, R1)

Aguilar-Benitez D, Casimiro-Soriguer I, Ferrandiz C, Torres AM. Study and QTL Mapping of reproductive and morphological traits implicated in the Autofertility of Faba Bean (pendiente de envío)

Casimiro-Soriguer I, Aguilar-Benitez, D, Torres AM (2020). Estudio de la autofertilidad en habas. Aplicaciones en mejora. SERVIFAPA, Informes Científico Técnicos 30/01/2020

CONGRESOS

AUTORES: Aguilar D, T. Millán, J. Gil, J. Rubio, A.M. Torres
TÍTULO: Genomic approaches to identify candidate genes controlling pod dehiscence in chickpea and faba bean
TIPO DE PARTICIPACION: Poster
CONGRESO: 8th International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG). Book of abstracts, ICLGG2017/P/53
LUGAR: Siófok, Hungary FECHA: 18-22 September 2017

AUTORES: Casimiro-Soriguer I, D. Aguilar, A.M. Torres
TÍTULO: Unravelling autofertility in faba bean (*Vicia faba* L.)
TIPO DE PARTICIPACION: ORAL
CONGRESO: International Conference. Advances in grain legume breeding, cultivation and uses for a more competitive value-chain
LUGAR: Novi Sad, Serbia FECHA: 27-28 September 2017

AUTORES: Casimiro-Soriguer I, Aguilar D, Torres AM and Ferrándiz C
TÍTULO: Analysing faba bean autofertility under the Scanning Electron Microscope
TIPO DE PARTICIPACION: Oral
CONGRESO: Seventh International Food Legumes Research Conference
LUGAR: Marrakesh, Morocco FECHA: May 06-08, 2018

AUTORES: Gutiérrez N, Carmen M Ávila, M Dolores Fernández, David Aguilar, Inés Casimiro-Soriguer I, Clara González and Ana M Torres
TÍTULO: Recent advances in marker assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.)
TIPO DE PARTICIPACION: Oral
CONGRESO: Seventh International Food Legumes Research Conference
LUGAR: Marrakesh, Morocco FECHA: May 06-08, 2018

AUTORES: Gutiérrez N, Carmen M Ávila, M Dolores Fernández, David Aguilar, Inés Casimiro-Soriguer I, Clara González and Ana M Torres
TÍTULO: Proyectos Europeos (EUCLEG)
TIPO DE PARTICIPACION: Oral
CONGRESO: Jornada Científico-Técnica CeIA3 y VI Jornada AEL. Leguminosas en la agricultura y la alimentación
LUGAR: Córdoba, España FECHA: 22-23 de octubre de 2018

AUTORES: Aguilar D., Millán T., Gil J., Rubio J., Torres AM
TÍTULO: Estudio de la dehiscencia en garbanzos y habas
TIPO DE PARTICIPACION: Oral

CONGRESO: Jornada Científico-Técnica Ceia3 y VI Jornada AEL. Leguminosas en la agricultura y la alimentación

LUGAR: Córdoba, España FECHA: 22-23 de octubre de 2018

AUTORES: Aguilar D, Casimiro-Soriguer I, Fernández I, Ferrándiz C, Gil J, Rubio J, Millán T, Torres AM

TÍTULO: Análisis de la autofertilidad y dehiscencia en poblaciones de habas y garbanzos

TIPO DE PARTICIPACION: poster

CONGRESO: Primer congreso jóvenes investigadores en ciencias agrarias

LUGAR: Almería, España FECHA: 20 de diciembre de 2018

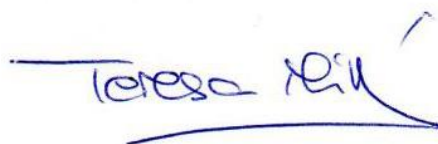
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 3 de junio de 2020

Firma del/de los director/es



Fdo.: Ana Mª Torres Romero



Fdo.: Teresa Millán Valenzuela

Tesis como Compendio de Publicaciones:

Esta tesis se presenta como compendio de publicaciones, cumpliendo con los requisitos establecidos por la Universidad de Córdoba, ya que incluye cuatro capítulos correspondientes a 3 artículos publicados en revistas incluidas en el primer cuartil de la relación de revistas del ámbito de la especialidad y referenciadas en la última relación publicada por el Journal Citations Reports (SCI):

Aguilar-Benitez D., Rubio J., Millán T., Gil J., Die J.V., Castro P., 2020. Genetic analysis reveals PDH1 as a candidate gene for control of pod dehiscence in chickpea. *Molecular Breeding*. Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 2.149, posición 6/36, primer cuartil (Q1) en el área temática de Horticulture.

Aguilar-Benitez D., Casimiro-Soriguer I., Torres A.M., 2020. First approach to pod dehiscence in faba bean: genetic and histological analyses. *Scientific Reports*. Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 3.998, posición 17/71, primer cuartil (Q1) en el área temática de Multidisciplinary Sciences.

Aguilar-Benitez D., Casimiro-Soriguer I., Maalouf F., Torres A.M., 2021. Flowering time in faba bean: linkage mapping and QTL analysis. *Scientific Reports*. Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 3.998, posición 17/71, primer cuartil (Q1) en el área temática de Multidisciplinary Sciences.

El doctorando:



Fdo.: David Aguilar Benitez

El presente trabajo se enmarca dentro de los proyectos ProFaba_SusCrop-ERA-NET (AEI.PCIN2019.001), AVA2019.030 de la Junta de Andalucía 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 Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica) y AGR114 (Dpto. de Genética de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes de la Universidad de Córdoba). El doctorando agradece la concesión de una beca predoctoral INIA-CCAA.

Agradecimientos

Creo que este es uno de los apartados más importantes de una tesis doctoral y no debería ser descuidado. Por eso mismo no quiero olvidarme de nadie a quien agradecer.

En un primer momento, quiero agradecer a todo el departamento de Genética de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes, donde comencé mi aventura investigadora antes de empezar siquiera con la tesis: a todas las personas que pasaron por allí: alumnos de prácticas, trabajo fin de grado y fin de máster, predoctorales (ya doctores) y doctores, que proporcionaron un gran ambiente y ayuda en ese pequeño hueco cerca del laboratorio; a las técnicas Maricarmen y Lola, quienes siempre estaban ahí para ayudar con una sonrisa; a Juan Gil y Roberto, con los que empecé a trabajar y tanto me enseñaron; y a Patricia y José, que ayudaron tanto con la publicación de mi primer artículo científico.

A quien más tengo que agradecer es a toda la gente del IFAPA, que me han acompañado y ayudado durante toda esta etapa de mi vida. A Josefina, Sergio y Carmen, que siempre amenizaban el desayuno y siempre estaban ahí para cualquier consulta y para curtir al becario con sus sutiles comentarios; a Alejandro por su gran ayuda con histología, sin ella habría sido más difícil conseguir tan buenos resultados; a Rosa, Lola y Susana, por su inestimable ayuda en el laboratorio y el campo; a Juan y Mariano, que siempre estaban para ayudar con los ensayos de campo y por enseñarme tanto de la parte "de bota" de la investigación; a Cristina, por ser mi predecesora en la beca y tesis y que siempre me ha ayudado con todas las dudas y cuestiones que he tenido al respecto; y a Natalia, que siempre me recibía en su despacho con una sonrisa para resolver cualquier pregunta que tuviese por muy absurda que fuese.

Por último, me gustaría agradecer a mis 3 directoras de tesis (si he dicho 3), dos de ellas sobre el papel y oficial, y una tercera encubierta por desacuerdos burocráticos. Gracias a Inés por todo el apoyo y ayuda con los ensayos de campo, los análisis de datos y la tesis en general, creo que si no hubieses estado ahí este camino habría sido otro totalmente diferente. Por supuesto, gracias a Ana y Teresa, que han confiado en mí y me han apoyado y ayudado durante todo este tiempo, ha sido un camino muy largo, divertido, interesante, con algunos momentos duros; esta es una experiencia que formará parte de mí para siempre.

Ya para acabar, gracias a Silvia, que también me ha acompañado durante todo el camino, siendo un apoyo para los momentos malos y para los buenos. Por supuesto, gracias a mi familia, gracias a ellos soy quien soy y he llegado hasta donde estoy, sin su apoyo incondicional no habría sido capaz de convertirme en quien soy ahora.

A todas estas personas y todas aquellas que han formado parte de esta etapa de mi vida, ¡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

RESUMEN.....	- 1 -
SUMMARY	- 3 -
INTRODUCCIÓN GENERAL	- 5 -
1. Aspectos generales de las leguminosas.....	- 7 -
2. Las habas. Características e importancia económica	- 9 -
3. Mejora de las habas.....	- 13 -
4. Empleo de herramientas genómicas en la mejora de habas.....	- 18 -
4.1. Mapas genéticos	- 20 -
4.2. Genómica comparada y sintenia	- 21 -
4.3. Genómica funcional	- 25 -
5. Evaluaciones fenotípicas.....	- 26 -
5.1. Evaluación dehiscencia.....	- 26 -
5.2. Evaluaciones autofertilidad	- 27 -
OBJETIVOS.....	- 29 -
CAPÍTULO I	
Análisis genéticos revelan a PDH1 como un gen candidato para el control de la dehiscencia de la vaina en garbanzo	- 31 -
Resumen	- 33 -
Abstract.....	- 35 -
1. Introduction.....	- 37 -
2. Material and Methods	- 39 -
2.1. Plant material	- 39 -
2.2. Phenotypic evaluation.....	- 40 -
2.3. Identification of chickpea dehiscence-related genes and primer design	- 41 -
2.3. PCR amplification and polymorphism detection	- 42 -
2.4. Genetic mapping and association analysis	- 42 -
3. Results.....	- 43 -
3.1. Phenotypic evaluation.....	- 43 -

3.2. Identification of chickpea dehiscence-related genes and marker development.....	- 45 -
3.3. Identification of genomic regions associated with shattering	- 46 -
4. Discussion	- 51 -
5. Concluding remarks	- 54 -
Acknowledgements.....	- 55 -
Online Resources.....	- 56 -

CAPÍTULO II

Primera aproximación a la dehiscencia de la vaina en habas: Análisis genéticos e histológicos..... - 65 -

Resumen	- 67 -
Abstract.....	- 69 -
1. Introduction	- 71 -
2. Results.....	- 75 -
2.1. Phenotypic evaluation of dehiscence.....	- 75 -
2.2. Dehiscence candidate genes and marker development.....	- 78 -
2.3. Genetic map and synteny analysis	- 79 -
2.4. QTL analysis.....	- 82 -
2.5. Histological characterization.....	- 85 -
3. Discussion	- 88 -
4. Material and Methods	- 95 -
4.1. Plant material.....	- 95 -
4.2. Phenotypic evaluation	- 95 -
4.3. Dehiscence candidate genes and primer design.....	- 96 -
4.4. PCR amplification and polymorphism detection	- 97 -
4.5. Genetic mapping and QTL analysis	- 98 -
4.6. Histological sample preparation	- 99 -
4.7. Staining procedure	- 100 -
Acknowledgements.....	- 100 -
Supplementary Material	- 101 -

CAPÍTULO III

Mapa de ligamiento y análisis de QTL de la fecha de floración en habas..... - 115 -

Resumen	- 117 -
Abstract.....	- 119 -
1. Introduction.....	- 121 -
2. Results.....	- 124 -
2.1. Phenotypic evaluation.....	- 124 -
2.2. Identification of flowering-related genes and primer design.....	- 126 -
2.3. Genetic mapping.....	- 127 -
2.4. QTL analysis	- 129 -
3. Discussion	- 133 -
4. Material and Methods	- 138 -
4.1. Plant material	- 138 -
4.2. Phenotypic evaluation.....	- 139 -
4.3. Flowering-related genes and primer design.....	- 140 -
4.4. PCR amplification and polymorphism detection	- 140 -
4.5. Genetic mapping and QTL analysis	- 141 -
4.6. Ethical approval.....	- 142 -
Acknowledgements	- 142 -
Supplementary Material	- 143 -

CAPÍTULO IV

Estudio y localización de QTLs para caracteres morfológicos y reproductivos implicados en la Autofertilidad de habas..... - 147 -

Resumen	- 149 -
1. Introducción	- 151 -
2. Material y Métodos.....	- 154 -
2.1. Material Vegetal.....	- 154 -
2.2. Evaluación de campo	- 155 -
2.3. Tamaño del polen y cuantificación de la producción	- 156 -
2.4. Viabilidad del polen y receptividad del estigma.....	- 157 -

2.5. Medidas morfológicas de la flor, ovario y estilo.....	158 -
2.6. Medidas del estigma en el Microscopio Electrónico de Barrido	158 -
2.7. Análisis de QTL	159 -
3. Resultados	159 -
3.1. Evaluación de campo	159 -
3.2. Tamaño del polen y cuantificación de la producción	162 -
3.3. Viabilidad del polen y receptividad del estigma.....	164 -
3.4. Medidas morfológicas de las flor, ovario y estilo	165 -
3.5. Medidas del estigma en el Microscopio Electrónico de Barrido	166 -
3.6. Análisis de QTL	167 -
4. Discusión.....	173 -
Material Suplementario	179 -
DISCUSIÓN GENERAL.....	185 -
CONCLUSIONES.....	195 -
BIBLIOGRAFÍA.....	199 -

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

- Figura 1.** Datos de producción y superficie cultivada de leguminosas grano en España (MAPA 2019)..... - 9 -
- Figura 2.** a) Detalle de la flor de habas. b) Semillas de los 4 tipos botánicos: *minor* (izquierda arriba), *major* (derecha arriba), *equina* (izquierda abajo) y *paucijuga* (derecha abajo)..... - 10 -
- Figura 3.** Producción del cultivo de habas en el mundo (FAOSTAT 2019).- 11 -
- Figura 4.** Serie histórica de la superficie cultivada y producción de las habas en España (FAOSTAT, 2019). - 12 -
- Figura 5.** Mapa consenso simplificado de ocho leguminosas. Figura basada en la publicación de Choi et al 2004a con modificaciones de Zhu et al 2005. Gm, *Glycine max*; Lj, *Lotus japonicus*; Mt, *Medicago truncatula*; Ms, *Medicago sativa*; Ps, *Pisum sativum*; Ca, *Cicer arietinum*; Vr, *Vigna radiata*; Pv, *Phaseolus vulgaris*. S y L indican el brazo corto y largo de los cromosomas de *M. truncatula*. Los bloques sinténicos se basan en la distancia genética. - 23 -

CAPÍTULO I

- Fig. 1** Chickpea pods after desiccation: completely open pods (a), and fissured pods (b)..... - 41 -
- Fig. 2** Frequency distribution of dehiscence trait in RIP-9 (ILC72xCr5-10). a) percentage of open pods in greenhouse, b) percentage of open pods in the field, c) percentage of fissured pods in greenhouse and d) percentage of fissured pods in the field. The phenotypic value (mean \pm SE) of parents is indicated by arrows..... - 44 -
- Fig. 3** Genetic (LG) and physical (Ca) maps for the regions associated with dehiscence in RIP-9 (ILC72 x Cr5-10). Genetic distances are given in cM and physical positions in Mbp. Candidate-gene markers are underlined and in bold. - 49 -

CAPÍTULO II

Figure 1. Schematic diagram of the genetic pathway in the dehiscence zone (DZ). Modified from Ballester and Ferrándiz 2017.- 73 -

Figure 2. Frequency distribution of dehiscence traits recorded in the Vf6 x Vf27 RIL population. a) Opened Pods (OP) in 2017/18 and 2018/19; b) Fissured Pods (FS) in 2017/18 and 2018/19; c) Dehiscent Pods (DP) in 2016/17, 2017/18, 2018/19 and 2019/20. The phenotypic values (mean \pm SE) of the parental lines are indicated by arrows.- 76 -

Figure 3. Linkage map and QTLs for dehiscence traits detected in the Vf6 x Vf27 RIL population. QTL locations are represented with bars (2-LOD interval) and boxes (1-LOD interval). Candidate gene markers are in red. Molecular markers used for map saturation by the Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) assay are in green. FS, Fissured pods; DPG, Dehiscent pods in the greenhouse; DPF; Dehiscent pods in the field.- 83 -

Figure 4. Histological study of pods in the parental faba bean lines VF6 (left) and Vf27 (right). (a) Cross-sections of the distal part ventral suture in Vf6 and Vf27 (d). Detail of the dehiscence zone in Vf6 (b) and Vf27 (e); red arrows indicate differences in the degree of lignification of the VS cell wall. Transverse section of the lateral side of the pod in Vf6 (c) and Vf27 (f). Bars, 0.1 mm (a, c, d, f); 0.05 mm (b, e). DZ, dehiscence zone; EP, epidermis; MS, mesocarp; VS, ventral sheath; VB, vascular bundle; EN, endocarp; LFL, lignified fiber layer.- 86 -

Figure 5. (a) Schematic representation of a pod transverse section. The blue line indicates lignin deposition. DZ, dehiscence zone. (b) Zones in pods where histological cuts were performed. - 100 -

CAPÍTULO III

Figure 1. Schematic model of the genetic pathway of flowering time control by the photoperiod. The central circle represents the circadian clock. Modified from Mouradov et al. 2002. - 123 -

Figure 2. Linkage map and QTLs for flowering time traits detected in the Vf6 x Vf27 RIL population. QTL locations are represented with bars (2-LOD interval) and boxes (1-LOD interval). Candidate gene markers included in the map are highlighted in red. DF1: days to first flower, DF50: days to 50% of flowering, FL: flowering length. No significant QTLs were identified with * - 130 -

CAPÍTULO IV

Figura 1. a) Porcentaje de vainas-flor y b) semillas-óvulo (eje y) para toda la población en las diferentes campañas agronómicas (año, eje x). Las evaluaciones dentro de jaulón se representan en rojo mientras que las de campo abierto se muestran en azul. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, la línea central es la mediana. - 161 -

Figura 2. Número de granos de polen por tamaño (diámetro) de partícula en Vf6 (izquierda) y Vf27 (derecha). - 164 -

Figura 3. Mapa de ligamiento y QTLs para los caracteres de autofertilidad identificados en la población RIL Vf6 x Vf27. La localización de los QTLs se representa con barras (intervalos 2-LOD) y cajas (intervalo 1-LOD). Negro: medidas de campo; verde: medidas de polen; azul: medidas morfológicas y rojo: medidas del estigma. LO/LF: longitud del ovario/longitud de la flor; LE/LF: longitud del estilo/longitud de la flor; LO: longitud del ovario; RATIO_TP: tamaño total/tamaño total; %PNORMAL: porcentaje de polen normal; TPTOTAL: tamaño medio de los granos de polen en el rango completo; NPAP: número de papilas; LESTIG: longitud del estigma; AESTIG: área del estigma; %VF14-15_R1J: porcentaje vainas-flor de la evaluación de campo repetición 1; LA/LF: longitud del ápice/longitud de la flor; LA: longitud del ápice; %VF14-15_R2J: porcentaje vainas-flor de la evaluación de campo repetición 2; LE: longitud del estilo; AEO: ángulo estigma-ovario; AEO/LF: ángulo estigma-ovario/longitud de la flor; PNORMAL: cantidad de polen de tamaño normal; %SO09-10_R1J: porcentaje semillas-óvulo de la evaluación en jaulón repetición 1; %SO12-13_R2C: porcentaje semillas-óvulo de la evaluación en campo repetición 1..... - 169 -

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Table 1 Phenotypic values (mean \pm SE) of dehiscence trait (open and fissured pods) for parents (ILC72 and Cr5-10) and RIP-9 (ILC72xCr5-10)..... - 45 -

Table 2 Genetic segregation, chi-square test and percentage of the phenotypic variation (R^2) explained by the dehiscence candidate-gene markers tested in the chickpea population RIP-9 (ILC72xCr5-10). Significant R^2 values are shown in bold. - 47 -

Table 3 Genomic regions associated with dehiscence (DH) and fissure (FS) in greenhouse (G) and field (F) experiments in RIP-9..... - 51 -

CAPÍTULO II

Table 1. Phenotypic values of completely opened pods (OP), fissured pods (FS) and dehiscent pods in greenhouse (DPG) or field (DPF) for the parental lines and the RIL population Vf6 x Vf27 in 2016/17, 2017/18, 2018/19 and 2019/20. Significant differences between parental lines ($p \leq 0.05$) are indicated by asterisks. - 77 -

Table 2. Correlations between the dehiscence traits scored. Significant correlations are indicated in bold. Asterisks: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ - 78 -

Table 3. Genetic segregation, chi-square test and location of the dehiscence related gene markers in faba bean (Vf) and related legume species: Mt, *Medicago truncatula*; Ps, *Pisum sativum*; Ca, *Cicer arietinum*. Grey cells indicate syntenic chromosomes (Chr) and linkage groups (LG). Absence of fit to the expected 1:1 segregation is indicated by an asterisk. - 80 -

Table 4. Trait name, peak position (cM), chromosome (Chr), flanking markers, LOD scores, additive effects and phenotypic variation explained (R^2) by the QTLs for dehiscence resistance detected in the Vf6 x Vf27 RIL population. - 82 -

- Table 5.** Area and perimeter of the sheath lignified layers in the parental lines, measured at the distal and proximal sides of the ventral and dorsal pod sutures. Lignified cells arranged as a single layer without left-right distinction are indicated by an asterisk.- 87 -
- Table 6.** Percentage of lignin cell occupation in the faba bean parental lines Vf6 and Vf27, measured in different pod zones. Significant differences according to ANOVA are indicated in bold ($P < 0.01$).- 87 -

CAPÍTULO III

- Table 1.** Phenotypic values (mean \pm SE) of days to first flower (DF1), days to 50% of flowering (DF50) and Flowering Length (FL) for parental and RILs from the cross Vf6 x Vf27 in each location and agronomic season. - 125 -
- Table 2.** Flowering time traits correlation values. All the correlations showed a significant *P-value* (<0.01). - 126 -
- Table 3.** Genetic segregation, chi-square test and location of the flowering time gene markers in faba bean (Vf) and related legume species: Ca, *Cicer arietinum*; Mt, *Medicago truncatula* and Ps, *Pisum sativum*). Grey cells highlight syntenic chromosomes (Chr) / and linkage groups (LGs). Lack of fit to the expected 1:1 segregation is indicated by an asterisk. - 128 -
- Table 4.** QTLs for flowering time traits identified in the Vf6 x Vf27 RIL population..... - 132 -

CAPÍTULO IV

- Tabla 1.** Media \pm Error estándar (SE) de flores por nudo, vainas por nudo, vainas-flor, óvulos por ovario, semillas por vaina y semillas-óvulo para cada campaña agronómica y ambiente. J: evaluación en jaulón; C: evaluación en campo abierto. - 160 -
- Tabla 2.** Resultados del análisis GLMM del efecto del ambiente y campaña (año) para vainas-flor (%VF) y semillas-óvulo (%SO). El modelo fue ajustado usando las repeticiones anidadas dentro del ambiente y año como factor aleatorio. Las estimaciones de los parámetros para el nivel de factores fijos se

calcularon utilizando "jaulón" como referencia para la condición variable y "2008_09" para la variable año..... - 162 -

Tabla 3. Media \pm error estándar (SE) para longitud (cm) de la flor (LF), longitud (cm) del ovario (LO), longitud (cm) del estilo (LE), longitud (cm) del ápice (LA), ángulo ($^{\circ}$) estilo-ovario (AEO) y sus estandarizaciones por longitud de flor para Vf6, Vf27 y la población RIL. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas parentales (** P < 0,01, *** P < 0,001)..... - 166 -

Tabla 4. Media \pm error estándar (SE) para la longitud (μm) del estigma (LESTIG), longitud (μm) de la ruptura (LRUPT), porcentaje de la ruptura (%RUPT), área (μm^2) del estigma (AESTIG), área (μm^2) de la ruptura (ARUPT), porcentaje del área de ruptura (%ARUPT), número de papilas (NPAP), longitud (μm) de la papila (LPAPL), ancho (μm) de la papila (APAP), ratio longitud/ancho de papila (LARATIO_PAP), número de papilas por longitud del estigma (NPAP/LESTIG), densidad de papilas (DPAP) (n $^{\circ}$ papilas/6 mm 2) y ángulo ($^{\circ}$) del estigma (ANG_ESTIG) para Vf6, Vf27 y la población RIL. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas parentales (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001)..... - 167 -

Tabla 5. Lista de QTLs significativos para la población Vf6 x Vf27. Blanco: medidas de campo; verde: medidas del polen; azul: medidas morfológicas; rojo: medidas del estigma..... - 172 -

ÍNDICE DE MATERIAL SUPLEMENTARIO

CAPÍTULO I

Online Resource 1 Markers used to set the linkage map in RIP-9 (ILC72xCr5-10).....	- 56 -
Online Resource 2 Protein identification.....	- 59 -
Online Resource 3 Dehiscence candidate genes in chickpea.	- 60 -
Online Resource 4 Primer sequences developed on chickpea dehiscence candidate genes, size of the products, restriction endonucleases used and type of marker.....	- 61 -
Online Resource 5 Agarose gel showing amplification of M-FUL, M-LATE and M-SEP1 in parental lines. M, molecular size marker $\Phi X174/HaeIII$ with molecular weight in base pair (bp) indicated on the left.	- 62 -
Online Resource 6 Agarose gel showing amplification and restriction cut of M-ALC (<i>DdeI</i>), AP2 (<i>DraI</i>), M-FUL and M-PDH1 (<i>AluI</i>) in parental lines (ILC72 and Cr5-10) and the set of cultivated genotypes. M, molecular size marker $\Phi X174/HaeIII$ with molecular weight in base pair (bp) indicated on the left.	- 63 -

CAPÍTULO II

Supplementary Table 1. ANOVA for Genotype (RIL) and Environment (Year) interaction. OP, opened pods; FS, fissured pods; DP, dehiscent pods. Signif. Codes: '***' $P < 0.001$, '**' $P < 0.01$ '*' $P < 0.05$	- 101 -
Supplementary Table 2. BLASTp results of dehiscence candidate genes against chickpea, <i>Medicago</i> and pea genomes.....	- 102 -
Supplementary Table 3. Primer sequences developed for the amplification of dehiscence candidate genes in faba bean, annealing temperature, product size, type of marker and restriction endonucleases or genotyping platform used.	- 103 -
Supplementary Table 4. BLASTp results of flanking markers.	- 104 -

Supplementary Figure 1. Histological analysis of transverse sections from faba bean pods. Distal zone, dorsal suture in Vf6 (a) and Vf27 (b); proximal zone, ventral suture of Vf6 (c) and Vf27 (d); and distal zone, dorsal suture of Vf6 (e) and Vf27 (f). DZ, dehiscence zone; EP, epidermis; MS, mesocarp; VS, ventral sheath; DS, dorsal sheath; VB, vascular bundle; EN, endocarp. - 105 -

Supplementary Figure 2. Histological transversal cuts from dehiscent faba bean pods. Proximal zone, ventral suture in line 1068 (a); distal zone, ventral suture in line 335 (b); distal zone, dorsal suture in line 756-3 (c). Bars: 0.1 mm. DZ, dehiscence zone; EP, epidermis; MS, mesocarp; VS, ventral sheath; DS, dorsal sheath; EN, endocarp, LFL, lignified fibre layer. - 108 -

Supplementary Table 5. Meteorological data for drying pod months. Rad, Radiation; ET, Evapotranspiration..... - 110 -

Supplementary Table 6. List of KASP markers genotyped in RIL population Vf6 x Vf27. M: monomorphic marker; P: polymorphic marker. - 111 -

CAPÍTULO III

Supplementary Table 1. ANOVA showing the effects of genotypes (RIL) and Environment interaction. DF1: days to first flower; DF50: Days to 50% of flowering; FL: flowering length. Df: degree of freedom; Mean SQ: mean squares; *** significant at $P < 0.001$ probability level, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$.. - 143 -

Supplementary Table 2. BLASTp results of flowering candidate genes against chickpea, *Medicago* and pea genomes..... - 144 -

Supplementary Table 3. Primer sequences developed for the amplification of flowering time candidate genes in faba bean, annealing temperature (Ta), product size, type of marker and restriction endonucleases or genotyping platform used. - 145 -

Supplementary Table 4. BLASTp hits in Arabidopsis obtained with the flanking kwon QTLs. - 146 -

Supplementary Table 5. Physical positions of FT genes in the *M. truncatula* genome..... - 146 -

CAPÍTULO IV

- Figura suplementaria 1.** Medidas morfológicas de la flor. Longitud del ovario (LO), longitud del estilo (LE), longitud del ápice (LA) y ángulo estilo-ovario (AEO). Barra: 1 mm. - 179 -
- Figura Suplementaria 2.** Medidas de la flor en el Microscopio Electrónico de Barrido. a) Longitud del estigma (LESTIG), longitud de la ruptura (LRUPT), área del estigma (AESTIG), área de la ruptura (ARUPT), longitud de la papila (LPAP), ancho de la papila (APAP). b) Densidad de papilas (DPAP, número de papilas en 6 mm²). c y d) Medida del ángulo del estigma (ANG_ESTIG). Barra: 200 µm. - 180 -
- Figura Suplementaria 3.** Porcentaje de polen viable en las líneas Vf27 y Vf6 en dos tamaños de flor. - 181 -
- Figura Suplementaria 4.** Muestras de polen de las líneas parentales a) Vf6 y b) Vf27 teñidas con carmín acético. Los granos de polen viables se tiñen de rojo oscuro mientras que los no viables se observan sin color. Barra: 50 µm. - 181 -
- Tabla Suplementaria 1.** Resultados del ANOVA de dos vías analizando el efecto de la línea parental y el tipo de polen (normal vs anormal). - 181 -
- Figura Suplementaria 5.** Tinción del estigma en las diferentes etapas del desarrollo con Peroxtesmo KO. Línea superior: Vf6; línea inferior: Vf27. Barra: 100 µm. - 182 -
- Tabla Suplementaria 2.** Posibles QTLs no significativos. Blanco: medidas de campo; verde: medidas del polen; azul: medidas morfológicas; rojo: medidas del estigma. - 183 -
- Tabla Suplementaria 3.** Resultados del BLASTp de los marcadores flanqueantes. - 184 -

RESUMEN

Las leguminosas desempeñan un papel central en la agricultura y contribuyen a una producción más sostenible al romper ciclos de enfermedades y plagas y reducir la dependencia de fertilizantes químicos, gracias a su capacidad única de fijar el nitrógeno atmosférico. Dentro de este grupo encontramos cultivos tradicionales como guisante, judía, lenteja, garbanzo y habas. Éstas últimas son la tercera y quinta leguminosa grano más cultivadas en el mundo, respectivamente. En la búsqueda de mejores características, el ser humano ha ido seleccionando plantas mediante la mejora convencional, un proceso largo y costoso. Actualmente el desarrollo de potentes herramientas genómicas permite buscar e identificar genes implicados en el control de caracteres de interés para su uso en mejora asistida por marcadores (en inglés, MAS). En los capítulos I y II se ha realizado un exhaustivo estudio fenotípico de la dehiscencia de la vaina en garbanzos y habas. Empleamos la estrategia de genes candidatos de especies modelo y leguminosas relacionadas para identificar ortólogos y saturar los mapas genéticos de ambas especies. Finalmente, los datos fenotípicos obtenidos se emplearon para realizar un análisis de QTLs que reveló la herencia poligénica o cuantitativa del carácter y su localización en los respectivos cromosomas. Ambos trabajos fueron pioneros, mostrando la conservación de genes entre distintas leguminosas y apuntando hacia mecanismos y rutas homólogas en el control de la dehiscencia. Los análisis histológicos evidenciaron una mayor complejidad en el patrón de lignificación de las vainas de habas. En el capítulo III, aplicamos la estrategia de genes candidatos para identificar QTLs y genes ortólogos reguladores de la fecha de floración en habas. Se trata de un carácter de gran interés ya que permite optimizar el rendimiento de un cultivo evitando la exposición a estreses. Se han detectado varios QTLs sinténicos con otras leguminosas, mostrando el alto grado de conservación de la ruta reguladora del carácter, siendo el más importante el

situado en el cromosoma V, donde se agrupan distintos genes implicados en la floración. Los resultados apuntan, además, a una posible regulación epigenética del carácter. Por último, en el capítulo IV, se ha realizado un meticuloso estudio de la genética del carácter autofertilidad, importante para el éxito reproductivo de un cultivo dado el descenso de polinizadores por el uso abusivo de insecticidas o la falta de sincronía en las visitas por el calentamiento global. Este carácter se define como la capacidad de las flores para autofecundarse en ausencia de polinizadores o de una perturbación mecánica. En nuestro estudio se ha diseccionado el carácter en diferentes características de la flor y el polen, asociados al cuajado de vainas y semillas. Los resultados mostraron diferencias en las medidas morfológicas y de cantidad de polen entre los parentales utilizados y una clara asociación de la cantidad de polen viable y el ángulo estilo-ovario con la autofertilidad. Del mismo modo, se encontró un gran número de QTLs co-localizando en seis regiones genómicas, las cuales se encuentran flanqueadas por genes funcionalmente relacionados con las medidas de cantidad de polen y cuajado de vainas y semillas.

SUMMARY

Legumes play a central role in agriculture and contribute to a more sustainable production by reducing dependence on chemical fertilizers, thanks to their unique ability to fix atmospheric nitrogen and breaking cycles of diseases and pests. Within this group we find traditional crops such as peas, beans, lentils, chickpeas and beans. The latter two are the third and fifth most cultivated grain legumes in the world. Looking for better characteristics, humans have been selecting plants through conventional improvement, a long and expensive process. Currently, the development of powerful genomic tools makes it possible to search for genes involved in the control of traits of interest and use them in marker-assisted improvement (MAS) approaches. Chapters I and II describe an exhaustive phenotypic study of pod dehiscence in chickpeas and faba bean. We used the candidate gene strategy from model and related legume species to identify orthologs and saturate the genetic maps in both crops. Finally, the phenotypic data obtained were used to perform a QTL analysis that revealed the polygenic or quantitative inheritance of the trait and the QTLs location on their respective chromosomes. These pioneering studies revealed the conservation of genes between different legumes and pointed towards homologous mechanisms and routes in the control of the dehiscence. The histological analysis showed a more complex pattern in the lignification of the faba bean pods similar to *Brassica* species and contrary to bean and soybean. In Chapter III, we apply the candidate gene strategy to identify QTLs and orthologous genes underlying flowering date in faba beans. It is a character of great interest since it allows optimizing the yield of a crop, avoiding the exposure to possible stresses. Several QTLs syntenic with other legume crops were detected, showing the high degree of conservation of the genetic regulatory pathway in this trait. The most important QTL was located on chromosome V, where different genes involved in flowering are grouped. The

results also point to a possible epigenetic regulation of the character. Finally, in chapter IV, a meticulous study of the genetics of self-fertility was carried out. Self-fertility is a key trait for the reproductive success of a crop given the decrease in pollinators for the abusive use of insecticides or the lack of synchrony with the insect visits due to global warming. This character is defined as the ability of flowers to self-pollinate in the absence of pollinators or mechanical disturbance. In our study, the character has been dissected into different flower and pollen characteristics associated with the set of pods and seeds. The results showed differences in the morphological and pollen quantity measurements between the parents and a clear association of the amount of viable pollen and the style-ovary angle with self-fertility. Similarly, a large number of QTLs were found co-locating in six genomic regions. All these QTLs were flanked by genes functionally related to measurements of pollen quantity and pod and seed set.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Aspectos generales de las leguminosas

Las leguminosas es el término general dado a las plantas pertenecientes a la familia Leguminosae o Fabaceae. Se trata de una de las familias más numerosas e importantes de las angiospermas, con más de 700 géneros y 20.000 especies. Esta familia incluye árboles, arbustos y plantas herbáceas perennes o anuales que son fácilmente reconocibles por su fruto en forma de vaina (Doyle y Luckow 2003; Lewis et al. 2005). Son plantas ampliamente utilizadas en agricultura, principalmente para la alimentación humana y animal, ya que son una fuente de proteínas altamente digeribles con numerosos efectos saludables. Presentan niveles de calcio comparables a los de los productos lácteos y otros compuestos, como los isoflavonoides, con efecto anticancerígeno. Se ha visto que su consumo previene enfermedades crónicas como la diabetes, la osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, reduciendo también la concentración de colesterol y la obesidad (Muzquiz et al. 2012). Además, se consideran cultivos mejoradores del terreno debido a su capacidad para la fijación de nitrógeno atmosférico mediante la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Esta capacidad fijadora proporciona a las leguminosas un papel importante en la rotación de cultivos (Graham y Vance 2003; Garg y Geetanjali 2007; Udvardi y Poole 2013).

Las legumbres son un tipo de leguminosas que se cosechan principalmente para obtener la semilla seca. Incluyen importantes cultivos como la soja (*Glycine max*), el guisante (*Pisum sativum*), la judía (*Phaseolus vulgaris*), el garbanzo (*Cicer arietinum*), la lenteja (*Lens culinaris*) o las habas (*Vicia faba*).

La producción mundial de legumbres en 2019 fue de 88 millones toneladas, con un área cosechada de 89 millones de hectáreas, siendo India el mayor productor (FAOSTAT 2019). A pesar de los beneficios nutricionales y ecológicos de las leguminosas, siguen siendo infrutilizadas en la comunidad agrícola europea. Desde la década de los 60 estos cultivos han sufrido un notable descenso debido a causas como las oscilaciones en la política de subvenciones de la Unión Europea,

los rendimientos inestables de algunos de estos cultivos y a que la importación de soja y maíz presentaban precios muy competitivos. De esta forma y pese a sus innumerables ventajas, la mecanización del campo, el empleo de fertilizantes de síntesis y el fenómeno de la globalización fueron condenando a estos cultivos al olvido.

La crisis de la soja y la subida de su precio a partir de 1976 puso al descubierto la debilidad del sistema y la necesidad de volver al cultivo de leguminosas tradicionales (Cubero y Moreno 1983). Actualmente existe una gran demanda europea de proteína vegetal, que se suple con importaciones principalmente de soja, cuyo efecto final es una dependencia de productos extranjeros para nuestra industria ganadera y finalmente, nuestra alimentación. Con el objetivo de revertir esta situación, la Política Agraria Comunitaria (PAC 2014-2020) introdujo instrumentos para paliar el retroceso de estos cultivos en toda Europa. Su objetivo ha sido fomentar la producción y productividad de las leguminosas mientras se realiza una protección del medio ambiente y una adaptación a la situación de cambio climático. La principal práctica en dicha política es la diversificación de cultivos, rotando un mínimo de tres veces la superficie dedicada al cultivo de cereales. Dicha medida, junto al elevado precio de los abonos nitrogenados, ha avivado el interés por la capacidad fertilizante de las leguminosas y está produciendo un cambio en la tendencia de la superficie de estos cultivos en Europa, aunque es menos perceptible en nuestro país (**Figura 1**).

España se encuentra actualmente en el puesto 32 de los países del mundo en cuanto a superficie cultivada (472 mil has) y en el 26 en producción (670 mil toneladas). Entre las leguminosas grano, el guisante es el que tiene mayor superficie cultivada en España, siendo el garbanzo el 4º y estando las habas en el 6º puesto. En cuanto a rendimiento, las habas ocupan el 2º lugar tras los guisantes, con una media de 3.511 kg/ha (MAPA 2019).

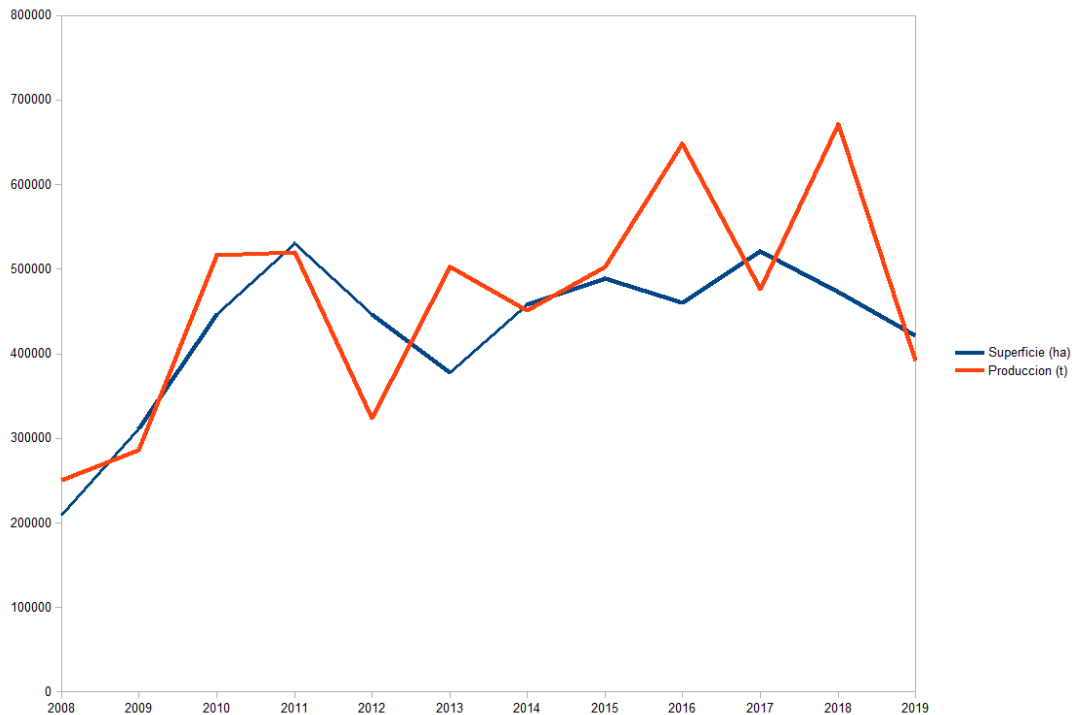


Figura 1. Datos de producción y superficie cultivada de leguminosas grano en España (MAPA 2019).

2. Las habas. Características e importancia económica

Las habas (*Vicia faba* L.) son plantas anuales, alógamas y diploides ($2n = 2x = 12$). Pertenecen a la familia *Fabaceae*, tribu *Vicieae*, género *Vicia*, especie *V. faba* (Cronquist 1981). Se las reconoce como una de las primeras plantas cultivadas que se domesticaron al inicio de la agricultura, aunque su origen no se conoce con exactitud, ya que su ancestro silvestre es desconocido y se cree extinto. Se defienden dos orígenes diferentes: en el Cercano Oriente (Cubero 1974) y Asia Central (Ladizinsky 1975), llegando al Mediterráneo y extendiéndose posteriormente por todo el mundo.

V. faba es una planta erecta, anual y glabra. Presenta una raíz primaria, fuerte y muy desarrollada de la que parten raíces secundarias y terciarias. Sobre éstas últimas es donde se producen los nódulos que realizarán la simbiosis con *Rhizobium leguminosarum* para la fijación de nitrógeno (Nutman 1976). Tiene hojas compuestas, alternas y sin zarcillos. Los folíolos presentan un borde recto o ligeramente ondulado de un color verde grisáceo, tiene estípulas dentadas con un

nectario y una mancha oscura. Las flores se presentan en inflorescencias de 1 a 12, la morfología de la flor presenta un pétalo grande denominado estandarte, dos pétalos más pequeños iguales (alas) de color blanco con una mancha negra purpúrea y una quilla donde se encuentran los estambres y el ovario junto al pistilo (**Figura 2a**). El fruto que se produce es una vaina de tipo carnososo, verde pardo con un número de semillas variable. Las semillas son ricas en proteínas, carbohidratos, fibras, vitaminas y minerales que las hace útiles para la alimentación animal (Dixon y Sumner 2003).

Se describen 4 tipos botánicos: *paucijuga*, *minor*, *equina* y *major* (Cubero 1974), siendo el tipo *paucijuga* el descrito como más primitivo y parecido al hipotético antecesor silvestre (**Figura 2b**). Cada uno de los tipos botánicos se originaron en diferentes zonas geográficas: *major* apareció en países Mediterráneos y China; *equina* en el este y norte de África y el tipo *minor* en el norte de Europa (Duc 1997).



Figura 2. a) Detalle de la flor de habas. b) Semillas de los 4 tipos botánicos: *minor* (izquierda arriba), *major* (derecha arriba), *equina* (izquierda abajo) y *paucijuga* (derecha abajo).

Vicia faba tiene 6 parejas de cromosomas, uno de gran tamaño y metacéntrico y 5 de menor tamaño y acrocéntricos. Su genoma es el mayor de entre las leguminosas (13000 Mbp) (Chooi 1971; Lawes y Bond 1983; Bennett 1995; Raina y Ogihara 1995), siendo 25 veces mayor que el de la especie modelo

Medicago truncatula (Flavell et al. 1974), lo que dificulta el uso de herramientas genómicas y la secuenciación de esta especie.

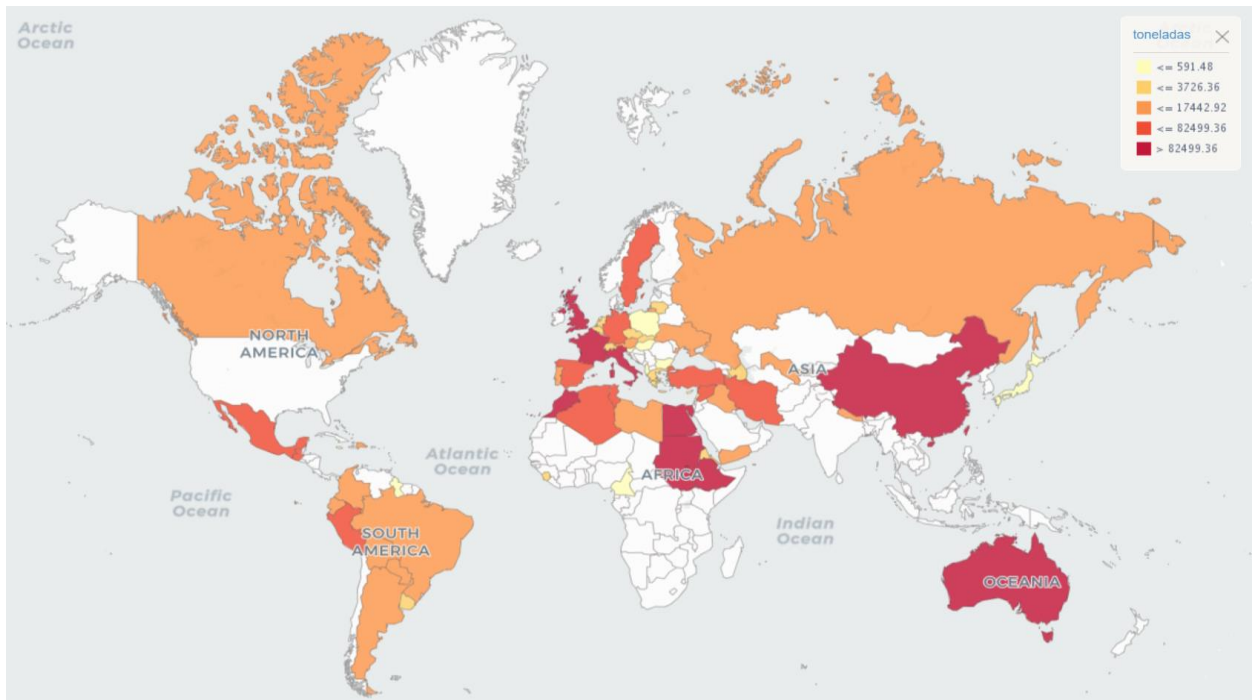


Figura 3. Producción del cultivo de habas en el mundo (FAOSTAT 2019).

Con más de 2,6 millones de hectáreas, las habas son la quinta leguminosa-grano cultivada en el mundo (FAOSTAT 2019). La producción mundial de habas supera los 5,4 millones de toneladas siendo China su principal productor (unas 1,7 millones de toneladas en 840.000 has), seguida de Etiopía, Reino Unido y Australia (FAOSTAT 2019). Por continentes, Europa es el segundo productor de habas después de Asia (1,8 y 1,6 millones de toneladas, respectivamente) (**Figura 3**).

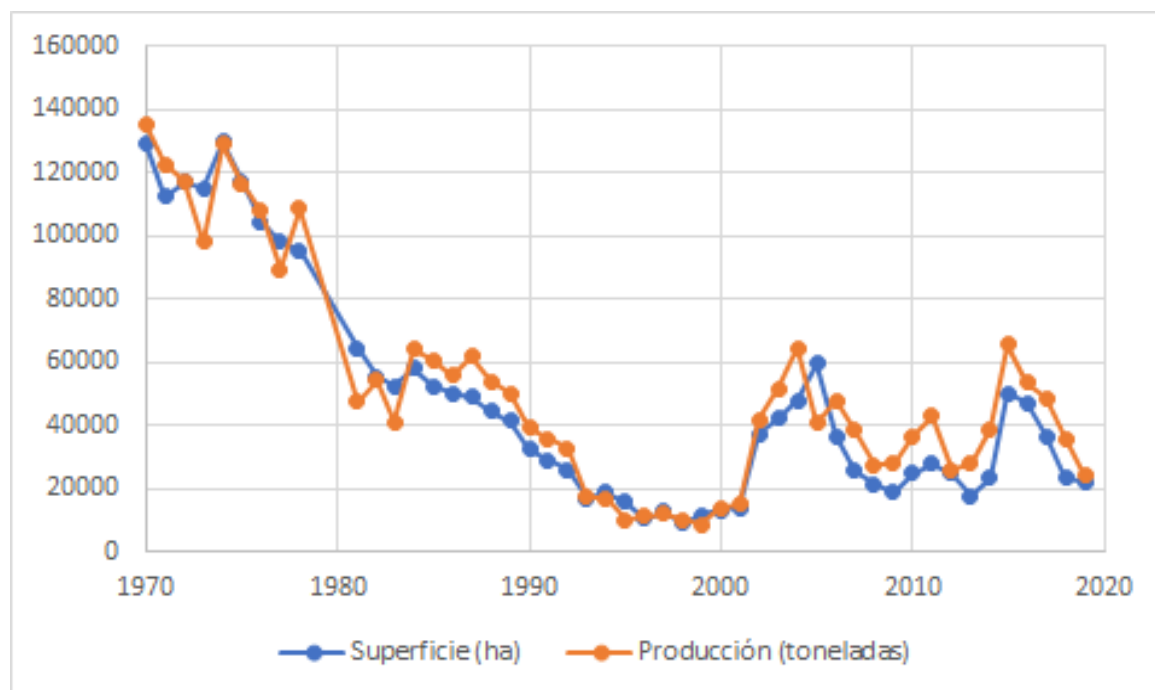


Figura 4. Serie histórica de la superficie cultivada y producción de las habas en España (FAOSTAT, 2019).

Las habas han estado muy presentes a lo largo de la historia y cultura agroalimentaria española. Sin embargo, en los últimos 50 años, el cultivo ha sufrido un claro declive con grandes oscilaciones y cierto repunte en las dos últimas décadas, motivadas por el aumento de la demanda y los incentivos de la política agraria europea (PAC) (**Figura 4**). Con una superficie de 22.065 has y una producción de unas 24.000 toneladas, España ocupa hoy el puesto 25 en el mundo y el 13 en Europa, siendo Andalucía con una producción de 12.911 t y 14.261 ha, la comunidad autónoma que más superficie le dedica a este cultivo (FAOSTAT 2019; MAPA 2019). Paradójicamente, nuestro país es el mayor consumidor de habas en Europa (98% destinado a pienso) y el sexto importador mundial. En 2019 España importó cerca de 30.000 t de habas, señalando el interés y la dependencia externa de este cultivo en nuestro país. Es indispensable revertir esta tendencia superando las principales limitaciones del cultivo.

Entre los principales factores que desencadenan esa tendencia bajista y que afectan a la estabilidad de su rendimiento se encuentran la susceptibilidad a

estreses abióticos como la sequía, las heladas y las altas temperaturas, y bióticos, principalmente el jopo (*Orobanche crenata*) y hongos patógenos como *Ascochyta fabae*, *Uromyces viciae-fabae* (roya) o *Botrytis fabae* (botritis o mancha chocolate).

3. Mejora de las habas

Desde el inicio de la agricultura el ser humano ha estado seleccionando plantas con características favorables para su uso, ya sean desde el punto de vista alimenticio (frutos más grandes, mejor sabor, mayor producción) o desde el punto de vista de optimización del cultivo (resistencias a enfermedades o a estreses abióticos, adaptación a diferentes ambientes, precocidad, etc.).

El proceso de selección a lo largo de los años, ha conducido a la domesticación de los cultivos. En el caso de las habas, se han originado variedades con unas características muy concretas, como son: porte más erecto, mayor densidad de hojas, mayor grosor del tallo y menor número de nudos. Además, se ha perdido la sensibilidad al fotoperiodo debido a la presión de selección en regiones diferentes a la original, así como la dormancia o latencia de la semilla; y en muchos casos se perdieron también ciertas resistencias a plagas y enfermedades. En resumen, la domesticación de *V. faba* llevó a cambios en el ciclo de vida de la planta, los patrones de distribución de ramas, flores por inflorescencia, longitud de la vaina y el tamaño y forma de las semillas (Susó y Cubero 1986).

Como ya se ha comentado anteriormente, el principal objetivo de la selección de los cultivos ha sido desde el punto de vista alimenticio, y las habas no son una excepción a esta norma. Los cuatro tipos botánicos descritos presentan unos usos bien diferenciados, siendo las variedades *major* las más usadas para el consumo humano debido a su gran calidad y tamaño de su semilla; los tipos *equina* y *minor* son principalmente usadas para la alimentación animal; mientras que el tipo paucijuga se usa en algunos países como India o Pakistán para el consumo humano (Cubero y Nadal 2005).

Además de esta selección, existen variedades que han quedado relegadas a zonas rurales, que se han perdido o incluso se desconocen. Estas variedades locales pueden presentar características que se han ido perdiendo durante el proceso de mejora y dado que se desconoce el antecesor del cultivo puede llegar a ser interesantes de integrar dentro de variedades comerciales para mejorar su rendimiento, resistencias a enfermedades u otras características del cultivo.

Muchas especies de leguminosas explotan el cruzamiento interespecífico con sus homólogas silvestres, permitiendo la introgresión de genes de resistencia u otras características de interés en el genoma de la especie cultivada. Esto ocurre en especies como el garbanzo (Singh et al. 2015) o la lenteja (Fratini et al. 2004), dónde hay trabajos que describen el éxito de estos cruzamientos. En habas se han intentado cruces con otras especies cercanas como *Vicia narbonensis* y *Vicia ervilia*, entre otras, sin resultado alguno (Cubero 1982, Pickersgill et al. 1983; Cubero 1984; Ramsay et al. 1984). Este inconveniente junto con la falta de antecesor silvestre dificulta la mejora del cultivo, ya que solo se pueden recombinar genotipos existentes con características de interés.

Además de los trabajos de mejora en los que su objetivo es la obtención de variedades resistentes a enfermedades, sequía o la eliminación de factores antinutritivos, existen otras problemáticas en el cultivo difíciles de manejar debido a la complejidad de estos caracteres (efecto ambiental y control multigénico) como son la dehiscencia de la vaina, la fecha de floración y la autofertilidad.

La dehiscencia es el proceso de apertura espontánea de la vaina para dejar salir las semillas. En muchas leguminosas, como el garbanzo, la dehiscencia no supone un grave problema en pérdidas, ya que durante la domesticación del cultivo se ha ido perdiendo el carácter y las variedades cultivadas actuales no son dehiscentes; pero en habas, las pérdidas por dehiscencia pueden llegar a ser del 30% (GrowerNotes 2018), llegando en otros cultivos como la veza (*Vicia sativa* L.) o la soja (*Glycine max* L.) a más del 50% (Sattel et al. 1998; Bhor et al. 2014; Dong y Wang 2015).

La apertura de la vaina está regulada tanto por factores ambientales como genéticos, los primeros tienen que ver con la humedad relativa ambiental y con variaciones en la temperatura, mientras que los factores genéticos son los que determinan las características de las paredes celulares de los tejidos de la vaina que finalmente van a verse influenciadas por los factores ambientales. Éste carácter ha sido ampliamente estudiado en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, permitiendo que se conozca la ruta general por la que se produce la deposición de lignina (uno de los componentes de la pared celular) en la zona de sutura de las valvas (de aquí en adelante, zona de dehiscencia o DZ) y las enzimas y factores de transcripción implicados en la propia separación de las valvas de la vaina (Ballester y Ferrándiz 2017). Dentro de leguminosas, se han realizado estudios en especies como soja, judía (*Phaseolus vulgaris* L., *Vigna unguiculata* L. y *Vigna angularis* L.), guisante (*Pisum sativum* L.), lenteja (*Lens culinaris* Medikus) y lupino (*Lupinus angustifolius* L.). Todos estos trabajos han tenido diferentes enfoques, llegando en algunos casos a identificar un gen candidato (*PDH1* en soja) o establecer relación entre la dehiscencia con características de la vaina como el contenido de fibras y otros componentes de la pared celular. Los resultados de esta tesis han sido una primera aproximación del estudio de la dehiscencia de la vaina en los cultivos de garbanzo y habas.

La fecha de floración determina el que la planta se exponga más o menos a factores abióticos, como el frío y las altas temperaturas, que reducen drásticamente el desarrollo y cuajado de la flor o el llenado de las semillas, respectivamente (Smith 1982). Por ello, este carácter es uno de los más importantes cuando se trata de obtener variedades adaptadas a condiciones locales. La floración temprana es de particular importancia en el contexto del actual cambio climático, ya que la sequía y el calor son las condiciones más perjudiciales durante la floración. Particularmente en la región mediterránea, los genotipos de floración temprana

minimizan la exposición a estreses hídricos y pueden contribuir al desarrollo de nuevas variedades, mejor adaptadas.

El conocimiento sobre la regulación de la floración es muy extenso, gracias al estudio de la planta modelo *A. thaliana* y de otros cultivos como trigo (Kamran et al. 2014) y arroz (Lee y An 2015), pero en leguminosas solo se ha estudiado en profundidad en especies como guisante y soja (Weller et al. 2009). La gran cantidad de genes implicados descritos en *A. thaliana* se han buscado en leguminosas, obteniéndose casos de duplicaciones (p.e. *CRY2*) o por el contrario pérdidas de genes (p.e. *PHYC*), pero manteniéndose la coincidencia de un gran número de genes, indicando que la regulación de la floración se encuentra muy conservada entre especies.

Uno de los principales estímulos externos que afectan al inicio de la floración es el fotoperiodo, que junto con una gran cantidad de señales internas regulan el reloj circadiano, responsable de la regulación de los genes de activación de la floración. Entre los genes más importantes de floración está *FLOWERING LOCUS T (FT)*, muy conservado en especies modelo de leguminosas como *M. truncatula*. La explotación de la sintenia ha permitido también identificar QTLs (Quantitative Trait Locus) de floración conservados (Fratini et al. 2007; Aryamanesh et al. 2010; Cruz-Izquierdo et al. 2012; Kahríman et al. 2015; Daba et al. 2016; Mallikarjuna et al. 2017; Kumar et al. 2018). La disponibilidad de más genomas secuenciados en leguminosas y de mapas genéticos cada vez más saturados está acelerando la traslación de conocimientos entre cultivos. Parece razonable esperar que en los próximos 5 a 10 años se puedan identificar los genes que controlan los principales loci de floración en leguminosas, lo que ayudará a mejorar nuestra comprensión de cómo funcionan conjuntamente para proporcionar adaptación de los cultivos a distintos ambientes y condiciones agronómicas.

Además de la dehiscencia y la fecha de floración, parte de la inestabilidad o pérdida de rendimiento se debe a la alogamia parcial del cultivo, variando entre polinización cruzada y autopolinización (Stoddard y Bond 1987). En ambos casos, las flores pueden requerir la visita de un polinizador para conseguir la fructificación. El proceso por el cual se produce la autofecundación en ausencia de polinizadores o de cualquier otra perturbación mecánica es conocido como autofertilidad (Drayner 1959). La selección hacia la autofertilidad o hacia la polinización cruzada favorece la producción de vainas y semillas en ausencia de polinizadores (Adcock y Lawes 1976; Kambal et al. 1976; Torres et al. 1993b) o estabiliza la producción y la resistencia a estreses (Link et al. 1994, 1996; Abdelmula et al. 1999; Gasim y Link 2007; Maalouf et al. 2008; Bartomeus et al. 2014), respectivamente. Esta selección también afecta a diferentes caracteres florales, principalmente a la estructura del gineceo y a la cantidad de polen.

Estudios previos han identificado en líneas autofértiles un ángulo estilo-ovario más amplio, con estilo y pelos del estigma más cortos (Kambal et al. 1976); menor número de papilas estigmáticas en el extremo del estigma (Lord y Heslop-Harrison 1984); y presencia de exudado tras la rotura de la cutícula estigmática (Chen 2009). Esta autofertilidad se interpreta como una adaptación de las plantas a situaciones adversas, pero ello conlleva algunos inconvenientes como la reducción de la variabilidad genética. Por ello, durante la evolución han aparecido varios mecanismos que evitan la autofecundación, como son la separación espacial del estigma y anteras (hercogamia), diferencias en los tiempos de maduración/receptividad (dicogamia), y sistemas o mecanismos genéticos de autoincompatibilidad que van a discriminar entre el polen propio y el ajeno (Webb y Lloyd 1986). Dentro del grupo Fabaceae encontramos gran cantidad de especies autoincompatibles, pero en el caso concreto de *V. faba* podemos encontrar líneas claramente autofértiles, en las que parece no existir mecanismos de autoincompatibilidad.

4. Empleo de herramientas genómicas en la mejora de habas

Como ya se ha mencionado, desde el inicio de la agricultura el hombre ha ido seleccionando las mejores plantas dentro de una población (selección masal). Solo a partir del s. XIX se aplican técnicas de cruzamiento, entre variedades o plantas con caracteres opuestos y análisis de híbridos prometedores que dieron lugar a programas de mejora más controlados. Sin embargo, dicho proceso conlleva un coste elevado de tiempo (superando incluso los 10 años). Los caracteres agronómicos de interés son de tipo cuantitativo, implicando varios genes y, además, están fuertemente influenciados por el ambiente por lo que, en muchos casos, la evaluación y la posterior selección aportan una medida imperfecta del potencial genético de la planta. Todo ello añade un mayor nivel de complejidad a la selección clásica.

El desarrollo de herramientas genómicas en los años 90 permitió la identificación de zonas de interés o QTLs asociadas a los caracteres que se quieren seleccionar (Collard et al. 2005). El uso de marcadores moleculares ligados a dichos caracteres permite eliminar el efecto ambiental, siendo posible la selección de los mejores genotipos aunque se trate de caracteres de herencia compleja (Collard y Mackill 2008; Xu y Crouch 2008).

De esta forma se acuñó el término mejora asistida por marcadores o MAS (acrónimo de Marker Assisted Selection), una técnica en la que la selección fenotípica se hace en base al genotipo del marcador asociado al carácter de interés. El mejorador emplea la MAS para identificar los alelos dominantes o recesivos más adecuados en una generación y para identificar los individuos más favorables en una progenie segregante. La MAS aporta una serie de ventajas a la mejora convencional ya que puede ser más eficiente, eficaz y fiable que la selección fenotípica al eliminar el efecto ambiental y permitir la selección simultánea de varios caracteres (cualitativos y/o cuantitativos) (Francia et al. 2005). Aunque las ventajas de la MAS son más que evidentes, es necesario que el marcador empleado

tenga unas características concretas para que su uso sea efectivo: idealmente debe ser codominante, permitiendo distinguir todos los genotipos posibles (homocigotos y heterocigotos), estable en distintos fondos genéticos y 100% eficiente. Si el marcador cumple estas características entonces se habla de un marcador diagnóstico o marcador funcional ya que está directamente ligado al gen de interés (Hospital 2009). Esta relación se establece cuando no existe recombinación entre el marcador y el gen que controla el carácter, evitando errores en la selección.

Se han utilizado una gran variedad de marcadores en la MAS (Collard y Mackill 2008): RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSRs (Simple Sequence Repeats), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions), CAPs (Cleaned Amplified Polymorphic Sequences), STSs (Sequence-Tagged Sites), ESTs (Expressed Sequence Tags), SSCPs (Single-Strand Conformation Polymorphism) y SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Los SNPs son los marcadores que más se han desarrollado en los últimos años, gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva (NGS, Next-Generation Sequencing) y la creación de diversas plataformas (Affymetrix, Illumina Agilent, Sequenom, entre otras) que permiten el genotipado de una gran cantidad de SNP en un gran número de muestras de forma simultánea.

En habas, los principales marcadores empleados en los primeros trabajos de genotipado y mapeo fueron los RAPDs (Welsh y McClelland 1990; Williams et al. 1990) que permitieron identificar genes y QTLs de interés agronómico en la especie (Torres et al. 2010). Estos marcadores aleatorios repartidos por el genoma suponían la única herramienta disponible en el cultivo debido al poco conocimiento a nivel genómico del mismo. Posteriormente, el empleo de la sintenia con especies relacionadas, mejor estudiadas, permitió publicar el primer mapa con marcadores ESTs (Ellwood et al. 2008), seguido a continuación por mapas saturados con

marcadores genéticos como los SNPs (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Satovic et al. 2013; Duc et al. 2015; Webb et al. 2016).

Herramientas genómicas actuales como el genotipado masivo o la secuenciación de genomas están permitiendo el análisis a gran escala de información para la obtención de marcadores diagnóstico o la identificación de genes candidatos. El primer genoma vegetal secuenciado fue el de *A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative 2000), sirviendo de modelo para muchas otras especies, incluyendo las del grupo de leguminosas. Hasta el año 2008 no se presentó el primer genoma de una leguminosa, *Lotus japonicus* (Sato et al. 2008), seguido por otras en los años siguientes: *Glycine max* (Schmutz et al. 2010), *Medicago truncatula* (Young et al. 2011), *Cajanus cajan* (Varshney et al. 2011), *Cicer arietinum* (Varshney et al. 2013), *Phaseolus vulgaris* (Schmutz et al. 2014), y más recientemente, *Pisum sativum* (Kreplak et al. 2019). La posibilidad de acceder a la información del genoma supone una revolución para la mejora de los cultivos, incluso en cultivos cercanos en los que la secuenciación del genoma presenta grandes impedimentos como es el caso de las habas.

Con el objetivo de conseguir dilucidar los mecanismos implicados en procesos de interés biológico, así como los genes que los regulan, la genómica se divide en tres grandes grupos de estudio: estructural, comparativa y funcional. La primera se basa en la utilización de mapas genéticos cada vez más saturados; la genómica comparativa hace uso de la información presente en otros cultivos para identificar por sintenia genes candidatos; y la genómica funcional estudia los patrones de expresión de genes y la secuenciación de tejidos en diferentes condiciones.

4.1. Mapas genéticos

Los mapas genéticos o de ligamiento reúnen la información genética de genes o marcadores y los posicionan según la distancia entre loci que se basa en

el cálculo de frecuencias de recombinación de los mismos. Si dos marcadores presentan una frecuencia de 0.5, dichos genes no se encuentran ligados, es decir, se consideran genes independientes.

Estos mapas han sido utilizados en habas para la búsqueda de QTLs asociados a caracteres de interés agronómico como caracteres de rendimiento y arquitectura de la planta (Khazaei et al. 2014; Sallam y Martsch 2015; Sallam et al. 2016; Ávila et al. 2017); el peso de la semilla (Vaz Patto et al. 1999); la resistencia a jopo (Román et al. 2002; Díaz-Ruiz et al. 2010; Gutiérrez et al. 2013) y a hongos patógenos (Ávila et al. 2003; Román et al. 2003; Ávila et al. 2004; Díaz-Ruiz et al. 2009; Kaur et al. 2014; Atienza et al. 2016); la fecha de floración y diversos caracteres reproductivos (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Lavana et al. 2015); además del contenido de diferentes compuestos de interés (Khazaei et al. 2015). Los mapas desarrollados en distintas poblaciones se emplearon para crear los primeros mapas consenso (Satovic et al. 2013), donde se agrupan un mayor número de marcadores comunes polimórficos permitiendo aumentar la saturación de regiones de interés. Posteriormente se desarrollaron mapas más densos con marcadores SNPs utilizando seis poblaciones biparentales y mapeando genes derivados de la especie modelo *M. truncatula* (Webb et al. 2016). Estos mapas se han convertido en una herramienta para establecer relaciones de sintenia entre distintas especies de leguminosas.

La explotación de los mapas genéticos se encuentra en la dificultad de saturar regiones diana y en el posterior diseño de marcadores moleculares asociados a genes y QTLs responsables de caracteres de interés.

4.2. Genómica comparada y sintenia

La genómica comparada hace uso de la conservación de genomas en la evolución, ya que existen relaciones estructurales y funcionales entre especies modelo y especies relacionadas (Weeden et al. 1992; Menancio-Hautea et al. 1993). Esto alude al concepto de sintenia, que es definida como la colinearidad y

conservación del contenido en genes, orden y orientación de los mismos entre cromosomas de diferentes especies o cromosomas no homólogos de la misma especie.

En leguminosas se ha observado esta sintenia y ha sido utilizada ampliamente (Choi et al. 2004b; Kaló et al. 2004; Zhu et al. 2005; Ellwood et al. 2008). Concretamente, en habas, la sintenia se produce entre especies cercanas como *M. truncatula*, *L. culinaris* y *P. sativum*. Todas ellas presentan genomas más pequeños que el de habas que se han secuenciado y han sido y son objeto de estudio para multitud de caracteres. Choi y colaboradores realizaron el primer estudio de macrosintenia entre distintas especies de leguminosas (Choi et al. 2004a,b), permitiendo establecer relaciones entre la especie modelo *M. truncatula* y varias especies cercanas. En este modelo se establece que las relaciones de sintenia son mayores cuanto más cercanas están las especies filogenéticamente. Posteriormente, Zhu et al. (2005) ampliaron el número de especies estudiadas y modificaron el mapa consenso existente (**Figura 5**).

A pesar de las diferencias entre el tamaño de los genomas, el uso de la sintenia ha permitido mapear genes conservados y ayudado a saturar regiones genómicas portadoras de caracteres agronómicos en otras especies relacionadas no secuenciadas (como las habas), mostrando un considerable grado de conservación.

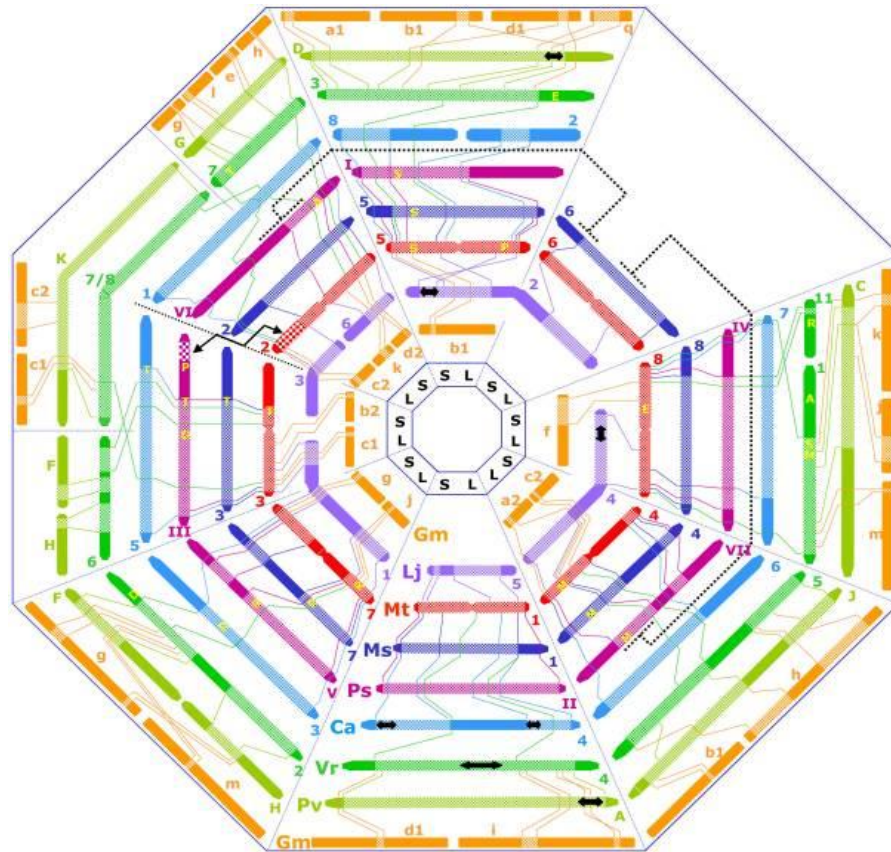


Figura 5. Mapa consenso simplificado de ocho leguminosas. Figura basada en la publicación de Choi et al 2004a con modificaciones de Zhu et al 2005. Gm, *Glycine max*; Lj, *Lotus japonicus*; Mt, *Medicago truncatula*; Ms, *Medicago sativa*; Ps, *Pisum sativum*; Ca, *Cicer arietinum*; Vr, *Vigna radiata*; Pv, *Phaseolus vulgaris*. S y L indican el brazo corto y largo de los cromosomas de *M. truncatula*. Los bloques sinténicos se basan en la distancia genética.

El primer mapa basado en secuencias génicas que permitió observar el patrón global de sintenia entre habas y *Medicago* fue el de Ellwood et al. (2008). Aunque el número de marcadores (127) fue relativamente modesto, el estudio reveló una clara imagen de macrosintenia. Otros autores (Cruz-Izquierdo et al. 2012; El-Rodeny et al. 2014; Kaur et al. 2014) elaboraron posteriormente, nuevos mapas con una mayor densidad, pero la imagen más completa de la sintenia existente entre ambas especies fue publicada por Webb et al. (2016). Los 653 marcadores SNP fueron diseñados en genes recíprocos de copia única. Además, cada grupo de ligamiento de *Medicago* correspondía a un cromosoma físico completo de habas, lo que permitió alinear por primera vez los seis cromosomas de habas con la

secuencia de *Medicago* sin falsas interrupciones en el patrón de macrosintenia. En habas existen algunos ejemplos de explotación de la sintenia entre especies modelo y cultivos como el marcador TFL1 para el crecimiento determinado (Ávila et al. 2006, 2007). Ávila et al. (2007) demostraron la hipótesis de que un ortólogo del gen *TFL1* controla el crecimiento determinado en habas como lo hace en *Arabidopsis*, soja y otras especies. Analizando un panel de individuos con crecimiento determinado e indeterminado mostraron la correlación del crecimiento determinado con una sustitución diagnóstica no sinónima en un residuo conservado de la región codificante. La clara colinealidad de dicha región en habas con la que alberga MtTFL1 en *Medicago* sugiere que la secuencia VfTFL1 publicada, se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 de habas (Webb et al. 2016). Otros ejemplos ilustrativos son los aportados por los marcadores TTG1 y TT8 responsables del control del contenido de taninos en habas (Webb et al. 2016; Gutierrez y Torres 2019; Gutierrez et al. 2020). Una vez mapeado un carácter en un intervalo que alinea con un segmento o gen secuenciado en la especie modelo, el conocimiento de la función genética en dicha especie se puede trasladar al cultivo. Así, el gen *zt1*, que controla el color de la flor y el contenido en taninos en la cubierta de la semilla de habas, mapea en un intervalo del cromosoma 3 de *Medicago*. La lectura de las anotaciones en dicho intervalo en *Medicago* reveló un candidato biológico lógico, el factor de transcripción *WD40 Transparent Testa Glabra 1 (TTG1)*, que determina el color de la flor en *M. truncatula*. El descubrimiento de una delección en la secuencia de alelos recesivos explica de manera plausible el fenotipo *zt1* de flor blanca (Webb et al. 2016; Gutierrez y Torres 2019). De modo similar, se identificó al factor de transcripción *bHLH (VTT8)* como el responsable del fenotipo *zt2*, el segundo locus que determina la flor blanca y la ausencia de taninos en dicho cultivo (Gutierrez et al. 2020).

En dichos casos, se han empleado herramientas de genómica comparada y sintenia y explotado el conocimiento de la función génica en especies modelo para conseguir una aproximación a la zona de interés y posteriormente utilizar técnicas

genómicas clásicas (como el paseo cromosómico) para desarrollar el marcador diagnóstico deseado.

4.3. Genómica funcional

La genómica funcional se encarga del estudio del funcionamiento del genoma en su conjunto, a través de la expresión de genes en diferentes situaciones. De esta forma se puede obtener una foto fija de qué genes se encuentran expresándose en las condiciones de estudio o en un tejido concreto.

Gracias a los nuevos avances en la secuenciación (next generation sequencing o NGS) la genómica funcional ha sufrido un salto cualitativo en cuanto a su uso en investigación y en concreto, en la mejora vegetal. La posibilidad de obtener secuencias de ADN mediante genómica funcional ha permitido un avance en el desarrollo de marcadores moleculares, análisis de QTLs y la identificación de genes candidatos, sobre todo en especies sin genoma de referencia (Varshney y Dubey 2009).

Debido al tamaño del genoma de habas, el desarrollo de herramientas de genómica funcional se ha centrado principalmente en realizar estudios de expresión en distintos tejidos y en condiciones concretas. Se han generado distintas librerías de cDNA o transcriptomas (Suresh et al. 2013; Ocaña et al. 2015; Ray et al. 2015; Webb et al. 2016). Estas librerías han servido de base de datos para identificar genes candidatos en regiones de interés y conocer su secuencia, sin dejar de lado el avance que han supuesto para el desarrollo de nuevos marcadores SNPs localizados directamente sobre genes y que permiten aumentar la densidad de marcadores en regiones de interés. Uno de los transcriptomas más utilizados en esta tesis para la búsqueda de secuencias en habas es el publicado por Ocaña et al. (2015), donde se comparó el transcriptoma de dos líneas (29H y Vf136) bajo la infección de *A. fabae*. Se obtuvieron alrededor de 39.000 transcritos que fueron

funcionalmente anotados y relacionados en su mayoría con secuencias de genomas de *A. thaliana*, *M. truncatula* y *C. arietinum*.

Actualmente, estas librerías de cDNA están sirviendo de base en una iniciativa internacional para la creación un chip de Affymetrix para el genotipado masivo y posterior saturación de mapas genéticos en habas.

5. Evaluaciones fenotípicas

Para abordar los objetivos de esta tesis se han utilizado varias técnicas de laboratorio como son búsqueda de genes candidatos, análisis bioinformáticos y posteriormente, PCR y electroforesis. Además, cabe destacar las evaluaciones fenotípicas realizadas para obtener los datos necesarios para el análisis de QTLs, como la evaluación de dehiscencia y las de autofertilidad.

5.1. Evaluación dehiscencia

Como ya se ha definido previamente, la dehiscencia de la vaina hace referencia a la apertura de la misma. La evaluación se realizó en dos cultivos distintos, garbanzos y habas, pero el procedimiento seguido fue el mismo en ambos.

Las poblaciones segregantes utilizadas para evaluar este carácter fueron sembradas en varios años. El primer protocolo aplicado es el descrito por Weeden et al. (2002), donde las vainas maduras de cada planta se recogieron y secaron en una estufa. Posteriormente se anotó el porcentaje de vainas abiertas con respecto al total de las vainas. Tras esta primera evaluación en ambas especies se observó un "carácter intermedio" entre la vaina cerrada y abierta, al que denominamos hendidura. Se planteó la posibilidad de que este carácter fuese un paso previo a la apertura total de la vaina ya que se observaron individuos con la mayoría de las vainas cerradas, pero con alta presencia de vainas con hendidura.

Para comprobar esta hipótesis se volvieron a evaluar las poblaciones, esta vez en campo y dejando las plantas hasta fin de ciclo, donde se evaluaron las vainas abiertas y las vainas con hendidura con respecto al total de vainas y el total de vainas cerradas, respectivamente. Los resultados de estas evaluaciones se presentan en el capítulo I (garbanzo) y capítulo II (habas).

5.2. Evaluaciones autofertilidad

El carácter autofertilidad se encuentra influenciado por una gran cantidad de factores, tanto ambientales (humedad, temperatura) como propios de la planta (cantidad y viabilidad del polen, estructura floral, receptividad del estigma) (Kambal et al. 1976; Lord y Heslop-Harrison 1984; Chen 2009). Debido a esta complejidad, la correcta evaluación de este carácter resulta difícil, siendo necesaria la disección del mismo en diferentes niveles o subcaracteres. La evaluación se realizó analizando caracteres florales que podrían afectar a la autofertilidad, como son: el ángulo del estigma-ovario; la longitud del ovario, del estilo y del estigma; la cantidad de polen y la fisiología del estigma. Para la evaluación de todos estos caracteres se utilizaron técnicas de microscopía óptica y electrónica. Todas las evaluaciones llevadas a cabo y sus resultados se presentan en el capítulo IV de esta tesis.

OBJETIVOS

Por todo lo expuesto anteriormente, los objetivos de esta tesis son los siguientes:

- Identificación y mapeo de genes candidatos de la ruta general de dehiscencia en garbanzo y habas, y análisis de su posible relación con la dehiscencia de la vaina (Capítulos I y II)
- Identificación y mapeo de genes candidatos relacionados con la fecha de floración en habas (Capítulo III)
- Estudio y mapeo de caracteres relacionados con la autofertilidad en habas (Capítulo IV)

CAPÍTULO I

Análisis genéticos revelan a *PDH1* como un gen candidato para el control de la dehiscencia de la vaina en garbanzo

Publicado como:

Aguilar-Benitez, D., Rubio, J., Millán, T. et al. Genetic analysis reveals *PDH1* as a candidate gene for control of pod dehiscence in chickpea. *Mol Breeding* 40, 40 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01117-9>

Resumen

La dehiscencia de la vaina es un carácter clave en leguminosas debido a su relevancia en la dispersión de semillas y en la reducción del rendimiento. A pesar de que la red transcripcional que controla la dehiscencia ha sido muy estudiada en cereales y plantas modelo, como *Arabidopsis*, el conocimiento del control molecular del carácter en leguminosas es bastante limitado. En garbanzo (*Cicer arietinum* L.), la identificación de genes responsables del control de la dehiscencia es muy importante cuando se usan genotipos silvestres para introgresar caracteres en genotipos cultivados. En este estudio, hemos caracterizado fenotípicamente una población de líneas recombinantes (RIL) procedente de un cruce interespecífico y hemos usado la aproximación de genes candidatos para identificar ortólogos de genes relacionados con la dehiscencia. El patrón de segregación en la población RIL sugiere que el carácter se encuentra bajo un control oligogénico. A través del mapeo y secuenciación genómica hemos desarrollado marcadores genéticos que han señalado al gen *PDH1* como un importante regulador en la dehiscencia de la vaina en garbanzo. Nuestros resultados pueden ayudar a explotar germoplasma silvestre en los programas de mejora de garbanzo y aclarar las relaciones entre las variaciones moleculares y fenotípicas en esta importante leguminosa.

Abstract

Pod dehiscence is a key trait in legumes due to its relevance for seed dispersal, and yield losses. Although transcriptional networks controlling dehiscence have been well explored in cereal crops and models, such as *Arabidopsis*, our knowledge on molecular control of the trait in legumes is relatively limited. In chickpea (*Cicer arietinum* L.), the identification of major and minor genes controlling pod dehiscence is very important when wild genotypes are used to introgress germplasm in cultivated ones. In this study, we characterized phenotypically a recombinant inbred line (RIL) population from an interspecific cross and used a candidate gene approach to identify orthologous to dehiscence-related genes. The segregation pattern in the RIL population suggests that the trait is under oligogenic control. Through genome mapping and sequencing we developed DNA markers and identified the *PDH1* gene as an important regulator of pod shattering in chickpea. Our results may help the exploitation of wild germplasm resources in chickpea breeding programs, and shed light on the relationships between the molecular and phenotypic variations in this important legume species.

CAPÍTULO II

Primera aproximación a la dehiscencia de la vaina en habas: Análisis genéticos e histológicos

Publicado como:

Aguilar-Benitez, D., Casimiro-Soriguer, I. and Torres, A.M. First approach to pod dehiscence in faba bean: genetic and histological analyses. *Sci Rep* 10, 17678 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74750-1>

Resumen

La dehiscencia de la vaina provoca importantes pérdidas en el rendimiento de cultivos y por lo tanto es un carácter clave seleccionado en contra durante la domesticación de los cultivos. A pesar del creciente conocimiento de las bases genéticas de la dehiscencia en diferentes cultivos, no hay demasiada información en habas. Aquí hemos llevado a cabo un estudio pionero de este carácter en habas, combinando mapeo genético, genómica comparativa, análisis de QTL y análisis histológico de vainas maduras. Los genes relacionados con la dehiscencia identificados en otras especies y mapeados en haba revelaron la conservación de bloques sinténicos entre diferentes leguminosas. Identificamos tres QTLs en los cromosomas II, IV y VI de habas, aunque ninguno de ellos fue estable entre años. Los análisis histológicos apoyan la convergencia en la evolución del fenotipo descrito en cereales y especies leguminosas relacionadas, pero también revelan una mayor complejidad en habas. Al contrario que en judía y soja, la zona de dehiscencia de habas presenta una equivalencia funcional a la descrita en crucíferas. La capa de fibras con pared celular lignificada ausente en la línea paucijuga primitiva Vf27 o menos lignificada y vacuolada en otras variedades dehiscentes, parece ser la fuerza más importante que desencadena la dehiscencia de la vaina en esta especie. Nuestros resultados proporcionan una nueva perspectiva de los mecanismos implicados en la dehiscencia de las habas, pero es necesario combinar análisis fenotípicos más precisos con nuevos estudios genómicos para profundizar y comprender las bases moleculares de este carácter.

Abstract

Pod dehiscence causes important yield losses in cultivated crops and therefore has been a key trait strongly selected against in crop domestication. In spite of the growing knowledge on the genetic basis of dehiscence in different crops, no information is available so far for faba bean. Here we conduct the first comprehensive study for faba bean pod dehiscence by combining, linkage mapping, comparative genomics, QTL analysis and histological examination of mature pods. Mapping of dehiscence-related genes revealed conservation of syntenic blocks among different legumes. Three QTLs were identified in faba bean chromosomes II, IV and VI, although none of them was stable across years. Histological analysis supports the convergent phenotypic evolution previously reported in cereals and related legume species but revealed a more complex pattern in faba bean. Contrary to common bean and soybean, the faba bean dehiscence zone appears to show functional equivalence to that described in crucifers. The lignified wall fiber layer, which is absent in the paucijuga primitive line Vf27, or less lignified and vacuolated in other dehiscent lines, appears to act as the major force triggering pod dehiscence in this species. While our findings provide new insight into the mechanisms underlying faba bean dehiscence, full understanding of the molecular bases will require further studies combining precise phenotyping with genomic analysis.

1. Introduction

Faba bean (*Vicia faba* L.) is a world-wide cultivated grain legume, known for its high protein content and yield potential. Its ability to grow under a wide range of climates and soil types has made faba bean one of the preferred crops for agricultural production (Singh et al. 2013), being the second most yielding feed grain legume after soybean (*Glycine max* L.) (FAOSTAT 2018). Besides diseases and pests, pod dehiscence is one of the major constraints on faba bean production in dry areas (Erskine et al. 1988). In some legumes such as common vetch (*Vicia sativa* L.) cultivars, dehiscence rate of mature pods can reach 40 to 60% (Sattell et al. 1998; Dong and Wang 2015). In soybean, Bhor et al. (2014) reported 50 to 100% yield losses in susceptible cultivars under severe dry climate conditions. In faba bean, yield losses at harvest can be substantial as well, and according to GRDC (GrowerNotes 2018), pod dehiscence can reach 30% maturity.

Pod dehiscence refers to the shattering of the pod shell, which enables the successful shattering of seeds (Dong and Wang 2015). A crucial strategy for seed dispersal in wild species ranks among the main sources of yield loss in cultivated crops and likely was one of the first traits selected against during crop domestication. Valve aperture during dehiscence is mediated by environmental factors and physical forces in the tissue, which in turn are determined by the properties of the wall cells around the valve suture. Relative humidity and variations in temperature trigger hygroscopic tensions in the pod walls, which are mediated by the different mechanical properties of lignified and non-lignified tissues and by changes in turgor associated to fruit maturation (Dong and Wang 2015; Hu et al. 2015).

Even after genetic selection against dehiscence, some degree of dehiscence remains in cultivated crops. Since the dominance of the trait difficult its efficient introgression into cultivated lines, dehiscence is still a key target trait in plant

breeding programs. Genetic analysis of pod dehiscence has been conducted in different crop legumes, such as soybean, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L.), pea (*Pisum sativum* L.), common vetch, lentil (*Lens culinaris* Medikus), azuki bean (*Vigna angularis* L.), and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) (Gao and Zhu 2013) but not faba bean. In these species, dehiscence is controlled by one or two dominant genes or by quantitative trait loci (QTL). A syntenic region, controlling the trait was identified in pea and lentil (Weeden 2002; Weeden et al. 2007), suggesting that orthologous genes may be modified during the domestication of these two crops.

Extensive results on the genetic control of dehiscence have been reported in cereals and in the Brassicaceae model species *Arabidopsis thaliana*. In cereals seed dehiscence is controlled by genes encoding transcription factors, indicating that differences in seed dispersal are associated with changes in transcriptional regulation (Doebley et al. 2006). In *Arabidopsis*, forward genetic approaches identified several transcription factors as well (Lewis et al. 2006), although it is unclear whether they are conserved in legumes (Gao and Zhu 2013).

The crucifer family produces siliques, a pod structure consisting of two fused valves (carpels), connected by a distinct edge or replum. In contrast, the legume pod has a single folded seed-bearing carpel lacking a replum. Another important structure delimiting the region between the valves and the replum is the dehiscence zone (DZ), which should be lignified in order to allow the separation of the valve from the replum. Differences in the DZ lead either to indehiscence or dehiscence of a plant. Ballester and Ferrándiz (2017) updated the genetic network directing morphogenesis of the DZ in *Arabidopsis* and reported the transcription factors and enzymatic functions with major roles in DZ formation. Thus, *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1/3* (*NST1/3*) promotes

lignification while *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE 1* (*ADPG1/2*) allows cell separation (**Figure 1**). *ADPG1/2* is controlled by the action of *ALCATRAZ* (*ALC*), a negative regulator of the *INDEHISCENT* (*IND*) gene, which in turn promotes the expression of *NST1/3*. Furthermore, both *ALC* and *IND* expression is both regulated by *SHATTERPROOF 1* (*SHP1*). The *shp* and *ind* mutants lack lignification and are fully indehiscent, thus corroborating the importance of DZ lignification in pod dehiscence (Ferrándiz et al. 2000; Rajani and Sundaresan 2001; Liljegren et al. 2004;).

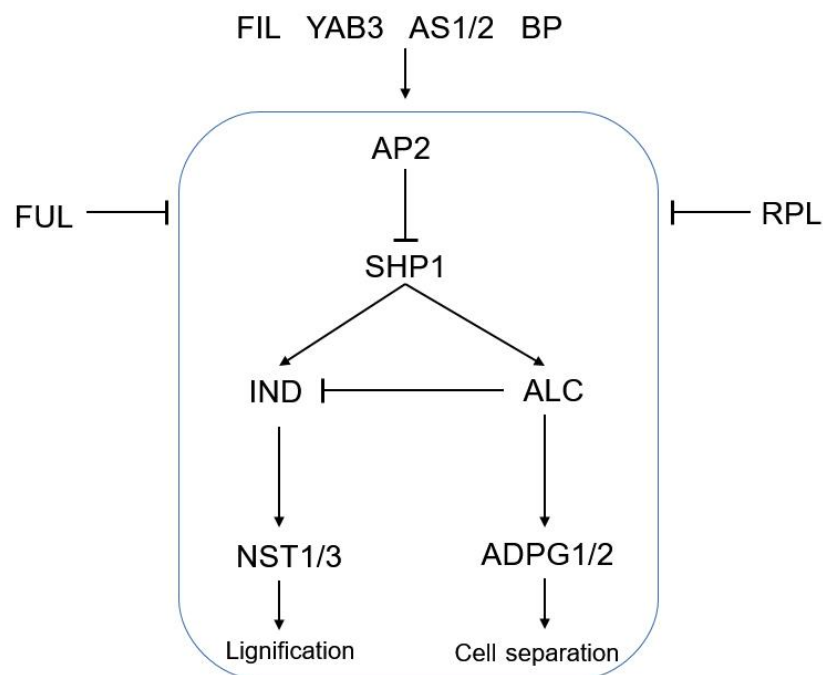


Figure 1. Schematic diagram of the genetic pathway in the dehiscence zone (DZ). Modified from Ballester and Ferrándiz 2017.

Upstream of these genes, *APETALA2* (*AP2*), represses the expression of *SHP1*. Adjacent to the DZ tissues, two important genes downregulate the expression of all dehiscence pathway-related genes: *FRUITFULL* (*FUL*) in the valve and *REPLUMLESS* (*RPL*) in the replum (Ferrándiz et al. 2000; Roeder et al. 2003). Other transcription factors regulating the expression of valves, DZ and replum are

FILAMENTOUS FLOWER (FIL), *YABBY3 (YAB3)*, *ASYMMETRIC LEAVES1/2 (AS1/2)* or *BREVIPEDICELLUS (BP)* (**Figure 1**).

Compared with model species, knowledge on the molecular control of dehiscence in legumes is limited. Despite the lack of a replum, the DZ is very similar showing a lignified separation layer along the pod between the two valves (Christiansen et al. 2002; Østergaard et al. 2006). This indicates that valve aperture is triggered by the same physical mechanism, although the lack of the replum tissue points towards a different anatomical basis.

In legumes, the molecular basis of indehiscence has been investigated in detail in soybean (Dong et al. 2014; Funatsuki et al. 2014). A major QTL, *PDH1* (QTL for Pod Dehiscence 1), encoding a dirigent-like protein involved in lignin biosynthesis, was reported as candidate for dehiscence regulation. The indehiscent genotype, *pdh1*, carries a premature stop codon and lacks lignin depositions along the valve. *PDH1* was shown to promote pod dehiscence by increasing the twisting force in the pod wall, the driving force of pod dehiscence (Funatsuki et al. 2014). The transcription factor *WRKY12* was also described to promote lignin biosynthesis and cell wall deposition in sorghum, *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* (Tang et al. 2013; Yoon et al. 2015).

Besides lignin deposition, cellulose and hemicellulose content in cowpea was related to the ability to resist pod opening (Suanum et al. 2016). In common bean, high dehiscence levels were correlated with high carbon and lignin contents of the pod valves (Murgia et al. 2017), while a transcriptomic study in *V. sativa* revealed candidate genes involved in the biosynthesis of different cell wall components (Dong et al. 2017b). Recently, a candidate gene approach in *Cicer arietinum*, using a RIL population derived from an interspecific cross, identified a major QTL (*PDH1*) regulating pod dehiscence in combination with the regulatory genes *FUL*, *ALC* and

AP2 previously described in *Arabidopsis* (Aguilar-Benitez et al. 2020a). Pod morphology (e.g. pod length) also affects the degree of dehiscence. For example, short pods in *Brassica* and *Sinapis* provide an indehiscent phenotype by reducing physical stress on the dehiscence zone (Summers et al. 2003; Wang et al. 2007).

Here we conducted a comprehensive investigation of pod dehiscence in faba bean by combining linkage mapping of candidate genes, QTL analysis and histological analysis of pod valves. A set of orthologs of dehiscence related genes described in *A. thaliana*, *M. truncatula*, *P. sativum* and *C. arietinum* were tested for polymorphism and further mapped in a segregating population. The final objectives were to: (i) saturate the faba bean map with candidate genes controlling dehiscence, (ii) compare the locations of the faba bean QTLs with those reported in related legumes species and (iii) perform a comparative histological analysis in pods from contrasting lines. Our results add to the understanding of the genetic basis of dehiscence and will help to identify candidate genes responsible for indehiscence in this agronomically important crop.

2. Results

2.1. Phenotypic evaluation of dehiscence

Phenotypic trait analysis showed a continuous distribution of dehiscence (**Figure 2**), suggesting that the character is controlled by multiple genes in this population. The frequency distribution of all variables did not fit the normal distribution ($P < 0.05$). In the four years, a positive skewness was observed (**Figure 2**), indicating a transgressive segregation towards lower pod dehiscence values contributed by the female line Vf6.

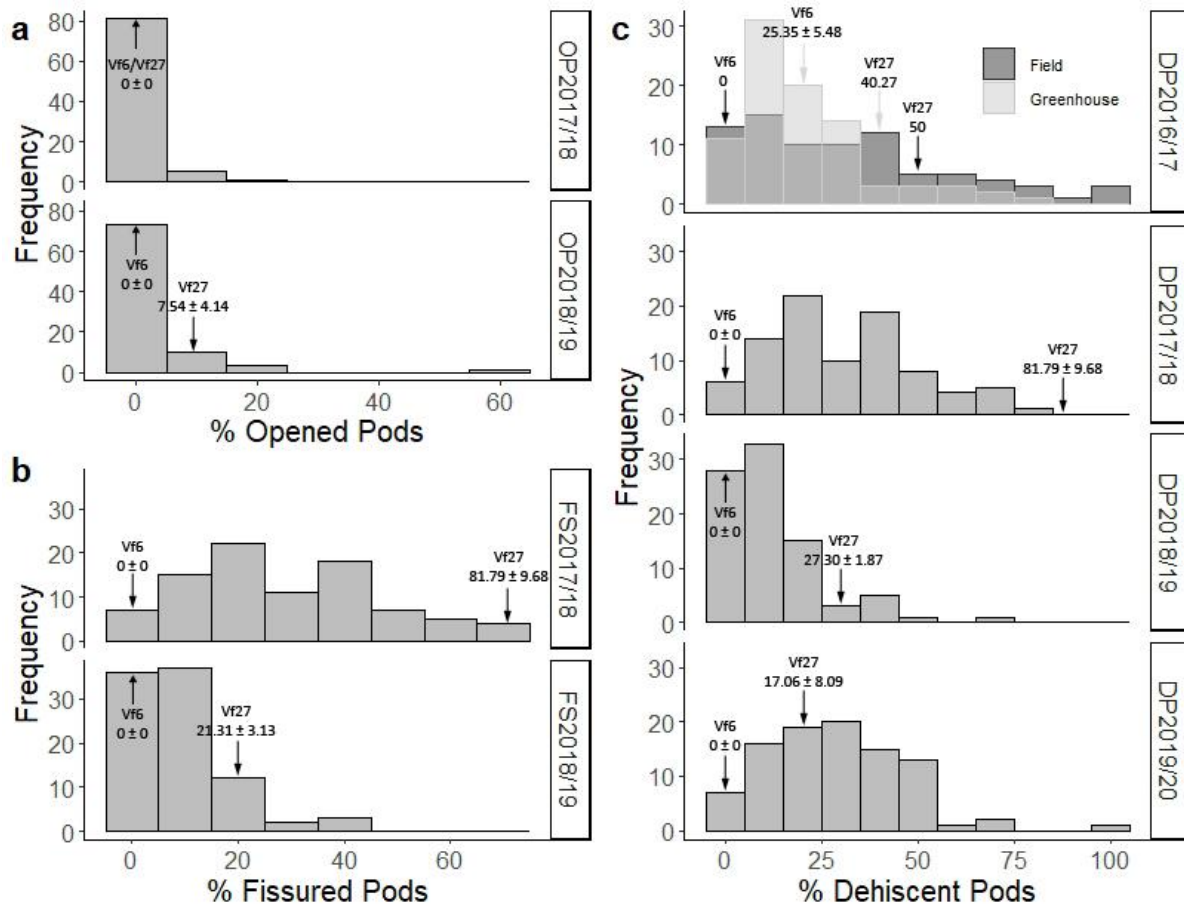


Figure 2. Frequency distribution of dehiscence traits recorded in the Vf6 x Vf27 RIL population. a) Opened Pods (OP) in 2017/18 and 2018/19; b) Fissured Pods (FS) in 2017/18 and 2018/19; c) Dehiscent Pods (DP) in 2016/17, 2017/18, 2018/19 and 2019/20. The phenotypic values (mean \pm SE) of the parental lines are indicated by arrows.

Table 1 shows the mean phenotypic values and some basic descriptive statistics for the dehiscence traits recorded: opened pods (OP), fissured pods (FS) and dehiscent pods (DP). Parental lines showed significant differences ($P < 0.05$) for FS in 2017/18 and 2018/19, and DP in 2017/18 and 2018/19. Except in OP2017/18, line Vf27 exhibited higher phenotypic values than Vf6 for all the dehiscence traits. Evaluation in greenhouse (DPG) in 2016/17 showed no statistical differences between the parental lines. DP and FS showed a wider range of variation than OP. The range of OP in the different seasons varied from 0 to > 65% (**Table 1**).

Table 1. Phenotypic values of completely opened pods (OP), fissured pods (FS) and dehiscent pods in greenhouse (DPG) or field (DPF) for the parental lines and the RIL population Vf6 x Vf27 in 2016/17, 2017/18, 2018/19 and 2019/20. Significant differences between parental lines ($P \leq 0.05$) are indicated by asterisks.

Trait	Vf6	Vf27	Range (Min-Max)	Mean (\pm SE)
OP2017/18	0 \pm 0	0 \pm 0	0-16.67	0.86 \pm 0.32
OP2018/19	0 \pm 0	7.54 \pm 4.14	0-65.15	2.99 \pm 0.86
FS2017/18*	0 \pm 0	81.79 \pm 9.68	0-74.07	29.96 \pm 1.99
FS2018/19*	0 \pm 0	21.31 \pm 3.13	0-39.86	9.23 \pm 0.97
DPG2016/17	25.35 \pm 5.48	40.27	0-82.60	20.63 \pm 1.90
DPF2016/17	0	50	0-100	32.80 \pm 2.92
DP2017/18*	0 \pm 0	81.79 \pm 9.68	0-81.61	31.25 \pm 2.03
DP2018/19*	0 \pm 0	27.30 \pm 1.87	0-67.38	12.66 \pm 1.37
DP2019/20	0 \pm 0	17.06 \pm 8.09	0-100	29.42 \pm 1.83

Correlations among traits were evaluated across the four years at $P < 0.05$ and $P < 0.01$. As summarized in **Table 2**, the highest correlations were found between DP and FS in 2017/18 (0.98) and 2018/19 (0.88), followed by DP and OP in 2018/19 (0.58). Except for DP2019/20, DP values in the greenhouse showed moderate but significant correlations ranging from 0.25 to 0.37 with the rest of the DP field ratings. There were also significant correlations between 0.21 and 0.31 among the DP field values except between DP2018/19 with DPF2016/17 and DP2017/18. No correlation was detected among the OP field values in 2017/18 and the DP data collected in the other three years, except for DPG2016/17. A strong attack of aphids during the flowering and podding period in 2018/19 and the high incidence of broomrape (*Orobanche crenata*) in 2017/18 might be the main reasons for the lack of correlation between the traits recorded (**Table 2**).

Table 2. Correlations between the dehiscence traits scored. Significant correlations are indicated in bold. Asterisks: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

	OP2017/18	OP2018/19	FS2017/18	FS2018/19	DPG2016/17	DPF2016/17	DP2017/18	DP2018/19	DP2019/20
OP2017/18	1.00								
OP2018/19	0.14	1.00							
FS2017/18	-0.01	0.12	1.00						
FS2018/19	-0.15	0.23*	0.21	1.00					
DPG2016/17	0.30**	0.35**	0.19	0.21	1.00				
DPF2016/17	-0.07	0.08	0.31**	0.16	0.37**	1.00			
DP2017/18	0.10	0.13	0.98**	0.19	0.25*	0.31**	1.00		
DP2018/19	-0.05	0.58**	0.17	0.88**	0.26*	0.11	0.17	1.00	
DP2019/20	-0.19	0.11	0.22*	0.17	0.07	0.31**	0.21*	0.22*	1.00

ANOVA results for the genotype x environment (G x E) analyses of each evaluated trait are shown in **Supplementary Table 1**. For all traits, significant differences were obtained between Genotype (RILs) and Environment (years of evaluation). For OP and DP evaluations, significant differences were also obtained for the G x E interaction, suggesting that pod opening differed for a certain genotype across the years.

2.2. Dehiscence candidate genes and marker development

Fifty-one dehiscence-related candidate genes (**Supplementary Table 2**) were selected on the basis of current knowledge of their roles in pod dehiscence control from different plant species, including *Arabidopsis thaliana* (27 genes), *V. sativa* (22), *G. max* (1) and *Solanum lycopersicum* (1). Gene sequences were subjected to BLAST searches to identify orthologs in other sequenced legume species closely related to faba bean (*C. arietinum*, *M. truncatula* and *P. sativum*) and positive blast matches for all of them were found (**Supplementary Table 2**).

Based on these sequences, primers were designed and used for amplification with DNA from *V. faba*. We obtained amplification products for 26 *A. thaliana* and 16 *V. sativa* gene markers. The gene marker from *S. lycopersicum* (Vf_TAGL1) also produced an amplification product, whereas attempts to amplify the Vf_PDH1 marker from *G. max* were unsuccessful. Primer sequences, size of the amplified DNA fragments and annealing temperatures for each candidate gene are shown in **Supplementary Table 3**.

The sequences of the amplified DNA fragments were aligned to identify possible Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) between the parental lines. A total of 38 amplified sequences (23 candidates from *A. thaliana*, 14 from *V. sativa* and one from *S. lycopersicum*) contained SNPs in restriction enzyme recognition sites and were thus transformed to Cleavage Amplified Polymorphisms (CAPs). Ten of the detected SNPs did not contain cleavage sites for available restriction enzymes and therefore internal primers were designed for these sequences. Where the internal primers failed, SNPs were genotyped using the MassArray iPLEX (Sequenom) platform (<http://www.cegen.org>). Only one of the amplified genes (Vf_TAGL1) could not be genotyped in the population.

Finally, 44 out of 163 genes genotyped using the KASPar technique, displayed polymorphisms between the parental lines and were included in the genetic map.

2.3. Genetic map and synteny analysis

To build a more saturated map in the RIL population, segregation data from 44 KASPar markers and 37 dehiscence-related markers were combined with a previous data set (Cruz-Izquierdo et al. 2012). Four of the later markers deviated significantly ($P < 0.05$) from the expected Mendelian inheritance ratio of 1:1 (**Table 3**). Vf_AG1, Vf_SEP3 and Vf_SHP1 were skewed towards the Vf27 allele whereas Vf_c128596 was in favour of the Vf6 allele. The linkage map consists of six main

linkage groups and 5 fragments, and spans nearly 4.421,1 cM (**Figure 3**). The existence of common markers with previous consensus maps (Satovic et al. 2013; Webb et al. 2016) allowed to assign all the LGs to the corresponding faba bean chromosomes (chrs.). All candidate-gene markers except Vf_YAB3 were included in the new genetic map. The number of candidate-gene markers in each LG ranged from one in LGI to nine in LGII, and the distorted markers Vf_AG1, Vf_SEP3 and Vf_SHP1 mapped together in the distal part of chr. VI.

In order to determine if these genes maintain their relative positions in the genomes of different legumes, we determined synteny between *V. faba* and the related species *M. truncatula*, *P. sativum* and *C. arietinum* (**Table 3**). The level of synteny was high (78%), with 29 out of 37 gene markers showing conservation in at least one other species. Twenty of markers were syntenic with *C. arietinum*, 21 with *M. truncatula* and 23 with *P. sativum*. Finally, thirteen markers (Vf_AP1, Vf_AS2, Vf_HEC2, Vf_JAG, Vf_PI, Vf_SEP3, Vf_c111669, Vf_c115918, Vf_c119513, Vf_c119843, Vf_c120857, Vf_c124154 and Vf_c128287), exhibited conserved synteny across all four species, preserving the co-localization in the homologous chromosomes.

Table 3. Genetic segregation, chi-square test and location of the dehiscence related gene markers in faba bean (Vf) and related legume species: Mt, *Medicago truncatula*; Ps, *Pisum sativum*; Ca, *Cicer arietinum*. Grey cells indicate syntenic chromosomes (Chr) and linkage groups (LG). Absence of fit to the expected 1:1 segregation is indicated by an asterisk.

Marker	X ² (1:1)	P	Vf_Chr	Mt_Chr	Ps_LG	Ca_Chr
Vf_ADPG1	1,000	0,317	III	1	2	scaffold
Vf_AG1	11.306	0.001*	VI	8	7	1
Vf_ALC	2.036	0.154	I	1	1	8
Vf_AP1	2.178	0.140	IV	8	4	7
Vf_AP3	2.390	0.122	I	5	1	5
Vf_BP	0.605	0.437	I	1	scaffold	4
Vf_AS2	0.316	0.574	IV	8	4	7

Vf_FUL	7.511	0.006	IV	2	4	7
Vf_HEC2	3,879	0,049	I	5	1	8
Vf_IRX3	0.800	0.371	II	2	3	7
Vf_JAG	2,182	0,140	III	1	2	4
Vf_LATE	0.931	0.335	II	8	3	scaffold
Vf_NAC012	0,000	1,000	IV	8	4	scaffold
Vf_PI	0.780	0.377	II	3	3	4
Vf_PID	5.902	0.015	VI	8	7	1
Vf_PIN3	8.783	0.003	V	6	2	8
Vf_RPL	0.620	0.431	II	4	7	6
Vf_SEP1	0.800	0.371	I-a	7	5	3
Vf_SEP3	23.211	0.000*	VI	8	7	6
Vf_SHP1	17.329	0.000*	VI	3	7	scaffold
Vf_SPT	5.000	0.025	I	5	scaffold	4
Vf_STK	0.048	0.827	II	3	6	5
Vf_YAB3	2.036	0.154	Undetermined	4	7	6
Vf_c111669	0.111	0.739	VI	4	7	6
Vf_c115918	1,246	0,264	IV	8	4	7
Vf_c116185	2.647	0.104	II	5	1	2
Vf_c117969	2,315	0,128	I	6	6	2
Vf_c118965	0.821	0.365	I	scaffold	6	8
Vf_c119513	0.409	0.522	IV	8	4	7
Vf_c119843	3.967	0.046	VI	4	7	6
Vf_c120726	0.800	0.371	I	6	6	2
Vf_c120857	0.012	0.912	II	3	3	5
Vf_c124154	0.051	0.821	III	1	2	4
Vf_c126514	0.103	0.748	I	5	scaffold	2
Vf_c127417	0.000	1.000	V	1	2	4
Vf_c128287	0.013	0.910	II	3	3	5
Vf_c128596	14.098	0.000*	II	4	7	6

2.4. QTL analysis

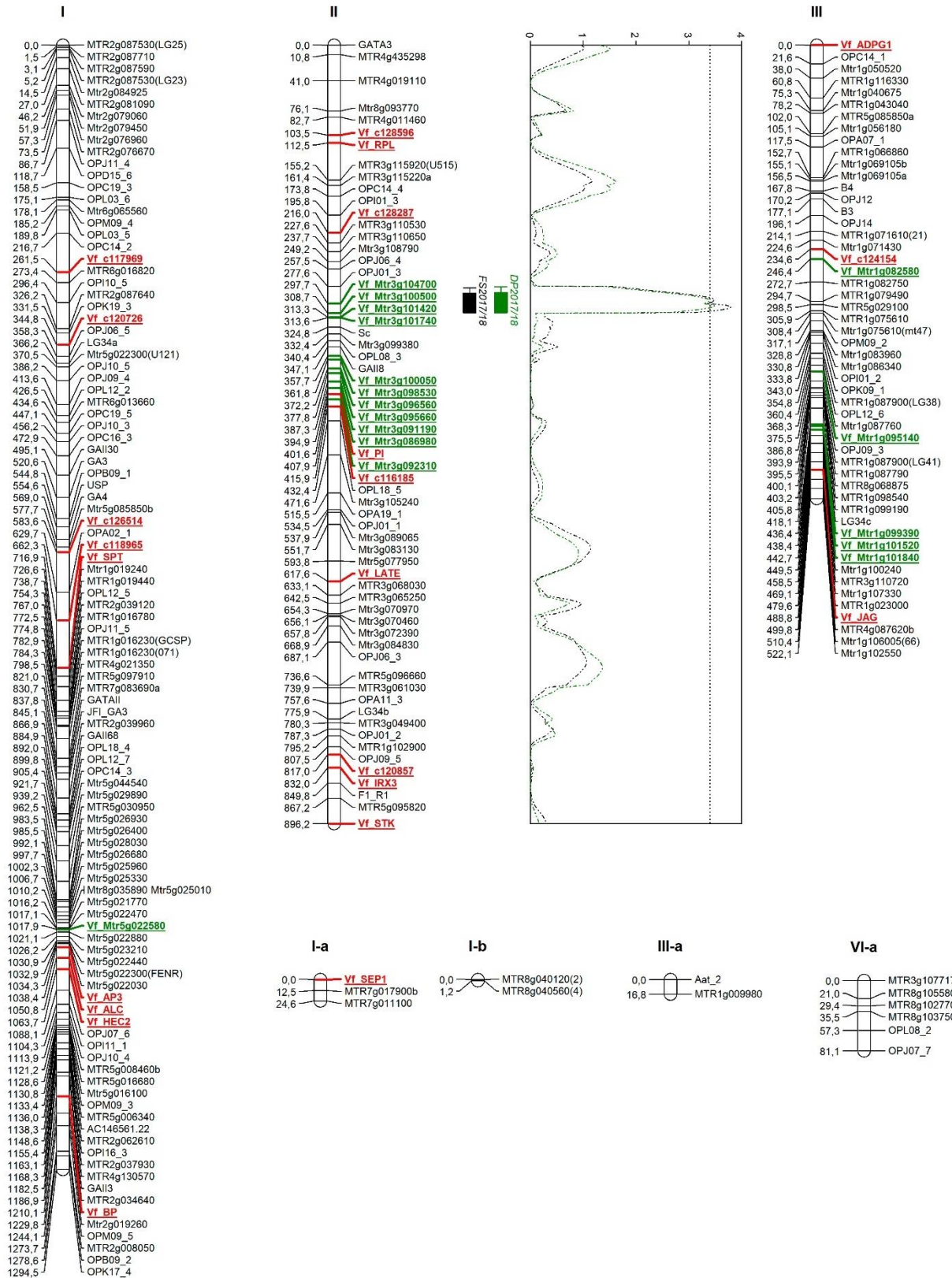
Three significant QTL regions (LOD threshold > 3.3) in chromosomes II, IV and VI were related to dehiscence resistance (**Table 4, Figure 3**). Except for QTL DPG2016/17, the additive effects in most of the associated markers were negative, indicating that the resistance enhancing alleles originated from the dehiscence resistant parent Vf6. The QTL in chr. II (FS2017/18) close to marker Vf_Mtr3g104700 explained 20.7% of the phenotypic variation, whereas the QTL of DP2017/18 accounted for 18.5% of the phenotypic variation in the same region.

Another QTL for resistance to dehiscence (DPF2016/17) was detected in chr. IV, explaining 15.2% of the variation. The DPF2016/17 peak position corresponds to the marker Mtr4g100510. Finally, QTL DPG2016/17 was detected in chr. VI, flanked by the candidate gene for dehiscence *SEP3*, and for Mtr8g085280(81), explaining 18.6% of the phenotypic variation. The 2019/20 evaluation, although showing a moderate correlation with the dehiscence traits scored in the previous seasons, did not reveal any significant QTL region.

A BLASTp search was performed using *Arabidopsis* as a model, to identify the gene orthologs flanking each QTL and the results are shown in **Supplementary Table 4**.

Table 4. Trait name, peak position (cM), chromosome (Chr), flanking markers, LOD scores, additive effects and phenotypic variation explained (R^2) by the QTLs for dehiscence resistance detected in the Vf6 x Vf27 RIL population.

Trait	Peak	Chr	Flanking Markers	LOD	Additive effects	R^2
FS2017/18	301.705	II	Vf_Mtr3g104700	3.8	-8.51046	20.7
DP2017/18	300.705	II	Vf_Mtr3g104700	3.48	-8.20145	18.5
DPF2016/17	432.986	IV	Mtr4g100510	3.38	-10.5056	15.2
DPG2016/17	290.958	VI	Vf_SEP3/Mtr8g085280(81)	3.51	8.26058	18.6



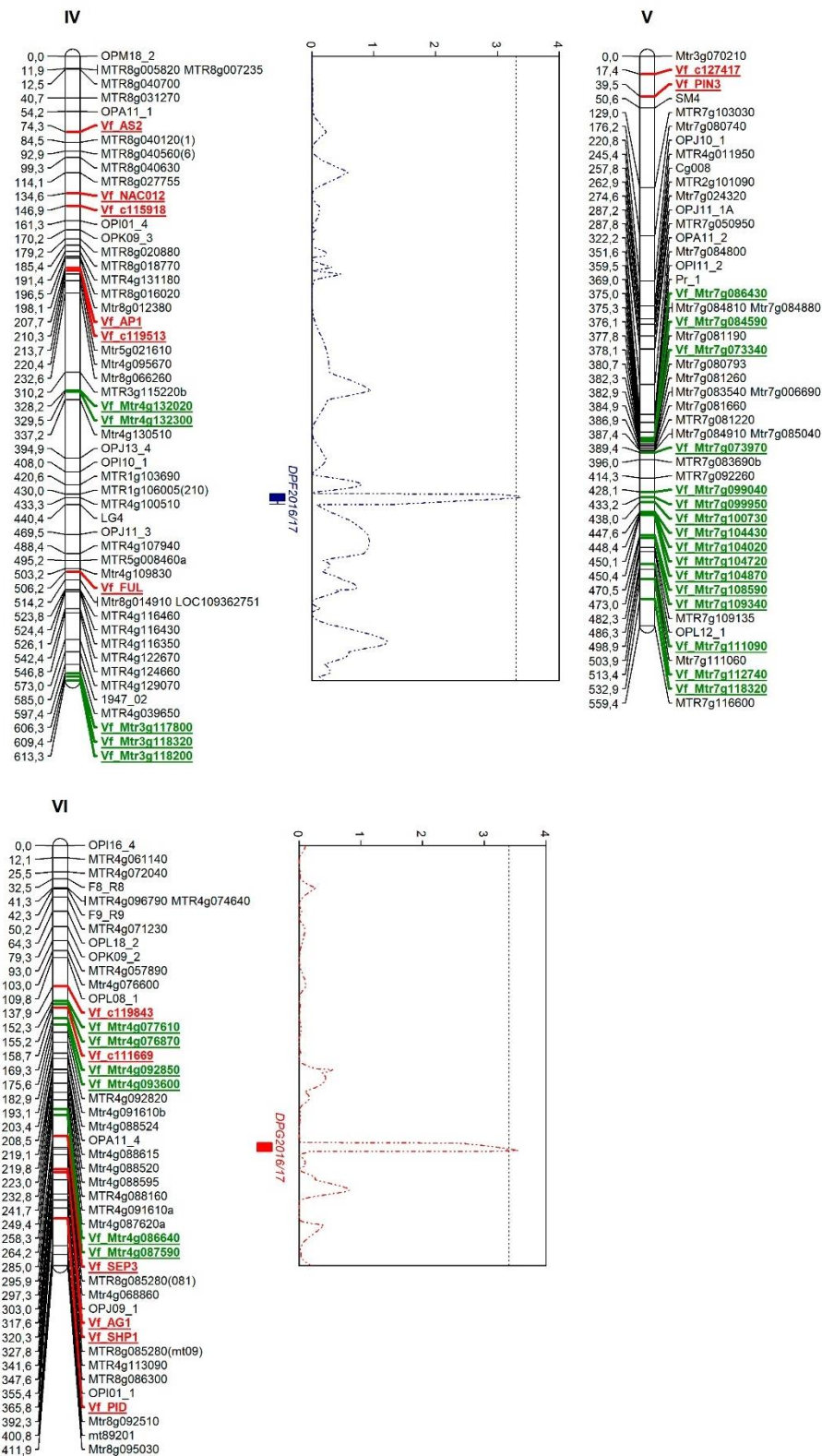


Figure 3. Linkage map and QTLs for dehiscence traits detected in the Vf6 x Vf27 RIL population. QTL locations are represented with bars (2-LOD interval) and boxes (1-LOD interval). Candidate gene markers are in red. Molecular markers used for map saturation by the Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) assay are in green. FS, Fissured pods; DPG, Dehiscent pods in the greenhouse; DPF; Dehiscent pods in the field.

2.5. Histological characterization

Samples obtained for histological analysis consisted of proximal and distal transverse cuts corresponding to the ventral and dorsal sutures of mature pods. The micrographs of the transverse sections revealed that the faba bean pod wall (pericarp) follows the common arrangement and structure described in legume crops (**Figure 4**). The exocarp consist of a single-layered epidermis (EP) while the mesocarp (MS) is arranged in several layers of parenchyma. The endocarp (EN) is composed of a sclerenchyma which heavily thickened by lignin in dorsal and ventral sutures (or sheath), with two lateral branches extending into the seed coats and a vascular bundle (VB) containing the xylem and phloem tissues. Both exocarp and mesocarp are rich in pectins, as indicated by metachromatic staining with toluidine blue (**Figure 4**). The DZ tissue between valves almost disappeared after the inclusion in paraffin, probably due to the maturity of the samples.

Histological staining revealed clear differences between parental lines, regarding both the area and the perimeter of the respective lignified cell layer (**Table 5**) and the proportion of lignin deposition within cells (**Table 6**). In all samples, the indehiscient parent Vf6 showed a higher sheath lignified area (stained in light blue) than the dehiscent line Vf27 (**Figure 4, Table 5**). In the proximal dorsal zone, this measurement was performed in total stained tissue since there was no clear distinction between left and right valves. In this case, the central zone in Vf6 also contained more cells than in Vf27 (**Supplementary Figure 1**).

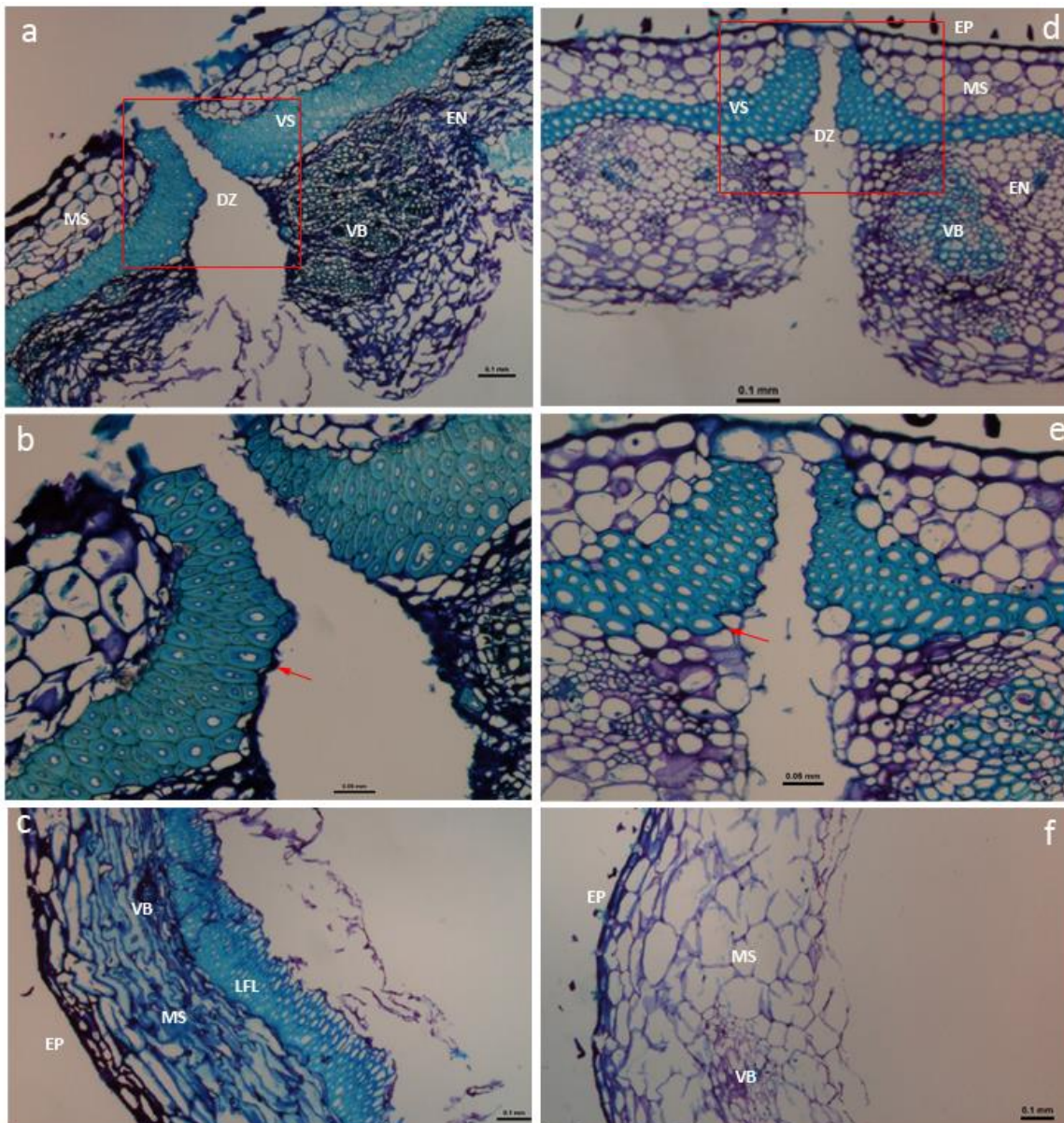


Figure 4. Histological study of pods in the parental faba bean lines VF6 (left) and Vf27 (right). (a) Cross-sections of the distal part ventral suture in Vf6 and Vf27 (d). Detail of the dehiscence zone in Vf6 (b) and Vf27 (e); red arrows indicate differences in the degree of lignification of the VS cell wall. Transverse section of the lateral side of the pod in Vf6 (c) and Vf27 (f). Bars, 0.1 mm (a, c, d, f); 0.05 mm (b, e). DZ, dehiscence zone; EP, epidermis; MS, mesocarp; VS, ventral sheath; VB, vascular bundle; EN, endocarp; LFL, lignified fiber layer.

Table 5. Area and perimeter of the sheath lignified layers in the parental lines, measured at the distal and proximal sides of the ventral and dorsal pod sutures. Lignified cells arranged as a single layer without left-right distinction are indicated by an asterisk.

		Right		Left	
		Area (mm ²)	Perimeter (mm)	Area (mm ²)	Perimeter (mm ²)
Distal zone / Ventral suture	Vf6	0.101	2,412	0.124	2,604
	Vf27	0.058	1,847	0.053	2,002
Distal zone / Dorsal suture	Vf6	0.060	1,510	0.069	1,635
	Vf27	0.016	0.883	0.017	0.827
Proximal zone / Ventral suture	Vf6	0.091	2.779	0.086	2.254
	Vf27	0.048	1.751	0.051	1.91
Proximal zone / Dorsal suture*	Vf6	0.117	3.609		
	Vf27	0.037	2.041		

Cell walls in the sheath of the pods were heavily thickened (**Figure 4**). Nevertheless, the lumen of the cells appeared to be almost occluded in the indehiscent Vf6 line as compared of the dehiscent pods in the Vf27 parent (**Figure 4, b and e**). Except for the proximal ventral zone, which is less relevant for dehiscence, the percentage of lignin deposition inside the cells was higher in Vf6 than in Vf27 ($P < 0.01$). Vf6 showed higher lignin deposition in the distal zone than in the proximal zones, both at ventral and dorsal sutures, whereas in the dehiscent line Vf27 lignin deposition was similar between the two zones (**Table 6**).

Table 6. Percentage of lignin cell occupation in the faba bean parental lines Vf6 and Vf27, measured in different pod zones. Significant differences according to ANOVA are indicated in bold ($P < 0.01$).

	Distal ventral	Distal dorsal	Proximal ventral	Proximal dorsal
Vf6	91.88 ± 0.008	87.74 ± 0.010	71.92 ± 0.024	76.87 ± 0.020
Vf27	79.13 ± 0.014	68.24 ± 0.014	73.39 ± 0.012	69.44 ± 0.010

Interestingly, the two parental lines exhibited a marked difference in the geometrical arrangement and histological characteristics of the lateral cell wall

(**Figure 4, c and f**). The three pericarp layers EP, MS and EN with a continuous ring of lignified cells, were clearly distinguishable in the dehiscent resistant Vf6 line, while in Vf27 only the EP could be distinguished and no lignin deposition was found in any of the other layers.

3. Discussion

Pod dehiscence causes important agronomic losses and regarded as a key trait in crop domestication (Dong et al. 2014; Di Vittori et al. 2019). In legumes such as chickpea, soybean or pea, clear differences in dehiscence between wild (dehiscent) and cultivated (indehiscent) accessions were reported (Ladizinsky 1979; Dong et al. 2014; Hradilová et al. 2017), showing the results of many years of domestication. In faba bean, however, the wild progenitor is unknown, making it difficult the comparison between a wild dehiscent genotype and modern varieties.

Here we conducted the first comprehensive study of pod dehiscence in faba bean by combining comparative genomics, linkage mapping of candidates genes, QTL analysis and histological examination of pod valves from a segregating population. To this aim, we used a RIL population derived from the contrasting lines Vf6 (indehiscent) and Vf27 (dehiscent), the latter being a primitive paucijuga form found from Afghanistan to India, whose phenotype is similar to the hypothetical wild progenitor (Cubero 1974).

Pod dehiscence in faba bean was characterized in four consecutive years under field and greenhouse conditions, based on previous data obtained from model plants and related legume species. Phenotypic evaluation of dehiscence showed a gradient similar to that described in *P. vulgaris* (Murgia et al. 2017), ranging from pods completely indehiscent and pods with valves separated to some degree, to fine fissured valves and completely open valves (twisted and non-twisted). Three QTLs were identified although none of them was significant across

all seasons, as would be expected for a trait which is strongly influenced by environmental conditions such as humidity, temperature, duration of pod drying and biotic stresses (Ogutcen et al. 2018; Zhang et al. 2018).

The lack of significance for some QTLs in 2018/19 can be further attributed to a severe aphid attack leading to complete exploitation of the hosts plant. As a result, the pods failed to develop correctly and the phenotypic evaluation was somewhat distorted. Similarly, the QTL results obtained in 2017/18 could be explained by a severe broomrape (*Orobanche crenata*) attack. This parasitic plant is widespread in Mediterranean areas and west Asia, lacks chlorophyll and depends on the host plant for nutrition. The broomrape attack in 2017/18 affected plant and pod development in the critical phase of biomass accumulation, leading to abortions and a marked decrease in pod number. Thus, biotic stresses influencing the genetic effects could, together with the environmental conditions, represent the main reasons for the observed lack of strong correlation between dehiscence traits and growing seasons, corroborated by the G x E significance observed in some of the traits evaluated.

To identify candidate genes co-localizing with QTLs for faba bean dehiscence resistance, we selected a set of candidate marker genes involved in pod dehiscence in *Arabidopsis* and other relevant crop species, which were found to be conserved between mono and dicotyledonous plants (Konishi et al. 2006; Ogutcen et al. 2018). As a consequence, these shared domestication-related loci have become common targets for genetic studies and breeding programs. Here we surveyed 51 faba bean orthologs of dehiscence-related genes from *A. thaliana*, *V. sativa*, *G. max* and *S. lycopersicum*, in order to unveil the presence of homologous pathways and loci controlling dehiscence. BLAST searches and PCR analysis with designed primers identified 43 orthologs, which retained enough sequence similarity to be amplified in faba bean. Thirty-eight of these contained SNPs and 37 were finally included in

the new genetic map. The chromosomal positions of these markers among legume species was highly conserved, thus corroborating that collinearity allows to predict gene position across members of the same family.

QTL analysis revealed three significant QTLs for dehiscence, which were located in chromosomes II, IV and VI. The higher R^2 -value (20.7%) was obtained in the 2017/18 evaluation, when the dehiscence was evaluated as fissured pods. None of the major QTLs detected was stable across the environments, probably due to the biotic stresses mentioned above. This observation is supported by the lack of correlation between the respective dehiscence traits FS, OP and DP. Additional evaluations allowing more precise phenotyping in a controlled environment will be required to identify and validate QTLs consistent across different years.

Except for QTL DPG2016/17, which is flanked by Vf_SEP3 in chr. VI, none of the other QTLs showed a close relation with the dehiscence-related candidate gene markers. However, some of them exhibited synteny with previous QTLs detected in closely related species. For example, QTL DP2017/18 in chr. II, was syntenic with QTLs reported in *L. culinaris* (Fratini et al. 2007), *P. sativum* (Weeden 2002; Weeden et al. 2007) and *M. truncatula* (Hradilová et al. 2017). Similarly, QTLs in chr. IV and VI (DPF2016/17 and DPG2016/17) might correspond to syntenic blocks reported in *L. culinaris* (Fratini et al. 2007), *P. sativum* (Weeden 2007), *C. arietinum* (Aguilar-Benitez et al. 2020a) and *G. max* (Suzuki et al. 2010; Dong et al. 2014; Funatsuki et al. 2014) where other dehiscence related genes or QTLs were detected. As reported by Cannon et al. (2009), most of the genes in papilionoid legume species are likely to be located in syntenic regions with respect to any other given papilionoid species. The results obtained here support these findings by confirming the conservation of large-scale synteny blocks for dehiscence regulation in orthologous chromosomal regions.

Important progress has been made in the characterization of the genetic basis of dehiscence in a number of model species and crops such as wheat, rice, soybean, beans, lentil, pea among others (reviewed by Dong and Wang 2015; Ballester and

Ferrándiz 2017; Murgia et al. 2017; Ogutcen et al. 2018; Di Vittori et al. 2019). Collectively, these studies suggest that pathways and loci controlling pod dehiscence are broadly conserved across taxa, pointing towards homologous mechanisms underlying dehiscence. However, while a convergent phenotypic evolution was proposed across cereals, which might also have occurred at orthologous loci in closely related legume species, such evidence has not been obtained so far across more distant legume crops (Di Vittori et al. 2019). Comparative mapping between *P. vulgaris* and *G. max* suggested that the convergent evolution of the indehiscent phenotypes derived from mutations at different genes involved in pod cell wall biosynthesis and lignin deposition (Rau et al. 2019), which suggested a more complex pattern in the genetic control of this trait in legumes.

In this study, a number of orthologs dehiscence-related genes from different species were genotyped and mapped to assess their role in faba bean indehiscence. Among these, only *SEP3*, encoding a MADS-box transcription factor, was found to flank a significant QTL for dehiscence resistance in 2016/17 (DP2016/17). MADS-box genes are known as key regulators of virtually every aspect of plant reproductive development and have served as important targets for selection during crop domestication (Schilling et al. 2018). *SEP3* was described as part of the ABCDE complex of floral organ determination (Immink et al. 2009; Kaufmann et al. 2009; Shi et al. 2015; Chi et al. 2017). In *Arabidopsis*, the C+E complex specifies carpels, being the class C gene *AGAMOUS* (*AG*) (Yanofsky et al. 1990) and the class E *SEPALLATA1/2/3/4* (*SEP1/2/3/4*) (Pelaz et al. 2000). *SEP3* interacts with genes regulated by auxin, gibberellic acid and brassinosteroids, including *PID* and *PIN* (Kaufmann et al. 2009). Immink et al. (2009) described the interaction network of *SEP3*, showing the relation of this gene with the dehiscence pathway in *A. thaliana* (Ballester and Ferrándiz 2017).

A SEPALLATA MADS-box protein from tomato was described as an activator of the abscission zone in the flower peduncle (Liu et al. 2014). This protein forms a complex with JOINTLESS and MACROCALYX and activates other genes to transform meristem cells in a few layers of small cells (abscission zone). Auxin flow is also an important requisite for the formation of the dehiscence zone in *A. thaliana* (Ballester and Ferrándiz 2017). Interestingly, our results revealed that QTL DPG2016/17 was also flanked by Mtr8g085280, an ortholog of the *Arabidopsis* *NO VEIN* gene that regulates *PIN* expression and auxin polarity (Tsugeki et al. 2009) thus suggesting that this process might also be involved in faba bean dehiscence resistance.

A recent transcriptomic analysis of dehiscence in *V. sativa* identified several genes related to cell wall modifications (Dong et al. 2017b), whose orthologs were analyzed in our study. However, none of these showed a significant correlation with dehiscence in *V. faba*. Moreover, some of the soybean and *Arabidopsis* pod dehiscence genes assayed here, such as *SHAT1-5*, *pdh1*, *SHP1*, *SHP2*, *IND*, and *ALC*, were not found to be differentially expressed in *V. sativa*. A similar lack of relation of *IND*, *SHP1* and *PDH1* with dehiscence, as observed in our study, was previously reported in a cross between yardlong bean and wild cowpea (Suanum et al. 2016).

Dehiscence in faba bean could be related with the expression level of certain genes. For example, fusion of the strong 35S promoter to the MADS-box gene *FUL* in *A. thaliana* resulted in overexpression of dehiscence-related genes *ALC*, *IND* and *STK* (Zhang et al. 2016). Similarly, overexpression of another MADS-box gene *AGL1* caused abnormal flowers and short, yellowish-green and early dehiscent pods, indicating a possible relationship between pod length and dehiscence (Chi et al. 2017). Interestingly, the faba bean parental line Vf27 has short dehiscent pods, although we found no correlation between pod length and dehiscence traits (data not shown). Previous QTL analysis in our group (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Satovic

et al. 2013) detected QTLs for pod length in chromosomes I and V, but none of them co-localized with the QTLs for dehiscence found in this work. This lack of coincidence suggests that pod length and dehiscence may not be related in faba bean.

Histological characterization of the faba bean pod sutures in mature pods revealed anatomical structures analogous to those described in other legumes such as soybean, common bean, pea or common vetch (Wang et al. 2007; Dong et al. 2014; Hradilová et al. 2017; Murgia et al. 2017; Di Vittori et al. 2020; Parker et al. 2020). Pod dehiscence arises from fissures that initiate in the ventral sutures, as recently observed in chickpea by Aguilar-Benitez et al. (2020a). Our micrographs from the pod opening sutures show the progression of the valve separation and the collapse of cells in the DZ. Clear differences in the lignification pattern were detected between contrasted faba bean lines. Thus, although the cell walls in the sheath were heavily thickened in both parental lines, the cell lumen appeared to be almost occluded in the indehiscent Vf6 compared to the primitive dehiscent line Vf27. A major lignification in the DZ was reported to confer dehiscence resistance to mature pods in soybean (Dong et al. 2014), *Brassica napus* (Zhang et al. 2016) and *P. vulgaris* (Murgia et al. 2017; Di Vittori et al. 2020; Parker et al. 2020). Moreover, observation of the anatomical structure of pod ventral sutures in common vetch (*V. sativa*) revealed that all dehiscent vetches have abscission layers in the DZ that are absent in the indehiscent plants (Dong et al. 2017a). However, this finding could not be corroborated in our faba bean sections, due to the advanced stage of maturation of the pod samples used in the study.

Clear-cut differences were observed between the two faba bean lines concerning the degree of lignification in the sclerenchyma inner cells of the pod walls. A continuous ring of cells with high lignification was specifically detected in the indehiscent line Vf6, while in Vf27 this lignified wall fiber layer (LFL) was absent.

This observation is similar to that described in *Brassica* species, where indehiscent species show a more lignified endocarp than dehiscent ones (Zhang et al. 2016). By contrast, our findings are opposed to those reported from histological studies in common bean and soybean, where pod valves of the wild dehiscent lines showed a strong lignified wall fiber layer contrasting with a complete absence of lignin deposition in the indehiscent lines (Funatsuki et al. 2014; Murgia et al. 2017; Di Vittori et al. 2019; Takahashi et al. 2019; Di Vittori et al. 2020; Parker et al. 2020).

Because not all anatomical or histological differences between the primitive dehiscent line Vf27 and Vf6 are necessarily correlated with dehiscent traits, we analyzed the new faba bean dehiscent lines, 335, 756, 1068. Histological staining revealed a ventral sheath pattern similar to Vf27 with lower deposition of lignin compared to Vf6. However, a lignified wall fiber layer (LFL), which is absent in Vf27, was detected in these three dehiscent lines (**Supplementary Figure 2**), although it was thinner and had an empty lumen. These results suggest the development of an intermediate, but correlated cell pattern from the primitive dehiscent phenotype Vf27 to the new dehiscent lines tested.

Although the tissue sections at this stage were difficult to obtain due to the fragility of the pod valves, we clearly observed an increased mechanical resistance of Vf6 compared with Vf27. Therefore, we propose that the dehiscence zone of faba bean is functionally equivalent to that described in crucifers, although the underlying molecular mechanisms may differ. At the late stage of maturity, once lignification is completed and the valve attachment becomes weakened, the increased size of the vacuolated cells in the lateral walls of the dehiscent lines promote dehiscence. Loss of turgor due to desiccation of these vacuolated cells, coupled with reduced resistance to deformation caused by a lower level of lignin deposition could be the major force triggering pod dehiscence in the dehiscent faba bean lines.

In other plant species, pod dehiscence has also been linked to differences in turgor of the inner sclerenchymatic cell layer, as a result of dehydration (Romkaew et al. 2008; Armon et al. 2011; Hofhuis et al. 2016). Murgia proposed that lignification of the internal valve layer (LFL) contributes to dehiscence in soybean (Murgia et al. 2017). By contrast, our results in faba bean indicate that the absence of LFL in line Vf27 and the lower level of lignification in other dehiscent lines could reduce the stability of the valve, triggering cell detachment and separation of the valves after desiccation.

4. Material and Methods

4.1. Plant material

A recombinant inbred line (RIL) population was used to determine the genomic regions associated with dehiscence. The population consists on 124 F8-F9 inbred lines obtained from the cross between the parental lines Vf6, an indehiscent equina type; and Vf27, a pod dehiscent, small seeded type (paucijuga), supposedly close to the putative wild faba bean progenitor (Cubero 1974; Vaz Patto et al. 1999). This population was previously used by our group to identify and validate QTLs controlling flowering and yield related traits (Cruz-Izquierdo et al. 2012). For the histological studies three additional dehiscent lines (335, 756 and 1068) from the IFAPA faba bean core collection were included in the analysis.

4.2. Phenotypic evaluation

The field evaluation was performed at Córdoba (Spain) along four agronomic seasons (2016/17, 2017/18, 2018/19 and 2019/2020). Meteorological data recorded for each agronomic season are summarized in **Supplementary Table 5**. The RIL population was sown in november using a complete randomized design, with three to five plants per genotype and two replications. Only in 2016/17 pods

from each line were evaluated twice in both, controlled and field condition. Mature pods were harvested and dried for 10 days at 20-40% relative humidity and 25°C (Weeden et al. 2002) and then led to the extreme drying in the greenhouse. For the field scoring, one stem per plant was covered in the field with an isolation holey bag until the pods were completely dry. In the remaining seasons, plants were evaluated for dehiscence in the field when pods were dry.

Four pod categories were established: (1) indehiscent, (2) "fissured," referring to pods with a fine open line between their valves but yet closed, (3) dehiscent with non-twisting valves, and (4) dehiscent with twisting valves. Because of the presence of intermediate cases in the same plant, in seasons 2017/18, 2018/19 and 2019/20, pod dehiscence was evaluated using three phenotypic traits: (1) percentage of opened pods, $OP = (\text{opened pods} / \text{total number of pods}) \times 100$, (2) percentage of fissured pods, $FP = (\text{fissured pods} / \text{the total number of pods closed and/or fissured}) \times 100$, excluding open pods, in an attempt to evaluate the trait independently and (3) percentage of dehiscent pods, $DP = (\text{opened and fissured pods} / \text{total number of pods}) \times 100$. In 2016/17 and 2019/20, dehiscence was only evaluated as the percentage of dehiscent pods, with no distinction between completely open and fissured pods. Mean values for each parental line and RIL were calculated for each trait and replicate. Normality tests were performed to evaluate whether the data were normally distributed. ANOVA tests for Genotype x Environment analyses were performed. All statistical data analyses were carried out using the R software version 3.6.1 (R Development Core Team 2018).

4.3. Dehiscence candidate genes and primer design

A candidate gene strategy (Pflieger et al. 2001) was applied for map enrichment and identification of functional candidates co-localizing with QTLs for dehiscence. Fifty one dehiscence-related genes were selected from different species (**Supplementary Table 2**): *Arabidopsis thaliana* (Gubert et al. 2014; Balanzà

et al. 2016; Ballester and Ferrándiz 2017; Chi et al. 2017; Tao et al. 2017; Ogutcen et al. 2018), *G. max* (Funatsuki et al. 2014), *S. lycopersicum* (Vrebalov et al. 2009) and *V. sativa* (Dong et al. 2017b). Gene sequences were used as queries for BLAST searches within closely related legume species such as *M. truncatula*, *C. arietinum* and *P. sativum*. Positive results were used to identify homologous sequences in an in-house faba bean transcriptome database developed by Ocaña et al. (2015). Primer design was run using Geneious software (v. 7.1.9; Biomatters, Auckland, New Zealand).

Orthologous gene sequences were aligned and when possible, primers were designed on *V. faba* sequences spanning an intron. Otherwise we used the sequence of related species to design primers with 20–25 nucleotides, GC content of 45–60%, and T_m of 60 ± 1 °C, yielding a PCR amplicon of 200 to 1000 bp. Markers developed in this study were named as the corresponding candidate gene preceded by the letters “Vf” (**Supplementary Table 3**).

In addition to these markers, a set of 163 markers from the Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) developed by Webb et al. (2016), were selected and genotyped in this population (**Supplementary Table 6**).

4.4. PCR amplification and polymorphism detection

Genomic DNA was isolated from young leaves using the CTAB procedure (Torres et al. 1993b). PCR amplification consisted of 25 µl reactions containing 4 ng template DNA, 1x PCR buffer, 2 mM of $MgCl_2$, 0.4 mM of dNTPs, 0.2 µM of each primer and 1 unit of Taq polymerase (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain). Amplification conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 45 sec at 94 °C, 45 sec at 56–60 °C and 45 sec at 72 °C, with a final extension step of 8 min at 72 °C. PCR products were separated using 2% agarose gels.

PCR amplification products lacking polymorphism between the parental lines were purified using a standard protocol (<https://www.thermofisher.com>) for DNA precipitation with sodium acetate and ethanol (1/10 3 M sodium acetate (pH 4.5), 2 v/v ethanol). Products were sequenced by Sanger at STABVIDA (Caparica, Portugal). Sequences were then aligned to detect SNPs using the Geneious software suite (v. 7.1.9; Biomatters, Auckland, New Zealand). Amplicons with recognition sites for restriction site polymorphism were converted into CAPS markers (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence) to genotype the whole RIL population. Restriction digestions were performed following the supplier's instructions and visualized in 2% agarose gels. For SNPs lacking restriction enzymes in the polymorphic site, internal primers were designed using the Tetra-Primer ARMS-PCR technique described by Medrano and de Oliveira (2014). In those cases where the internal primers did not yield amplification, the genotyping was carried out at CEGEN-PRB3-ISCI (III) (<http://www.cegen.org>) using the MassArray iPLEX (Sequenom) SNP typing platform from the Spanish National Genotyping Center facility of the University of Santiago de Compostela.

4.5. Genetic mapping and QTL analysis

Polymorphic markers genotyped in the RIL population were incorporated into a previous marker dataset (Cruz-Izquierdo et al. 2012) to develop a new linkage map. Segregating data were analyzed for goodness of fit to the expected 1:1 ratio using the chi-squared tests. Linkage analysis was performed using JoinMap v4.0 (Van Ooijen 2006) with the maximum likelihood option. Markers were grouped at a minimum LOD score of 3 and a maximum recombination fraction of 0.25. Recombination fractions were converted to centimorgans (cM) using the Kosambi mapping function (Kosambi 1943).

QTL analysis was conducted using MapQTL v5.0 (van Ooijen 2004). First, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to detect association between markers

and traits. Then, interval mapping (Lander and Botstein 1989; van Ooijen 1992) was performed to identify putative QTLs in each linkage group (LG). Markers significant at $P = 0.01$ were used as cofactors in the multiple QTL analysis (MQM) (Jansen 1993, 1994; Jansen and Stam 1994). QTL significance (P -value) was determined by permutation analysis using 1000 replicates (Churchill and Doerge 1994), as implemented in MapQTL 5.0. Only QTLs with a LOD higher than the P -value were declared as significant. MapChart software (Voorrips 2002) was used to represent the QTLs confidence interval. The support intervals were defined as LOD-1 and LOD-2 around the maximum LOD of QTL.

4.6. Histological sample preparation

Plant material was prepared according to the protocol described by Pérez-de-Luque et al. (2006). Mature pods (turning to brown) from parental lines were harvested and fixed in FAA (3.7% formaldehyde, 5% acetic acid and 50% alcohol). Proximal and distal edges were cut in transverse segments corresponding with the ventral and dorsal sutures of the pod (**Figure 5**). Samples were dehydrated in an increasing series of ethanol/water solution from 50% to 100% of ethanol, 12 h each, then transferred to an embedding solvent through xylene-ethanol series (30, 50, 80, 100% twice, 12 h each) and finally samples were saturated with paraffin (Paraplast plus; Sigma, Switzerland). After saturation the solution was replaced with melted paraffin and the samples were kept at 56 °C for 24h. This step was repeated twice in order to secure complete evaporation of xylene residues. Pod sections embedded in paraffin blocks were cut into 7 μ m-thick sections using a Leica RM2245 rotary microtome (Leica Microsystems, Germany) and attached to adhesive treated microscope slides (polysine slides; Menzel GmbH and Co KG, Braunschweig, Germany).

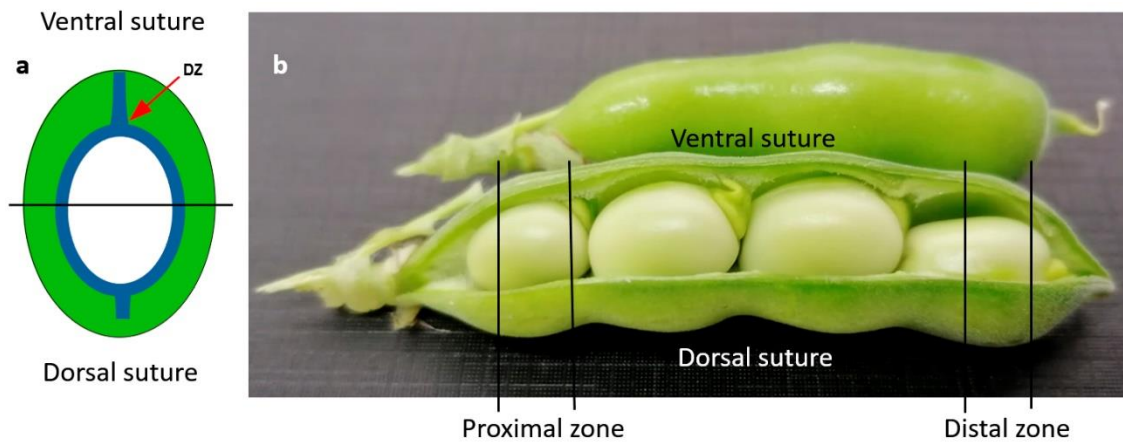


Figure 5. (a) Schematic representation of a pod transverse section. The blue line indicates lignin deposition. DZ, dehiscence zone. (b) Zones in pods where histological cuts were performed.

4.7. Staining procedure

Histochemical staining of the sections was carried out according to Ruzin (1999) with slight modifications (Pérez-de-Luque et al. 2006). Each slide was stained with 0.1% TBO (0.1 M citric acid and 0.1 M sodium citrate) for 20 min and washed with distilled water. Samples were then deparaffinized twice, with 100% xylene for 20 min and sealed with mounting medium (Entellan; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The sections were observed using a Nikon Eclipse 50i light microscope and photographs were taken through a Nikon DS-Fi1 digital optical device connected to a PC through the Nikon DS-U2 control unity (Nikon Instruments). Image analysis was performed using the ImageJ software (Schneider et al. 2012).

The area and perimeter of the lignified cell layer was measured in the left and right DZ regions. The percentage of lignin inside the cells was calculated as $(\text{total cell area} - \text{inner non-colored area}) / \text{total cell area} \times 100$, and was measured in 20 cells.

Acknowledgements

This research was supported by funding from projects RTA2017-00041 co-financed by ERDF and PP.AVA.AVA2019.030 by the Junta de Andalucía. DAB

acknowledges his Ph.D. fellowship INIA-CCAA. The authors are grateful to Dr. A. Di Pietro for critical reading of the manuscript, Dr. A. Pérez de Luque for valuable assistance in the histological analysis and for helpful comments and suggestions and Dr. N. Gutierrez and R. Muñoz for help with the phenotypic data collection.

Supplementary Material

Supplementary Table 1. ANOVA for Genotype (RIL) and Environment (Year) interaction. OP, opened pods; FS, fissured pods; DP, dehiscent pods. Signif. Codes: '****' $P < 0.001$, '***' $P < 0.01$ '**' $P < 0.05$.

OP	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
Year	1	170.6	170.597	5.2558	0.0235319*
RIL	122	7116	58.327	1.797	0.0005989****
Rep	1	101.6	101.604	3.1302	0.0792722
Year:RIL	100	6682.5	66.825	2.0588	6.59e-05****
Residuals	126	4089.8	32.459		

FS	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
Year	1	41770	41770	176.8411	<2.2E-016****
RIL	122	53887	442	1.87	0.0002736****
Rep	1	8	8	0.0357	0.8503931
Year:RIL	105	25840	246	1.0419	0.4110577
Residuals	126	29762	236		

DP	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
Year	4	48882	12220.5	47.577	<2.2E-016****
RIL	123	94718	770.1	2.998	3.708e-13****
Rep	1	595	595.3	2.3175	0.129303****
Year:RIL	389	144254	370.8	1.4437	0.001149****
Residuals	229	58820	256.9		

Supplementary Table 2. BLASTp results of dehiscent candidate genes against chickpea, *Medicago* and pea genomes.

Original plant	Gene	Protein accession	Chickpea protein accession	Cover.	E-value	Ident.	Chickpea mRNA accession	<i>Medicago</i> protein accession	Cover.	E-value	Ident.	<i>Medicago</i> mRNA accession	<i>Pisum</i> protein accession	Cover.	E-value	Ident.	<i>Pisum</i> mRNA accession	E-value	Ident.	<i>Vicia faba</i> transcriptome accession	
<i>A. thaliana</i>	<i>ADPG1</i>	NP_191310.1	XP_004513766.1	97%	8.00E-147	53.76%	XM_004513709.2	XP_013467524.2	98%	1.00E-154	54%	XM_013612070.2	AAK50769.1	64%	2.00E-66	38%	AF361321.1	2.00E-61	78%	Locus_33710_Transcript_1/1_Confidence_1_000_Length_481	
<i>A. thaliana</i>	<i>AG1</i>	NP_001266181.1	XP_004485955.1	100%	3.00E-128	73.41%	XM_004485898.3	XP_003629877.1	95%	4.00E-121	72%	XM_003629829.3		671/735 (1178)	0.00E+00	91%	Psat7g066560.7	2.00E-122	78%	Locus_29687_Transcript_1/1_Confidence_1_000_Length_823	
<i>A. thaliana</i>	<i>ALC</i>	NP_201512.1	XP_012574448.1	71%	2.00E-34	53.80%	XM_012718994.2	XP_003589168.2	36%	6.00E-34	79%	XM_003589120.3									
<i>A. thaliana</i>	<i>AP1</i>	NP_177074.1	XP_004509754.1	99%	6.00E-122	72.83%	XM_004509697.3	XP_003628742.1	99%	2.00E-120	72%	XM_003628694.2									
<i>A. thaliana</i>	<i>AP2</i>	NP_001190938.1	XP_004511904.1	72%	2.00E-127	68.27%	XM_004511847.3	XP_003611692.1	71%	7.00E-132	70%	XM_003611644.3									
<i>A. thaliana</i>	<i>AP3</i>	NP_191002.1	XP_004500961.1	99%	5.00E-86	55.36%	XM_004500904.3	XP_003612101.1	93%	4.00E-65	49%	XM_003612053.3	AEW43603.1	93%	5.00E-67	49%	JN412098.1				
<i>A. thaliana</i>	<i>AS1</i>	NP_181299.1	XP_004492353.1	98%	4.00E-165	66.85%	XM_004492296.3	XP_003623127.1	98%	2.00E-165	68%	XM_003623079.3	AAG10600.1	98%	1.00E-167	68%	AF299140.2	0	87%	Contig21947	
<i>A. thaliana</i>	<i>AS2</i>	NP_001077777.1	XP_004511083.2	98%	3.00E-74	59.21%	XM_004511026.3	XP_013445108.1	98%	6.00E-79	60%	XM_013589654.2						4.00E-127	91%	Locus_23082_Transcript_1/1_Confidence_1_000_Length_643	
<i>A. thaliana</i>	<i>BP</i>	NP_192555.1	XP_004498934.1	76%	8.00E-153	73.19%	XM_004498877.3	XP_013465932.1	81%	1.00E-155	71%	XM_013610478.2	AAC32262.1	66%	3.00E-92	57.99%	AF063307.1	0	96%	contig03043	
<i>A. thaliana</i>	<i>FUL</i>	NP_568929.1	XP_004508656.1	97%	6.00E-104	67.93%	XM_004508599.3	XP_013464090.2	97%	9.00E-105	65%	XM_013608636.2						4.00E-98	92%	Vs_171720	
<i>A. thaliana</i>	<i>HEC1</i>	NP_001332428.1	XP_004509135.1	62%	3.00E-52	68.53%	XM_004509078.3	XP_024627548.1	39%	4.00E-46	76%	XM_024771780.1									
<i>A. thaliana</i>	<i>HEC2</i>	NP_190602.1	XP_004511923.1	54%	2.00E-58	68.94%	XM_004511866.3	XP_003611730.1	80%	2.00E-48	56%	XM_003611682.2							0	82%	Contig22772
<i>A. thaliana</i>	<i>IND</i>	NP_191923.1	XP_004504117.1	49%	1.00E-44	75.51%	XM_004504060.2	XP_024627548.1	45%	6.00E-46	79%	XM_024771780.1	ABD59338.1	24%	3.00E-06	40%	DQ399528.1				
<i>A. thaliana</i>	<i>IRX3</i>	NP_197244.1	XP_004507755.1	100%	0	85.38%	XM_004507698.3	XP_003594882.2	99%	0.0	65%	XM_003594834.3						2.00E-124	76%	Contig23463	
<i>A. thaliana</i>	<i>JAG</i>	NP_177015.3	XP_004497087.1	80%	9.00E-36	40.74%	XM_004497030.3	XP_024630922.1	80%	3.00E-35	45%	XM_024775154.1		694/891 (1346)	0	78%	Psat6g227440.1				
<i>A. thaliana</i>	<i>LATE</i>	NP_001318765.1	XP_012575102.1	32%	6.00E-14	59.65%	XM_012719648.2	RHN42358.1	30%	1.00E-14	60%		AWJ95166.1		8.00E-06	37%	MF03127.1				
<i>A. thaliana</i>	<i>NACO12</i>	NP_174554.1	XP_004514929.1	82%	1.00E-100	51.19%	XM_004514872.3	XP_013444555.1	84%	3.00E-110	49%	XM_013589101.2		1209/1323 (1703)	0	91%	Psat4g215440.1				
<i>G max</i>	<i>PDH1</i>	XP_014634029.1	XP_004503651.1	100%	3.00E-109	82.18%	XM_004503594.3	XP_013447143.1	100%	3.00E-110	86%	XM_013591689.2		420/546 (574)	3.00E-109	77%	Psat7g029960.1				
<i>A. thaliana</i>	<i>PI</i>	NP_197524.1	XP_004498359.2	97%	1.00E-85	61.72%	XM_004498302.3	XP_013461314.2	80%	2.00E-74	65%	XM_013605860.2						3.00E-118	81%	Contig18343	
<i>A. thaliana</i>	<i>PID</i>	NP_181012.1	XP_004485993.1	98%	0	65.57%	XM_004485936.3	XP_003630022.1	97%	0	66%	XM_003629974.3		1186/1395 (1813)	0	85%	Psat7g060200.1				
<i>A. thaliana</i>	<i>PIN</i>	NP_177500.1	XP_004512743.1	100%	0	72.32%	XM_004512686.3	XP_003619829.1	100%	0	71%	XM_003619781.3	AAO38045.1	100%	0	71%	AV222857.1	3.00E-67	76%	Locus_9310_Transcript_2/5_Confidence_0.733_Length_2583	
<i>A. thaliana</i>	<i>RPL</i>	NP_195823.1	XP_004507197.1	75%	7.00E-125	51.69%	XM_004507140.3	XP_013454907.1	75%	6.00E-125	52%	XM_013599453.2						8.00E-103	79%	Contig7334	
<i>A. thaliana</i>	<i>Sep-01</i>	NP_001119230.1	XP_004491904.1	100%	3.00E-132	73.76%	XM_004491847.3	XP_003621519.2	100%	8.00E-132	73%	XM_003621471.3						0	91%	ENA_HX911218_HX911218.1	
<i>A. thaliana</i>	<i>Sep-03</i>	NP_850953.1	XP_004504397.1	97%	3.00E-127	76.02%	XM_004504340.3	XP_024628949.1	97%	2.00E-126	78%	XM_024773181.1						0	93%	ENA_HX906124_HX906124.1	
<i>A. thaliana</i>	<i>SHR1</i>	NP_191437.1	XP_004513719.1	96%	6.00E-119	71.67%	XM_004513662.3	XP_024636027.1	99%	2.00E-119	71%	XM_024780259.1						7.00E-102	64%	Locus_33710_Transcript_1/1_Confidence_1_000_Length_481	
<i>A. thaliana</i>	<i>SPT</i>	NP_568010.1	XP_027189239.1	39%	5.00E-42	59.87%	XM_027333438.1	XP_003611714.1	55%	1.00E-50	52%	XM_003611666.3						7.00E-149	94%	Contig15583	
<i>A. thaliana</i>	<i>STK</i>	NP_001319889.1	XP_004499566.1	71%	8.00E-115	73.93%	XM_004499509.3	XP_003598055.1	71%	8.00E-115	74%	XM_003597987.3	AAD25355.1	100%	2.00E-98	80%	AF115574.1				
<i>S. lycopersicum</i>	<i>TAGL1</i>	NP_001300859.1	XP_004513719.1	89%	2.00E-107	67.36%	XM_004513662.3	XP_024636027.1	91%	1.00E-107	67%	XM_024780259.1		670/739 (1044)	0	91%	Psat5g197560.2				
<i>A. thaliana</i>	<i>YAB3</i>	NP_567154.1	XP_004506104.1	92%	6.00E-81	66.82%	XM_004506047.3	XP_013455085.1	89%	4.00E-77	65%	XM_013599631.2		627/668 (1141)	0	94%	Psat7g238960.1				
<i>V. sativa</i>	c108180			57%	2.00E-164	85.29%	XM_004511599.3		67%	0	87%	XM_003611210.3		554/586 (1959)	0	95%	Psat2g179080.1				
<i>V. sativa</i>	c109132			3%	1.5	66.04%	XM_004498425.3		3%	4.00E-10	69%	XM_013610803.2									
<i>V. sativa</i>	c111669			76%	0	80.08%	XM_004505268.3		74%	0	83%	XM_003607797.3									
<i>V. sativa</i>	c113420			90%	0	82.87%	XM_004513709.2		81%	0	86%	XM_013612070.2		1279/1365 (1672)	0	94%	Psat6g086440.1				
<i>V. sativa</i>	c114405			83%	0	85.95%	XM_001279135.1		74%	0	87%	XM_013601139.2		996/996 (996)	0	100%	Psat7g179640.1				
<i>V. sativa</i>	c115918			93%	0	90.23%	XM_027336299.1		98%	0	91%	XM_013588863.2		1581/1646 (2088)	0	96%	Psat4g199720.1	0	97%	Contig23253	
<i>V. sativa</i>	c116185			51%	0	89.40%	XM_001279187.1		52%	0	91%	XM_003613801.3		613/637 (1220)	0	96%	Psat2g117800.2	0	87%	Contig3108	
<i>V. sativa</i>	c117969			23%	2.00E-66	83.80%	CP039332.1		86%	0	83%	XM_003618769.3									
<i>V. sativa</i>	c118965			81%	0	88.59%	XM_004512681.3		80%	0	89%	XM_013587228.2									
<i>V. sativa</i>	c119322								83%	0	84%	XM_003597946.3		837/937 (1141)	0	89%	Psat1g003280.1				
<i>V. sativa</i>	c119513			78%	0	84.65%	XM_004509361.3		85%	0	86%	XM_003629143.3									
<i>V. sativa</i>	c119843			67%	0	79.48%	XM_027335265.1		81%	0	83%	XM_003607271.3		920/1000 (1422)	0	92%	Psat7g180280.1	0	94%	Contig4047	
<i>V. sativa</i>	c120726			78%	0	89.17%	XM_004489140.3		84%	0	89%	XM_013595278.2		1016/1071 (1274)	0	95%	Psat1g053480.1	0	96%	Contig4135	
<i>V. sativa</i>	c120857			79%	0	87.08%	XM_004499908.3		77%	0	89%	XM_013604150.2									
<i>V. sativa</i>	c122297			12%	2.00E-29	78.50%	XM_004514996.3		89%	0	86%	XM_003598965.2									
<i>V. sativa</i>	c122714								11%	0.76	66%	XM_024779517.1									
<i>V. sativa</i>	c123357			77%	2.00E-98	71.84%	XM_004517249.3		86%	0	83%	XM_013612646.2		658/731 (918)	0	90%	Psat6g071640.1				
<i>V. sativa</i>	c124154			79%	0	84.56%	XM_004495161.3		80%	0	85%	XM_003590617.3									
<i>V. sativa</i>	c126514			74%	0	81.51%	XM_004491047.3		63%	0	82%	XM_003616858.3									
<i>Vicia sativa</i>	c127417			45%	0	86.17%	XM_004498459.3		83%	0	87%	XM_003588473.3									
<i>Vicia sativa</i>	c128287			61%	0	86.97%	XM_004501040.3		64%	0	83%	XM_013606594.2									
<i>Vicia sativa</i>	c128596						80%	0	83.67%		XM_027336134.1			83%	0	87%	XM_024782319.1			1105/1245 (8815)	

Supplementary Table 3. Primer sequences developed for the amplification of dehiscence candidate genes in faba bean, annealing temperature, product size, type of marker and restriction endonucleases or genotyping platform used.

Marker	Forward Sequence (5' -> 3')	Reverse Sequence (5' -> 3')	Ta (°C)	PCR product size (bp)	Marker type
Vf_ADPG1	CAGGAAGTGCAAGCAACATCAAAT	ACACATTCCCTTATCTGAACAGCTGA	56	200	SNP / Cegen
Vf_AG1	GGCAAATGATGGGTGAAGCTTT	GAGAGTCGAATTGTTGCTGAG	58	650	CAPS / <i>Lwel</i>
Vf_ALC	GCATGGAATTGAGTGACGGAAAC	GTTTTGGAAGCATGGCAAACCTC	58	680	CAPS / <i>Ndel</i>
Vf_AP1	ATGGAGAAGATATTGGAGCGCT	TCTGCTCCTGAATCACTTTCTCC	56	350	Internal
Vf_AP2	TTTACAGAAGAACAGGTCGATGGG	GCCTAAGAATTGACCCATACGAG	58	800	-
Vf_AP3	AAGGTCTCACTCATCATGTTCTCC	CACCTTCACTACTCTATGCCT	60	420	CAPS / <i>NmuCI</i>
Vf_AS1	TCAGTGACATTAAGCCTCTCTCC	GATAGGA-TATTAATAGGCAGGCATC	58	690	-
Vf_AS2	CCGCTCTAGGGTTTCTTAATGTTA	CTACTCGAGCTTTGACTGATGAACA	58	800	CAPS / <i>Cfr13I</i>
Vf_BP	GGACAACAACAACAACATGGAGG	GCTCTTTCAAGGGTTGGAGAGT	58	540	CAPS / <i>HphI</i>
Vf_FUL	CATGCAAAACTGAAAGCTAGGGTG	GCAAATTGTTATGTTCTGGAGTGC	60	680	CAPS / <i>Acil</i>
Vf_HEC1	AGAGAAATGATATTCCGTATGGCGG	CTAAGCATTGTTTGAAGTGGGAC	58	370	-
Vf_HEC2	CGATAAGAAGAACTCAATGGCTGC	TAACCATTCTGAAACCCAACA	56	680	SNP / Cegen
Vf_IRX3	CATTACATAAACAACAGCAAGGCC	TCCTCTAGACTAAAGATGGGCACA	60	760	CAPS / <i>SspI</i>
Vf_JAG	TGCCTGATGAATACTCTCGAGATCA	TTCTGAAGACTAACTGACGAGCATG	58	880	SNP / Cegen
Vf_LATE	GCTAGGCTCAAACAACTCTTACC	GGCTTAATCCAAGTGCAGACTGAA	58	480	CAPS / <i>Hpy99I</i>
Vf_NAC012	CACAAAGACAAGAAGTATCCAACCG	CCATGCTTGTGATTTGGACTCTC	58	650	SNP / Cegen
Vf_PI	ACTCAAGCAACAGACAAGTAACCTA	GGCATCCTCAAGAGACATAAGCT	60	700	CAPS / <i>Hinfl</i>
Vf_PID	GCTGTGGCATTGAAGAAGAAAGTAC	GATGAATATTCCAAACGACCACCAG	58	700	CAPS / <i>Afal</i>
Vf_PIN	AGGATGCTAAGGAGTTGCACATG	AATGCAACAAGAGACCAAACGAGG	58	630	CAPS / <i>Acil</i>
Vf_RPL	TCCGTATGCAAGTTTGGCGATAA	GGTTTCAAAGCCTTACTCTCGC	58	800	CAPS / <i>Tail</i>
Vf_SEP1	CAGAAGTGTAGTTATGGTGCTGTTG	CCTAACATGCTTCAGAGATGAATCC	62	450	CAPS / <i>ApoI</i>
Vf_SEP3	AGCATGCTCAAACACTAGAGAGG	TATTCCTGTTGGCTGCTTAACTCC	58	400	Internal
Vf_SHP1	CAGTGTGAAAGCTTCTATTGAGAGG	GCTATTATGCAACTCTATCTCTGT	58	750	CAPS / <i>DraI</i>
Vf_SPT	TGGTTATAGCTTGCATCCAGTGTC	GAAGAGTTTTCCAGTCCTTGTG	58	380	CAPS / <i>MboI</i>
Vf_STK	CAGCACTACCACTGAAATTAACGCT	CAATTCAGCAAGTAGCATCTCATG	56	600	CAPS / <i>AccI</i>
Vf_TAGL1	CATGTGCTGCTTCTACTAATGCAG	CCTCAGACTCAAAGATCCAAGAGC	58	350	-
Vf_YAB3	CAATTTCTGCGACACTGTTCTCG	GAAGGTGCATTTGCAATTTCTCC	58	500	CAPS / <i>HhaI</i>
Vf_c108180	GAGCAACATTGACAATCTATCCTTG	ATGGCAGCTACATGGAGGTTTT	58	500	-
Vf_c111669	GCATGTTAATTCTGGGAAAGGGAC	GGCACGCACCACTTTTTTGAA	58	1000	CAPS / <i>EcoRI</i>

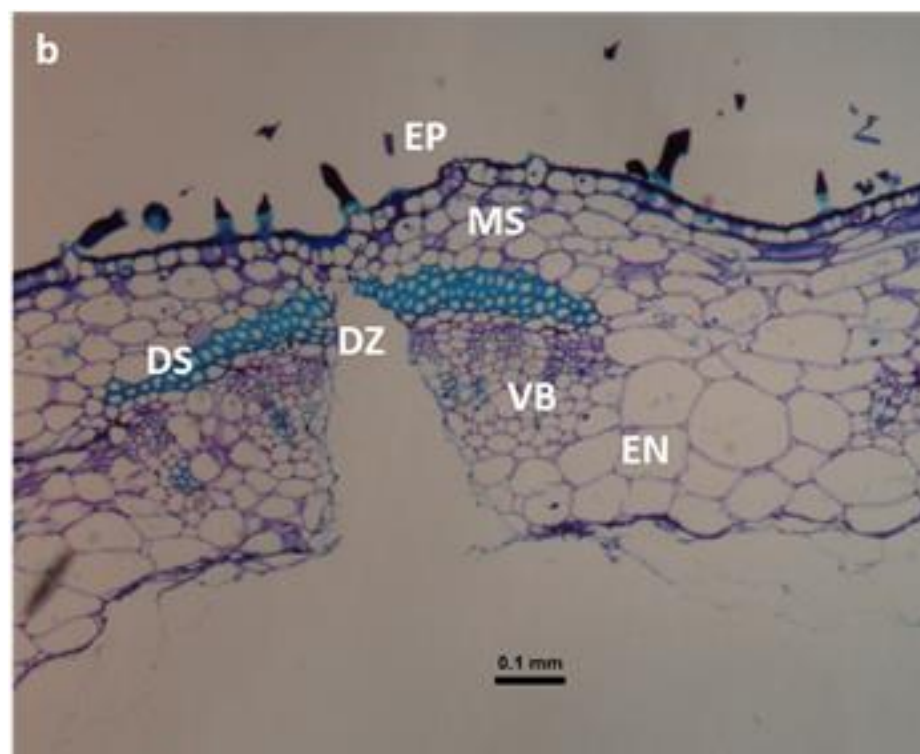
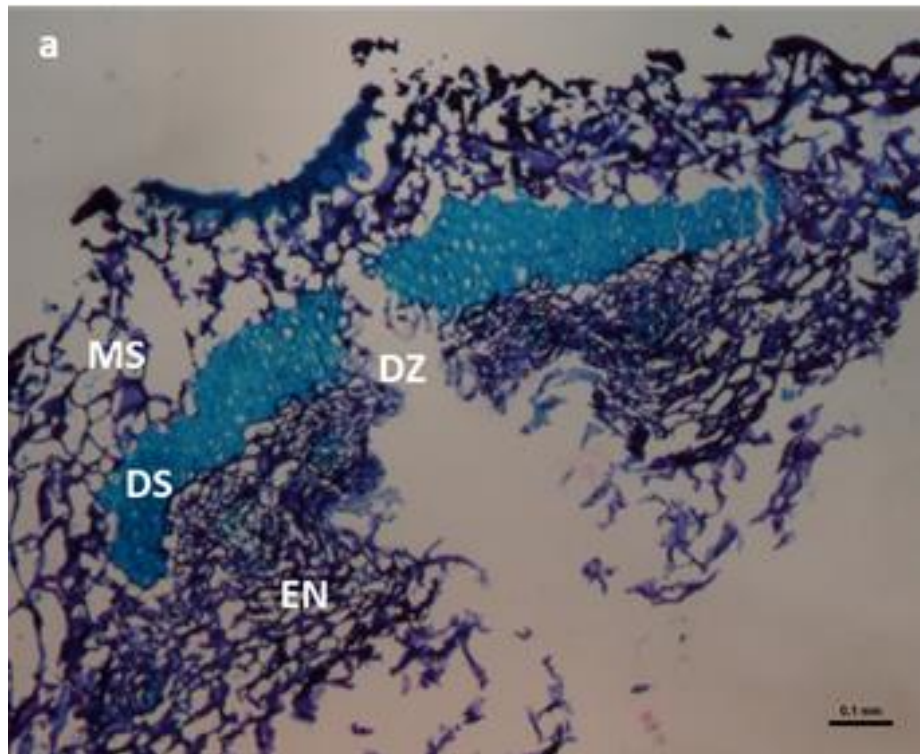
Vf_c115918	CTATACTCAGTGGGCAGCACATAT	GTCCAAGCTTCTGTCCACATCTT	58	650	SNP / Cegen
Vf_c116185	TCACTTTTGCTGACTACGGAGGT	GA-ACTATTCCAGCCTTGATTGAGC	58	450	CAPS / <i>Ddel</i>
Vf_c117969	CCATCATACCCTTTTCTTCTCTCC	GAAACCTATCCATAACATCACACC	58	800	SNP / Cegen
Vf_c118965	GTTCCGTAACGTTCTTGATGTAA	CTGCTGCTGTTCAAAGATACAGAC	58	1000	CAPS / <i>AluI</i>
Vf_c119322	TCACTGCCATTTCTTCCAACCT	AAAGCTCCTCTCCACTGACTAATTC	58	200	-
Vf_c119513	CTTCCAGTAATC-ACATCATGGCTTG	GTCCGAACAAAATGTACAAGGAGAC	58	340	CAPS / <i>BseI</i>
Vf_c119843	CAAAAGGTATTGGTGAATGCGT	CACCCACTCTCAGACACAACATCT	58	600	CAPS / <i>Hinfl</i>
Vf_c120726	TAACCTTATCCTTGCTGCTGAGGA	TAATGCTGTCTTTCCTTCTCCGC	58	730	Internal
Vf_c120857	ATCCCTCTCTCCAATGTTTGTC	CGATATGTCACAATTTGGCTCCTC	58	430	CAPS / <i>HaeIII</i>
Vf_c124154	ATTCTCCAAGTATACCTCCAATC	GGAAGACGTTTTATCAGTCCAATCC	58	770	CAPS / <i>TaqI</i>
Vf_c126514	TGCGGCCGTAGTTTATCCTATG	ATTCACACAACATGCATCACCCA	58	470	CAPS / <i>MseI</i>
Vf_c127417	CTTGATACCCACAATGTTGCAG	CATGACCACCTTCCACACCTCTT	58	930	CAPS / <i>AfaI</i>
Vf_c128287	GGCCTATTTCTGTAAGCTATGGAAC	TGTTTTAGCTTACAGGCATGG	58	710	CAPS / <i>Ddel</i>
Vf_c128596	AGATATGGCCGAGAGATTAAGC	ATGAATTCCTACGTGTTTGTGACC	58	570	CAPS / <i>NmuCI</i>

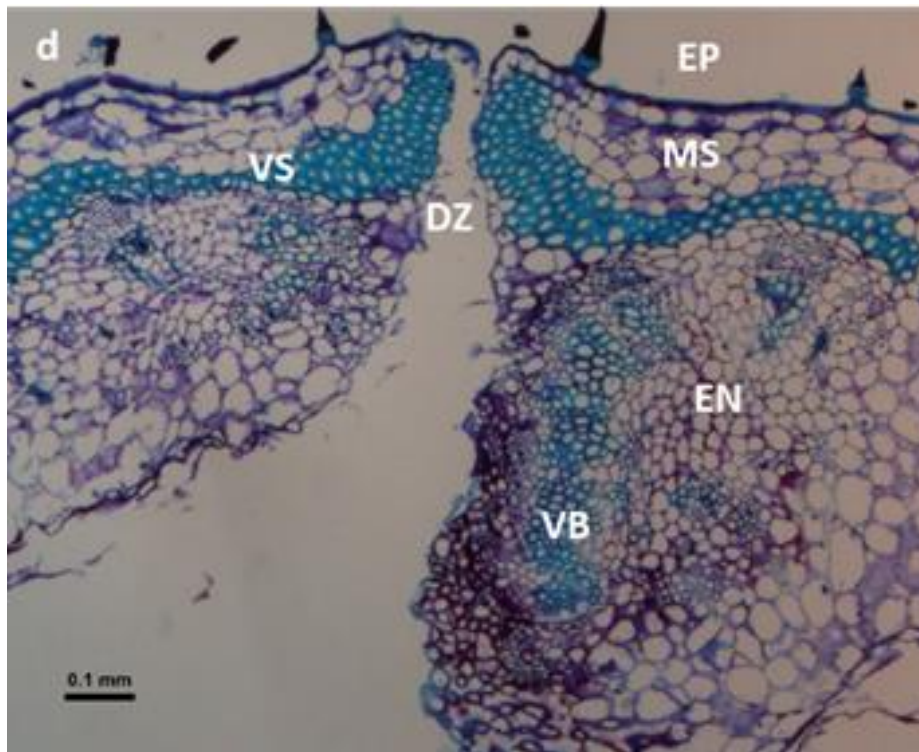
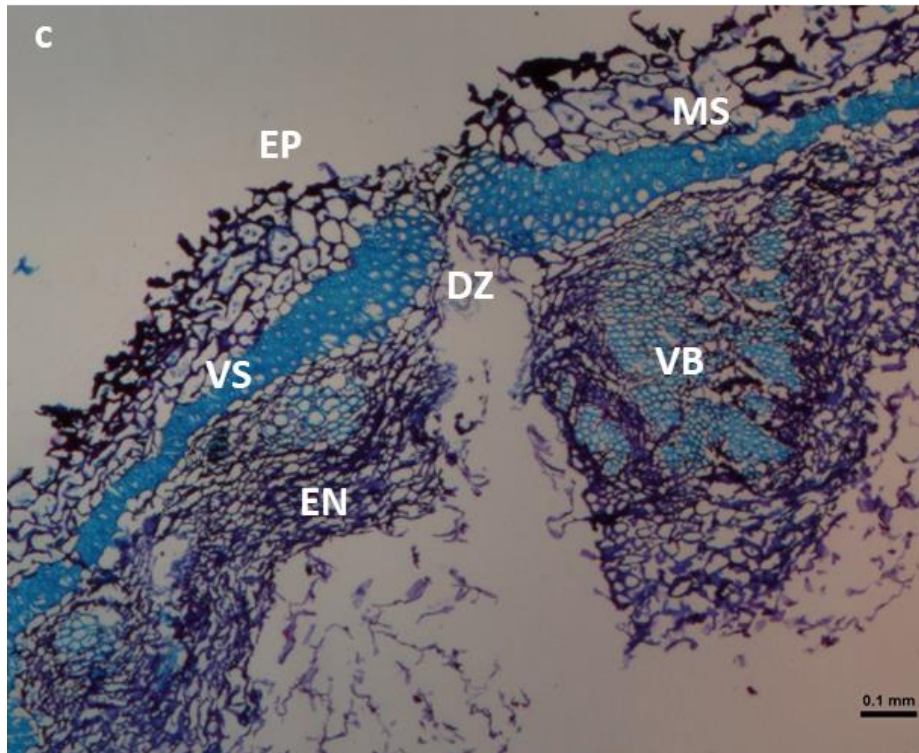
(-): No polymorphism detected

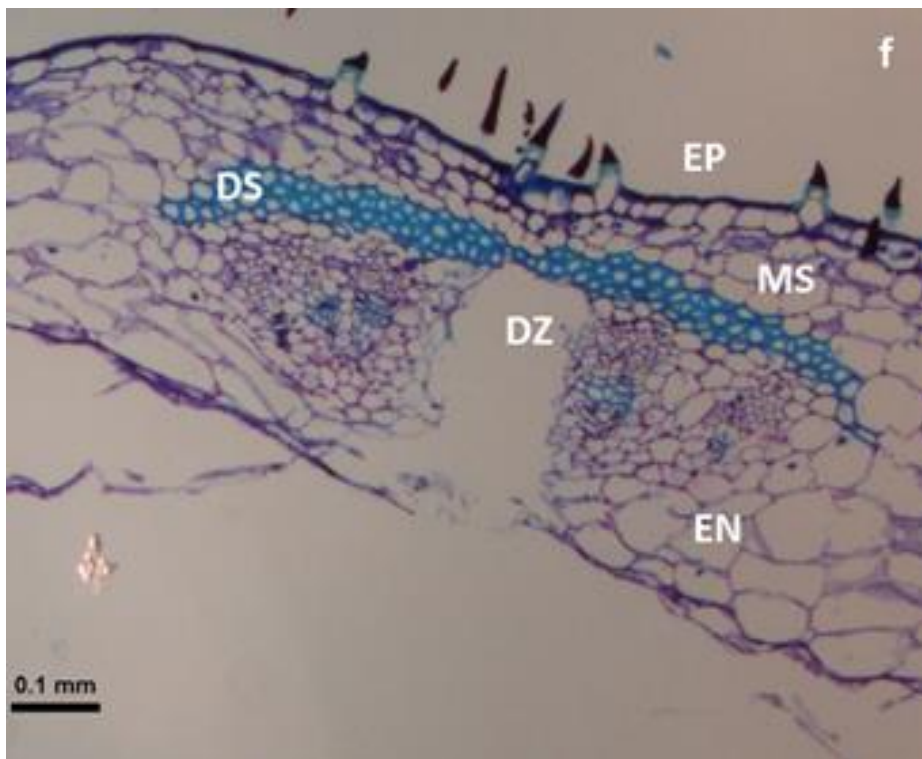
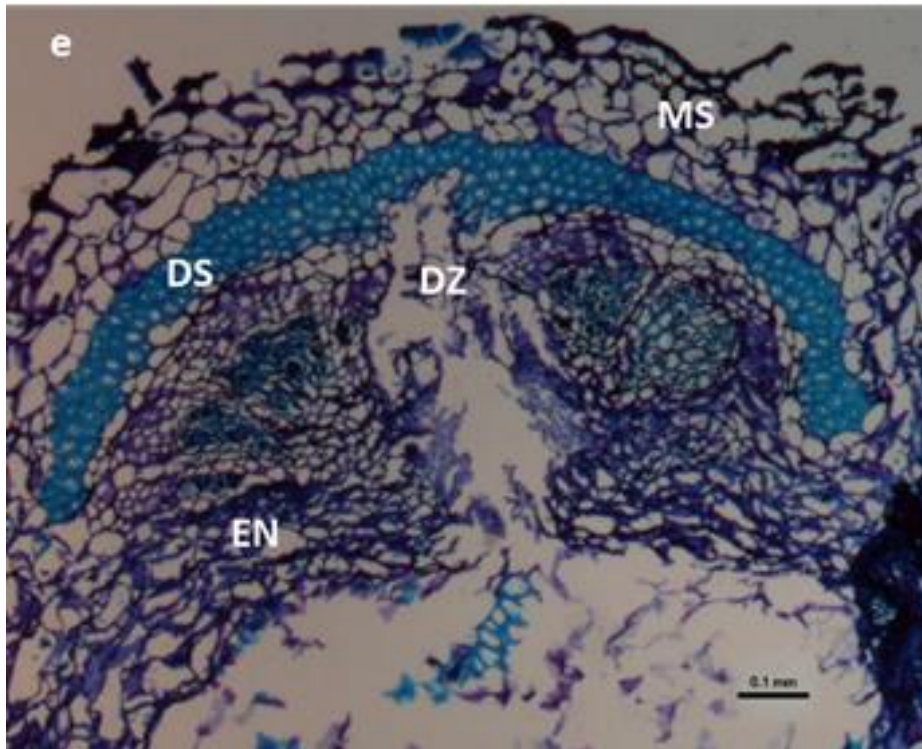
Supplementary Table 4. BLASTp results of flanking markers.

Marker	At gene	Gene description	Query	E-value	Identity
Vf_Mtr3g104700	AT4G33080	AGC (cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C) kinase family protein	99%	0	79.57%
Mtr4g100510	AT2G35680	Phosphotyrosine protein phosphatases superfamily protein	91%	1.00E-128	61.89%
Mtr8g085280	AT4G13750	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein	99%	0	43.03%

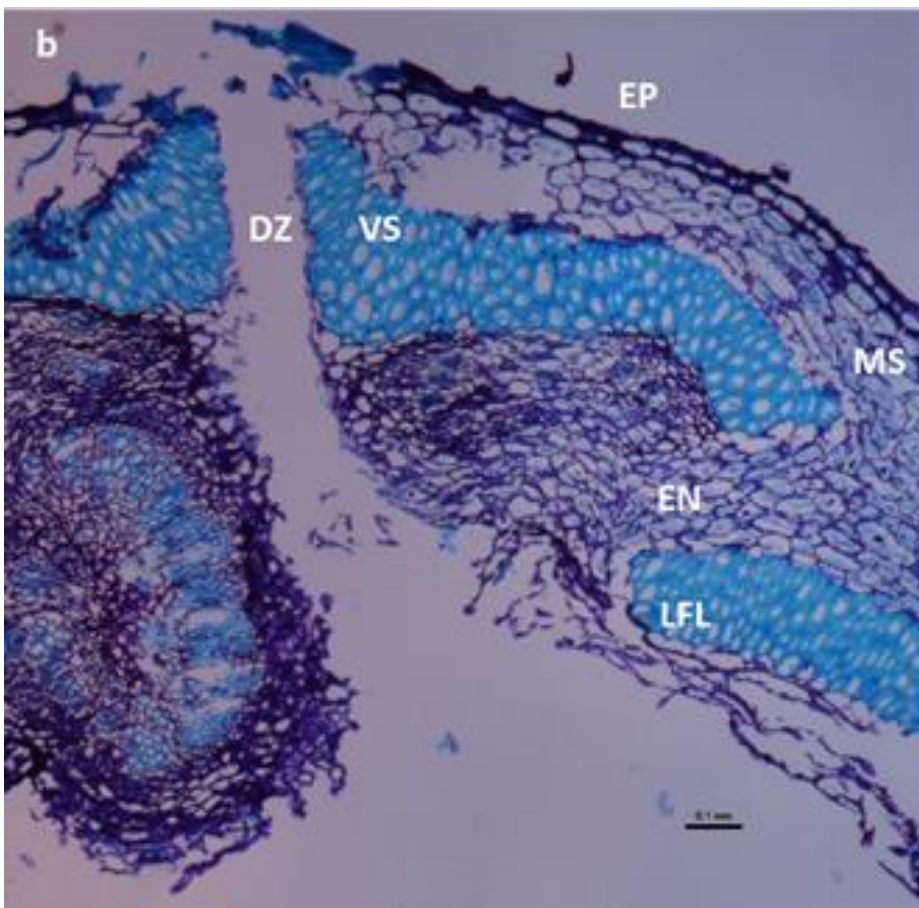
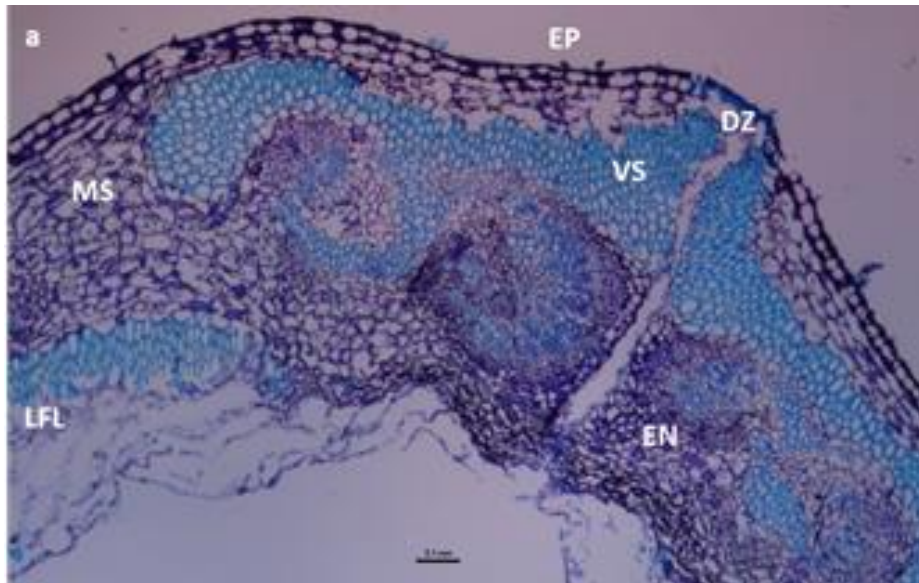
Supplementary Figure 1. Histological analysis of transverse sections from faba bean pods. Distal zone, dorsal suture in Vf6 (a) and Vf27 (b); proximal zone, ventral suture of Vf6 (c) and Vf27 (d); and proximal zone, dorsal suture of Vf6 (e) and Vf27 (f). DZ, dehiscence zone; EP, epidermis; MS, mesocarp; VS, ventral sheath; DS, dorsal sheath; VB, vascular bundle; EN, endocarp.

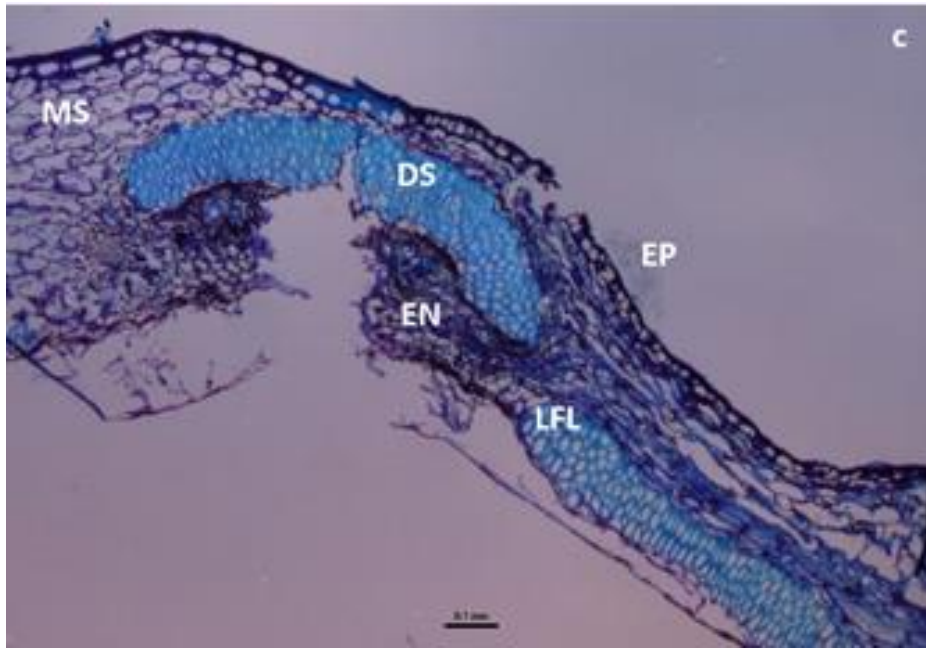






Supplementary Figure 2. Histological transversal cuts from dehiscent faba bean pods. Proximal zone, ventral suture in line 1068 (a); distal zone, ventral suture in line 335 (b); distal zone, dorsal suture in line 756-3 (c). Bars: 0.1 mm. DZ, dehiscence zone; EP, epidermis; MS, mesocarp; VS, ventral sheath; DS, dorsal sheath; EN, endocarp, LFL, lignified fibre layer.





Supplementary Table 5. Meteorological data for drying pod months. Rad, Radiation; ET, Evapotranspiration.

Year	Month	Max T (°C)	Min T (°C)	Average T (°C)	Max Hum (%)	Min Hum (%)	Average Hum (%)	Wind Speed (m/s)	Rad (MJ/m² day)	Precip (mm)	ET (mm/day)
2017	May	28.4 ± 3.8	13.3 ± 2.7	20.7 ± 2.7	90.4 ± 8.7	29.9 ± 12.5	59.6 ± 12.3	1.7 ± 0.8	25.8 ± 5.7	1.5 ± 4.6	5.4 ± 1.1
	June	35.9 ± 3.8	18.4 ± 2.5	27.4 ± 2.9	74.7 ± 10.8	18.5 ± 5.7	40.9 ± 6.7	1.9 ± 0.6	29.3 ± 1.6	0.3 ± 1.7	7.5 ± 0.6
2018	May	25.6 ± 2.7	11.6 ± 2.7	18.3 ± 2.2	94.4 ± 7.3	35.3 ± 10	65.9 ± 10.9	1.6 ± 0.6	23.9 ± 4.5	0.5 ± 1.9	4.7 ± 0.9
	June	31.1 ± 5.2	16.1 ± 2.4	23.5 ± 3.7	84.8 ± 8	29.7 ± 10.9	55.8 ± 10.6	1.9 ± 0.6	25.9 ± 5.4	0.1 ± 0.5	6.2 ± 1.4
2019	May	30.7 ± 3.6	12.6 ± 1.8	21.9 ± 2.5	84.9 ± 10.9	20.9 ± 9.9	48.4 ± 12.8	1.3 ± 0.8	25.6 ± 7.9	0 ± 0	5.8 ± 1.3
	June	32.4 ± 3.3	14.7 ± 3.1	23.9 ± 2.5	76 ± 8.4	19.2 ± 6	43.5 ± 7.3	2.1 ± 0.6	29.4 ± 2.5	0 ± 0	7.2 ± 0.7
2020	May	29.4 ± 5.4	13.8 ± 2.2	21.2 ± 3.7	92.6 ± 9.7	30.5 ± 11.3	63.1 ± 13.8	1.3 ± 0.6	25.3 ± 5.3	0.8 ± 1.8	5.2 ± 1.2
	June	32.7 ± 4.4	15.4 ± 2.4	24.4 ± 3.2	78.1 ± 8.4	23.3 ± 7.8	47.6 ± 8.9	2.3 ± 0.9	29 ± 2	0 ± 0	7.1 ± 0.7

Supplementary Table 6. List of KASP markers genotyped in RIL population Vf6 x Vf27. M: monomorphic marker; P: polymorphic marker.

KSNP NUMBER	Marker		KSNP NUMBER	Marker	
1721968277	Vf_Mt1g050730_001	M	1707751333	Vf_Mt4g083970_001	M
1858530407	Vf_Mt1g073000_001	M	1111882840	Vf_Mt4g085880_001	M
1910719638	Vf_Mt1g079520_001	M	1996788626	Vf_Mt4g085890_001	M
1651575609	Vf_Mt1g079870_001	M	1484901860	Vf_Mt4g085900_001	M
1799565368	Vf_Mt1g079930_001	M	1863846602	Vf_Mt4g086640_001	P
1058543789	Vf_Mt1g080150_001	M	1977281618	Vf_Mt4g087420_001	M
1775821253	Vf_Mt1g081290_001	M	1493184311	Vf_Mt4g087540_001	M
1192300098	Vf_Mt1g082210_001	M	1381022177	Vf_Mt4g087590_001	P
1344350990	Vf_Mt1g082420_001	M	1339969237	Vf_Mt4g087630_001	M
1002541787	Vf_Mt1g082580_001	P	1083522872	Vf_Mt4g088010_001	M
1327803439	Vf_Mt1g083230_001	M	1864663818	Vf_Mt4g091530_001	M
1081421775	Vf_Mt1g083450_001	M	1777130027	Vf_Mt4g092750_001	M
1957189487	Vf_Mt1g083460_001	M	1907508221	Vf_Mt4g092800_001	M
1398959816	Vf_Mt1g083960_001	M	1792616149	Vf_Mt4g092850_001	P
1480682021	Vf_Mt1g085040_001	M	1891182093	Vf_Mt4g093600_001	P
1533481092	Vf_Mt1g086810_001	M	1528743750	Vf_Mt4g093990_001	M
1173855348	Vf_Mt1g087900_001	M	1378063091	Vf_Mt4g128750_001	M
1054145479	Vf_Mt1g089980_001	M	1839346844	Vf_Mt4g128840_001	M
1346638090	Vf_Mt1g094870_001	M	1939244890	Vf_Mt4g130700_001	M
1676736579	Vf_Mt1g095140_001	P	1858050519	Vf_Mt4g131830_001	M
1005888465	Vf_Mt1g095530_001	M	1253706856	Vf_Mt4g132020_001	P
1243268575	Vf_Mt1g099390_001	M	1270881468	Vf_Mt4g132300_001	P
1414137428	Vf_Mt1g099390_002	P	1208901245	Vf_Mt4g133070_001	M
1723087950	Vf_Mt1g100180_001	M	1112546082	Vf_Mt5g021170_001	M
1499151664	Vf_Mt1g100980_001	M	1539118764	Vf_Mt5g022580_001	P
1942911040	Vf_Mt1g101520_001	P	1416797289	Vf_Mt5g022700_001	M
1007727826	Vf_Mt1g101840_001	P	1885608080	Vf_Mt5g023210_001	M
1493657837	Vf_Mt1g102430_001	M	1852706711	Vf_Mt5g024730_001	M
1923110801	Vf_Mt1g105040_001	M	1529126210	Vf_Mt5g024900_001	M
1675931078	Vf_Mt1g116110_001	M	1337048384	Vf_Mt5g025470_001	M

1136816025	Vf_Mt1g116230_001	M	1883474441	Vf_Mt7g073340_001	P
1326233096	Vf_Mt1g116810_001	M	1323427004	Vf_Mt7g073970_001	P
1355576622	Vf_Mt3g086980_001	P	1742551095	Vf_Mt7g075940_001	M
1464559498	Vf_Mt3g087760_001	M	1221776980	Vf_Mt7g078730_001	M
1397002075	Vf_Mt3g088610_001	M	1332345791	Vf_Mt7g078800_001	M
1199410003	Vf_Mt3g090490_001	M	1567164369	Vf_Mt7g079680_001	M
1909665243	Vf_Mt3g090670_001	M	1447683142	Vf_Mt7g079840_001	M
1324040588	Vf_Mt3g091190_001	P	1028278339	Vf_Mt7g080040_001	M
1204061824	Vf_Mt3g091380_001	M	1378730139	Vf_Mt7g080250_001	M
1952231569	Vf_Mt3g091460_001	M	1602645324	Vf_Mt7g081010_001	M
1685167778	Vf_Mt3g091770_001	M	1767675844	Vf_Mt7g081260_001	M
1869785197	Vf_Mt3g091780_001	M	1695506577	Vf_Mt7g083230_001	M
1331946554	Vf_Mt3g091840_001	M	1886939595	Vf_Mt7g084010_001	M
1118195708	Vf_Mt3g092090_001	M	1509886420	Vf_Mt7g084590_001	P
1286088032	Vf_Mt3g092310_001	M	1198350329	Vf_Mt7g085090_001	M
1701633635	Vf_Mt3g092460_001	M	1949373706	Vf_Mt7g086430_001	P
1994334164	Vf_Mt3g092810_001	M	1486389747	Vf_Mt7g098440_001	M
1992529901	Vf_Mt3g092990_001	M	1840921946	Vf_Mt7g086700_001	M
1041071327	Vf_Mt3g094760_001	P	1655084987	Vf_Mt7g088140_001	M
1777884970	Vf_Mt3g095660_001	P	1313890440	Vf_Mt7g098250_001	M
1178788550	Vf_Mt3g096560_001	P	1339227081	Vf_Mt7g099040_001	P
1011613711	Vf_Mt3g098530_001	M	1727855913	Vf_Mt7g099280_001	M
1339856352	Vf_Mt3g098730_001	M	1907095298	Vf_Mt7g099950_001	P
1488599943	Vf_Mt3g099130_001	M	1587642015	Vf_Mt7g100500_001	M
1793605402	Vf_Mt3g099460_001	P	1534270334	Vf_Mt7g100730_001	P
1455182074	Vf_Mt3g100050_001	M	1046451750	Vf_Mt7g101070_001	M
1892792260	Vf_Mt3g100220_001	P	1149845815	Vf_Mt7g101170_001	M
1302591462	Vf_Mt3g100500_001	P	1073488622	Vf_Mt7g102310_001	M
1765755079	Vf_Mt3g101420_001	M	1533289540	Vf_Mt7g104020_001	P
1085361656	Vf_Mt3g101630_001	P	1076102851	Vf_Mt7g104220_001	M
1346988106	Vf_Mt3g101740_001	M	1920414571	Vf_Mt7g104430_001	P
1939937736	Vf_Mt3g102180_001	M	1801846414	Vf_Mt7g104600_001	M
1349771927	Vf_Mt3g104310_001	P	1025036697	Vf_Mt7g104720_001	P

1198436942	Vf_Mt3g104700_001	M	1949482251	Vf_Mt7g104870_001	P
1289940817	Vf_Mt3g104850_001	P	1962045437	Vf_Mt7g105070_001	M
1510222612	Vf_Mt3g117800_001	P	1833405369	Vf_Mt7g108490_001	M
1787699891	Vf_Mt3g118200_00	P	1566567990	Vf_Mt7g108590_001	P
1439534033	Vf_Mt3g118320_001	M	1357369139	Vf_Mt7g109340_001	P
1992769769	Vf_Mt3g118430_001	M	1039273923	Vf_Mt7g109820_001	M
1517800754	Vf_Mt4g061670_001	M	1627334012	Vf_Mt7g110600_001	M
1480510347	Vf_Mt4g064820_001	M	1628782338	Vf_Mt7g111090_001	P
1945666854	Vf_Mt4g068010_001	M	1993252933	Vf_Mt7g112640_001	M
1801307313	Vf_Mt4g068110_001	M	1216991980	Vf_Mt7g112740_001	P
1897930615	Vf_Mt4g068130_001	M	1301070095	Vf_Mt7g113850_001	M
1092780421	Vf_Mt4g068480_001	M	1571258715	Vf_Mt7g114210_001	M
1416416448	Vf_Mt4g068550_001	M	1901888971	Vf_Mt7g114590_001	M
1357708991	Vf_Mt4g072160_001	P	1476837292	Vf_Mt7g114940_001	M
1643554427	Vf_Mt4g076870_001	P	1835772788	Vf_Mt7g115070_001	M
1488624380	Vf_Mt4g077610_001	M	1047741133	Vf_Mt7g116600_001	M
1475592877	Vf_Mt4g077840_001	M	1052030883	Vf_Mt7g117970_001	M
1508884557	Vf_Mt4g078200_001	M	1651518939	Vf_Mt7g118320_001	P
1150793055	Vf_Mt4g081050_001	M			

CAPÍTULO III

Mapa de ligamiento y análisis de QTL de la fecha de floración en habas

Publicado como:

Aguilar-Benitez, D., Casimiro-Soriguer, I., Maalouf F. and Torres, A.M. Linkage mapping and QTL analysis of flowering time in faba bean. *Sci Rep* (2021)

Resumen

La fecha de floración marca la transición entre el estado vegetativo y reproductivo y es clave para un rendimiento óptimo en cualquier cultivo. Los mecanismos moleculares que controlan este carácter han sido ampliamente estudiados en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y arroz. Mientras que el conocimiento de la regulación molecular de este carácter está siendo rápidamente secuenciado en leguminosas galegoides, el conocimiento en habas se mantiene limitado. En este trabajo hemos usado genómica traslacional desde leguminosas modelo para identificar y mapear QTLs ligados a la fecha de floración en habas. Entre los 31 genes candidatos para el control de la floración en *A. thaliana* y *Cicer arietinum* analizados, 25 pudieron ser mapeados en una población RIL de habas. Mientras la mayoría de los genes muestran una sintenia conservada entre las especies de leguminosas, ninguno de ellos co-localizó con los 9 QTLs identificados. El gen FT está implicado en el control de la fecha de floración en numerosos miembros del grupo de leguminosas de climas templados, y ha sido mapeado cerca del QTL más relevante y conservado dentro del cromosoma V. Además, el análisis de QTLs sugiere un rol importante de las modificaciones epigenéticas en el control de la fecha de floración en habas. Los QTLs y los nuevos genes candidatos identificados aquí proporcionan una buena base para futuros estudios genéticos y contribuyen a la explicación de los mecanismos moleculares que controlan este carácter. Además, pueden servir como dianas para la selección efectiva de caracteres de floración en los programas de mejora de habas.

Abstract

Flowering time marks the transition from vegetative to reproductive growth and is key for optimal yield in any crop. The molecular mechanisms controlling this trait have been extensively studied in model plants such as *Arabidopsis thaliana* and rice. While knowledge on the molecular regulation of this trait is rapidly increasing in sequenced galetoid legume crops, understanding in faba bean remains limited. Here we exploited translational genomics from model legume crops to identify and fine map QTLs linked to flowering time in faba bean. Among 31 candidate genes relevant for flowering control in *A. thaliana* and *Cicer arietinum* assayed, 25 could be mapped in a segregating faba bean RIL population. While most of the genes show conserved synteny among related legume species, none of them co-localized with the 9 significant QTL regions identified. The *FT* gene was previously implicated in the control of flowering time in numerous members of the temperate legume clade, mapped close to the most relevant stable and conserved QTL in chromosome V. Interestingly, QTL analysis suggests an important role of epigenetic modifications in faba bean flowering control. The new QTLs and candidate genes assayed here provide a robust framework for further genetic studies and will contribute to the elucidation of the molecular mechanisms controlling this trait.

1. Introduction

With its global production of 4,92 million metric tons (FAOSTAT 2018) grown in 2.51 million ha, faba bean (*Vicia faba* L.) is the fourth most widely grown cool season legume after pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*). Due to its valuable content of protein and energy, faba bean is used as a livestock feed in both developing and developed countries, and as staple food in developing regions, especially in North and East Africa. Moreover, faba bean contributes to sustainable agriculture and plays an important role in the management of soil fertility through crop rotation and nitrogen fixation. Nevertheless, environmental conditions together with pests, diseases and weeds constrain the production of this major food crop.

Faba bean plants are particularly susceptible to frost, high temperature and/or low moisture during floral development and anthesis (Smith 1982). Therefore, the time of flowering is a key trait in faba bean breeding in order to minimize exposure to critical stress and to produce novel varieties that are better adapted to local environments (Jung and Müller 2009). While two environmental factors, photoperiod and temperature, play a critical regulatory role in plant flowering, the response to these factors varies considerably among genotypes. Faba bean accessions are classified as, in general, day-neutral or long-day adapted, but photoperiod-unresponsive genotypes have also been identified (Ellis et al. 1988a,b, 1990; Evans 1959; McDonald et al. 1994).

Flowering time has been studied for decades both in model and crop plants (Song et al. 2013). A long list of regulatory genes have been identified in *Arabidopsis thaliana* whose orthologues have also been identified in legume crops such as *Glycine max* (Kim et al. 2012) or *Pisum sativum* (Weller et al. 2009). Despite some examples of gene loss or duplication, the main flowering genes are well

catalogued and largely conserved among legumes (Hecht et al. 2005; Kim et al. 2012; Watanabe et al. 2012; Weller and Ortega 2015).

Floral initiation depends on a system where photoreceptors perceive changes in daylength (photoperiod) and trigger the plant responses. Shim et al. (2017) divided the photoperiodic flowering mechanisms into three steps: light input, circadian clock and output. Light information is integrated into innate photoperiodic timing mechanisms governed by the circadian clock to induce genes that trigger flowering. In legumes different classes of photoreceptors have been identified: three phytochromes (*PHYA*, *PHYB* and *PHYE*) and two cryptochromes (*CRY1* and *CRY2*) (Hecht et al. 2005; Platten et al. 2005). In addition to the light signals, internal pathways convey information via the *FKF1/ZTL* gene family (Imaizumi et al. 2003). All these signals converge on the circadian clock, which is controlled by the transcription factors *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* and *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *TIMING OF CAB 1 (TOC1)*, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* and *GIGANTEA (GI)*. In long day (LD) plants, such as *Arabidopsis* or galegoid legumes, light signals promote the expression of *CONSTANS (CO)*, which activates *FLOWERING LOCUS T (FT)* and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* to promote flowering at the meristem (Mouradov et al. 2002) (**Figure 1**). *FT* genes have an important position within the genetic hierarchy that controls flowering. *FT* belongs to the PEBP gene family, which includes five other member *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, *Arabidopsis thaliana CENTRORADIALIS* homolog, *MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT)*, and *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* (Bradley et al. 1997; Mimida et al. 2001; Yoo et al. 2004; Yamaguchi et al. 2005; Yoo et al. 2010). *TFL1* acts as a competitor of *FT* by competitive binding to *FD* (Ahn et al. 2006), which in turn activates the floral meristem identity gene *APETALA1 (AP1)*.

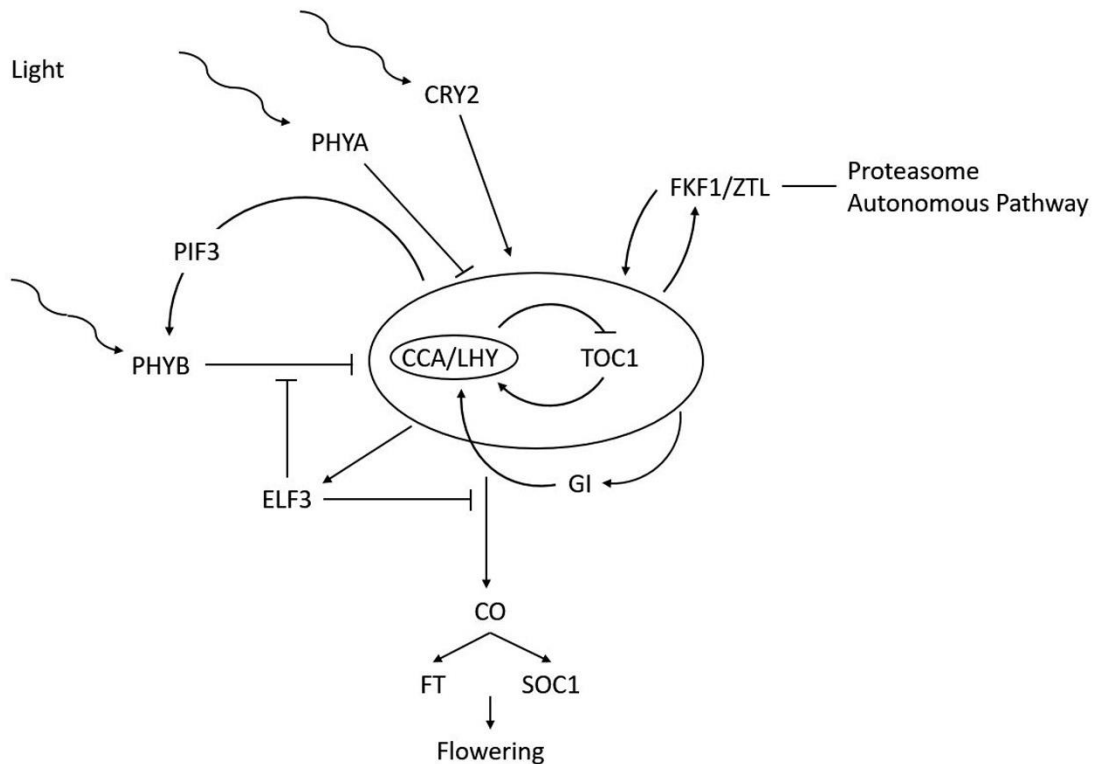


Figure 1. Schematic model of the genetic pathway of flowering time control by the photoperiod. The central circle represents the circadian clock. Modified from Mouradov et al. 2002.

In legumes, the *FT* genes belong to three distinct subclades, *FTa*, *FTb* and *FTc*, each of which comprises several genes with distinct expression patterns in pea (Hecht et al. 2011). The two key *FT* genes in leaves, *FTa1* and *FTb2*, generate distinct mobile signals that influence flowering at the apex. *FTb2* showed the highest induction under LD conditions in leaves, whereas *FTa1* and *FTc* showed expression in apical buds. Hecht et al. (2011) proposed a model for the role and interactions of the pea *FT* genes, with *FTa1* acting as a photoperiod-independent monitor of environmental variables that trigger the flowering, whereas *FTb2* functions as the primary signal in leaves for promoting flowering in LD conditions.

Two legume crops stand out in flowering time studies, pea and soybean, with more than 20 loci identified in pea and at least 10 in soybean (Weller and Ortega 2015). The majority of these loci may have been detected as QTLs in related legume crops but the correspondence is difficult to assess due to a lack of common markers

and/or sequence information. For example, in chickpea or lentil, major QTLs corresponding to flowering time have been reported (Fratini et al. 2007; Aryamanesh et al. 2010; Kahríman et al. 2015; Daba et al. 2016; Mallikarjuna et al. 2017; Kumar et al. 2018), but only in a few cases (Ridge et al. 2017), the orthology with other crops or model species has been assessed. In the case of faba bean, just a few QTL analyses for flowering time have been reported (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Satovic et al. 2013; Sallam et al. 2016; Catt et al. 2017) but no information on the underlying genes and possible orthology, is currently available.

The aim of this study was to exploit translational genomics from model species or related legume crops to identify QTLs linked to flowering time in faba bean. For the first time, a set of genes relevant for flowering control in *A. thaliana*, *M. truncatula*, *P. sativum* and *C. arietinum* were assayed for polymorphisms and further mapped in a segregating faba bean RIL population. The objective was to saturate the map with candidate genes and to identify the QTLs that show a conserved location across different species. The results from this study will advance the understanding of the genetic basis of flowering time control and identify candidate genes and genomic regions of use for targeted molecular breeding of the trait in faba bean.

2. Results

2.1. Phenotypic evaluation

Three different flowering time traits were evaluated: DF1 (days from sowing to appearance of the first flower); DF50 (days until 50% of plants had visible open flowers); and FL (flowering length, days between the start and the end of the flowering period). All three traits showed a continuous distribution, suggesting that they are controlled by multiple genes in this population (data not shown).

Mean phenotypic values and basic descriptive statistics of the traits are shown in **Table 1**. The two parental lines showed clear differences, DF1 and DF50 were shorter in Vf27 compared to Vf6, whereas FL was longer in 2007/08. The range of values for the three flowering traits in the RILs showed similar results across the years. DF1_2011/12 showed a higher mean value than in the previous years (DF1_2006/07 and DF1_2007/08) while the mean values in Lebanon for DF50 (DF50_2009/10 and DF50_2010/11) were lower than those recorded in Spain (DF50_2011/12).

Table 1. Phenotypic values (mean \pm SE) of days to first flower (DF1), days to 50% of flowering (DF50) and Flowering Length (FL) for parental and RILs from the cross Vf6 x Vf27 in each location and agronomic season.

Trait	Location	Vf6	Vf27	Range (Min-Max)	Mean (\pm SE)
DF1_2006/07	Córdoba, Spain	108	98	87-131	105.8 \pm 0.88
DF1_2007/08	Córdoba, Spain	102	82	79-125	100.6 \pm 0.96
DF1_2011/12	Córdoba, Spain	-	-	101-137	120.6 \pm 0.91
DF50_2009/10	Terbol, Lebanon	123	105	101-135	115.5 \pm 1.01
DF50_2010/11	Terbol, Lebanon	131	115	105-133	120.6 \pm 0.64
DF50_2011/12	Córdoba, Spain	-	-	104-144	130 \pm 0.94
FL_2006/07	Córdoba, Spain	-	57	35-70	53.07 \pm 0.84
FL_2007/08	Córdoba, Spain	48	57	20-66	43.79 \pm 0.92

The correlation analysis between the phenological traits DF1, DF50 and FL and years is summarized in **Table 2**. All correlations were significant (P -value $<$ 0.01) and the three traits displayed a high degree of intercorrelation. DF1 and FL in 2006/07 and 2007/08 showed high positive correlation (0.83 and 0.74, respectively), while strong negative correlations were observed between DF1 and FL in both seasons. This is due to trait compensation effects since the earlier the plants flower, the longer the flowering period lasts. A very high correlation value was also found between DF1_2011/12 and DF50_2011/12 (0.94) and between the two evaluations performed in Terbol, Lebanon (DF50_2009/10 and DF50_2010/11).

Table 2. Flowering time traits correlation values. All the correlations showed a significant *P*-value (<0.01).

	DF1_2006/07	DF1_2007/08	DF1_2011/12	DF50_2009/10	DF50_2010/11	DF50_2011/12	FL_2006/07	FL_2007/08
DF1_2006/07	1,00							
DF1_2007/08	0,83	1,00						
DF1_2011/12	0,55	0,50	1,00					
DF50_2009/10	0,67	0,67	0,64	1,00				
DF50_2010/11	0,45	0,49	0,51	0,86	1,00			
DF50_2011/12	0,63	0,55	0,94	0,66	0,52	1,00		
FL_2006/07	-0,93	-0,78	-0,51	-0,61	-0,57	-0,58	1,00	
FL_2007/08	-0,76	-0,96	-0,49	-0,60	-0,43	-0,52	0,74	1,00

The ANOVA results for the genotype by environment (G x E) analyses of each phenological trait are shown in **Supplementary Table 1**. The analysis revealed significant effects for genotypes (RILs), environment (years) and G x E interactions, identifying G x E interactions as an important factor in flowering time variation across genotypes and years.

2.2. Identification of flowering-related genes and primer design

We selected 31 flowering-related genes from *Arabidopsis thaliana* (20 genes) and chickpea (11 genes) to study their implication in the control of flowering time in faba bean. Protein sequences were used in a BLASTp search to identify orthologous sequences in three legume species close to faba bean, *C. arietinum*, *M. truncatula* and *P. sativum*. Positive blast matches are summarized in **Supplementary Table 2**. Interestingly, the BLASTp search with *A. thaliana* CRY2 failed to return a positive match in *C. arietinum* and *M. truncatula*.

The sequences of these orthologues were used for designing primers (see materials and methods for details). Information on the primer sequences, size of the amplified genomic fragments and annealing temperatures for each candidate gene are shown in **Supplementary Table 3**. When applied to faba bean accessions, 28 out of 31 markers yielded amplification products. However, markers Vf_PM3, Vf_SPL1 and Vf_TICb from *C. arietinum* failed to amplify in faba bean.

The amplified sequences from the two parental lines were aligned to search for polymorphisms. Markers Vf_COP1 and Vf_FT produced DNA fragments of different length, which could be directly discriminated by agarose gel electrophoresis. These amplified length polymorphisms (ALPs) are derived from insertions or deletions yielding a different banding pattern. Markers Vf_PIF3 and Vf_GI did not show polymorphisms between the parental lines, while the remaining 24 markers (16 from *A. thaliana* and eight from *C. arietinum*) all revealed SNP polymorphisms. In 18 of these markers, the SNP was associated with a restriction site and thus these markers were transformed into CAPs. For the remaining six markers internal primers were designed. If the internal primer discrimination failed (Vf_TT8, Vf_FKF1 and Vf_PHYA), the SNPs were genotyped using the MassArray iPLEX (Sequenom) platform (<http://www.cegen.org>). Only Vf_ETF4 could not be genotyped using any of the genotyping techniques described.

2.3. Genetic mapping

The genotypic data obtained with the flowering time candidate markers were combined with the data set previously reported in this RIL population (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Aguilar-Benitez et al. 2020b). Information on the map positions is shown in **Table 3**. All the new markers fit the expected 1:1 Mendelian ratio except for Vf_FT which showed a distorted segregation skewed towards the Vf6 allele (**Table 3**). The linkage map, spanning 4.184 cM, consists of six main linkage groups and five smaller arrays (**Figure 2**). The existence of common markers

with previous consensus maps (Satovic et al. 2013; Webb et al. 2016) allowed us to assign all the LGs to the corresponding faba bean chromosomes (chr.). All candidate-gene markers were included in the new genetic map, with numbers ranging from one in LGVI to six in LGI and LGIII.

Table 3. Genetic segregation, chi-square test and location of the flowering time gene markers in faba bean (Vf) and related legume species: Ca, *Cicer arietinum*; Mt, *Medicago truncatula* and Ps, *Pisum sativum*. Grey cells highlight syntenic chromosomes (Chr) / and linkage groups (LGs). Lack of fit to the expected 1:1 segregation is indicated by an asterisk.

Marker	X2 (1:1)	P	Vf_Chr	Ca_Chr	Mt_Chr	Ps_LG
Vf_EIN4	0,59	0,442	3	4	1	scaffold
Vf_GA20ox	2,086	0,149	3	4	1	2
Vf_GA2ox3	2,922	0,087	3	4	1	2
Vf_ICCM	0,011	0,916	3	4	1	2
Vf_TICa	3,658	0,056	3	4	1	2
Vf_TT8	0.385	0.535	3	4	1	2
Vf_LHY	0	1	2	3	7	5
Vf_CO	1,316	0,251	1	4	7	5
Vf_COP1	0,91	0,34	4	2	5	1
Vf_CRY1	0,976	0,323	1	2	5	1
Vf_CRY2	0,05	0,823	3	-	-	2
Vf_ELF3	0,047	0,829	2	5	3	3
Vf_FD	0,419	0,518	1	8	5	1
Vf_FKF1	0.235	0.628	6	6	8	6
Vf_FT	26,385	0*	5	3	6	6
Vf_TFL1	0.400	0.527	5	3	7	5
Vf_LFY	1,754	0,185	2	5	3	3
Vf_LUX	1,136	0,286	6	6	4	7
Vf_PHYA	1.704	0.192	3	4	1	2
Vf_PHYB	0,117	0,732	1	1	2	6
Vf_PHYE	0,59	0,442	1	1	2	6
Vf_SOC1	0,048	0,827	4	3	8	-
Vf_SVP	1,988	0,159	1	scaffold	5	1
Vf_TEM	0,049	0,825	1	scaffold	5	1
Vf_TOC1	0,762	0,383	4	7	4	4

We next checked whether the marker genes share syntenic positions in *V. faba* and the closely related species *M. truncatula*, *P. sativum* and *C. arietinum* (**Table 3**). The level of synteny was quite high (69%), with 18 out of 25 gene markers conserved in at least one other species. Twelve *V. faba* genes were syntenic with *C. arietinum*, 15 with *M. truncatula* and 16 with *P. sativum*. Finally, 12 markers (Vf_GA20ox, Vf_GA2ox3, Vf_ICCM0293, Vf_TICa, Vf_TT8, Vf_CRY1, Vf_ELF3, Vf_FD, Vf_TFL1, Vf_LFY, Vf_LUX and Vf_PHYA) showed conserved synteny in all four species tested, preserving co-localization of these genes in their homologous chromosomes.

2.4. QTL analysis

We identified 12 significant QTLs (LOD threshold > 3.3) related with flowering time in chr. I, II, III, IV and V (**Table 4, Figure 2**). Except for DF1_07-08(1), DF1_07-08(2), DF50_11-12(1) and FL_06-07(3) the additive effects of the associated markers were positive, indicating that most early flowering alleles originate from the Vf27 parental line.

We identified 4 significant QTLs for DF1. Two of these, DF1_06-07(2) and DF_07-08(3), with a LOD peak > 5, explaining 11.1 and 17.4% of the phenotypic variance, respectively, co-localized in chr. V associated with the *Medicago truncatula* (Mtr) marker Mtr7g084800. In addition, DF1_07-08(3) showed a second significant peak that co-localized with FL_07-08(3) and explained 11.1% of the variation. The other two QTLs were located in chr. II (DF1_07-08(1)) and IV (DF1_07-08(2)) and explained 10.7 and 11% of the trait variation.

For DF50 scored in 2011/12, three significant QTLs were found in chr. I, II and V. The largest main effect QTL was DF50_11-12(2), which explained 17.9% of the phenotypic variance and is located in chr. II flanked by GAI18 and Vf_Mtr3g096560.

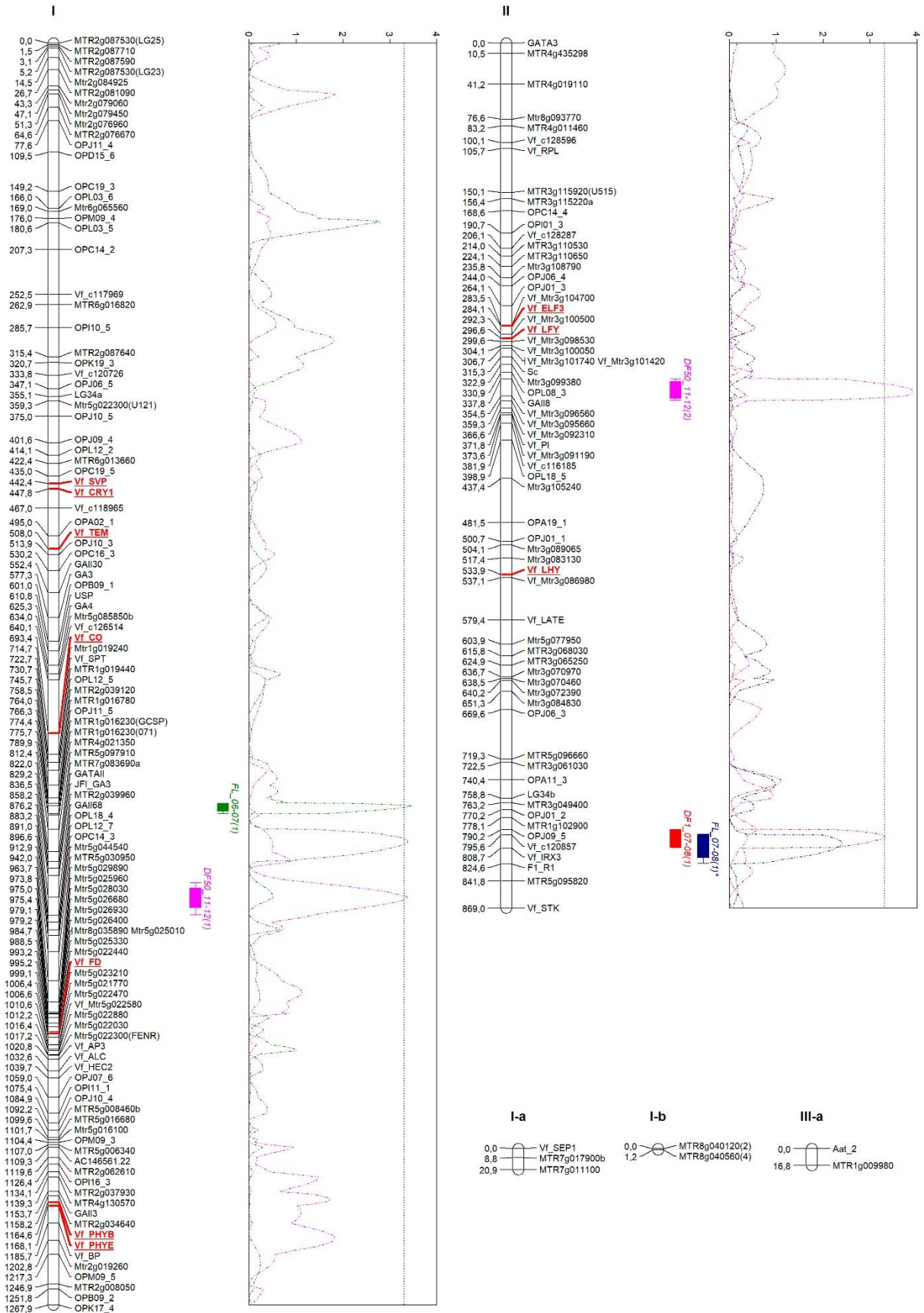


Table 4. QTLs for flowering time traits identified in the Vf6 x Vf27 RIL population.

Trait	Peak	Chr	Flanking Markers	LOD	Additive effects	R ²
FL_06-07(1)	766.313	I	OPJ11_5	3.46	2.27494	7.4
DF50_11-12(1)	858.208	I	Mtr2g039960	3.39	-2.91921	9.1
DF50_11-12(2)	349.829	II	GAI18/Vf_Mtr3g096560	3.91	3.90166	17.9
DF1_07-08(1)	796.562	II	Vf_c120857	3.31	-3.06379	10.7
FL_07-08(1)*	805.562	II	Vf_IRX3	2.39	2.4726	7.6
FL_06-07(2)	33.823	III	Mtr1g116330	3.57	2.86524	11.6
DF1_06-07(1)*	577.528	IV	1947_02	2.75	-2.10807	5.3
DF1_07-08(2)	577.528	IV	1947_02	3.98	-3.16022	11
FL_07-08(2)	577.528	IV	1947_02	4.54	3.17776	12.6
DF50_11-12(3)	265.522	V	Mtr7g024320	3.72	3.36068	13.2
DF1_06-07(2)	343.911	V	Mtr7g084800	5.26	3.85206	11.1
DF1_07-08(3)	343.911	V	Mtr7g084800	5.76	4.90158	17.4
DF50_09-10(2)*	343.911	V	Mtr7g084800	2.86	4.53734	12.8
FL_06-07(3)	343.911	V	Mtr7g084800	5.19	-3.41023	12.2
DF1_11-12(1)*	426.159	V	Vf_Mtr7g104720/Vf_Mtr7g104870	2.57	-3.22325	10.6
FL_07-08(3)	426.167	V	Vf_Mtr7g104870	3.80	3.29528	11.1

(*): No significant QTL

Finally, 5 significant QTLs for FL were detected in chr. I, III, IV and V. Two of these co-localized with other DF1 QTLs in chr. IV (FL_07-08(2)) and chr. V (FL_06-07(3)) (**Figure 2**). Moreover, two additional QTLs for FL_2006/07 were detected in chr. I (with a second peak between Mtr4g021350 and Mtr5g097910) and chr. III (with a second peak next to Mtr1g087900(LG38)), explaining 7.4 and 11.6% of phenotypic variation, respectively.

Four medium-sized QTLs failed to reach the defined threshold: FL_07-08(1) in chr. II, DF1_06-07(1) in chr. IV and DF1_11-12(1) and DF50_09-10(2) in chr. V. Nevertheless, these QTLs are displayed in **Figure 2** and **Table 4** since they co-localized with other significant QTLs. However, none of the 25 flowering genes included in the map appear to be plausible candidates for the observed QTLs, and only FT and TFL1 (in chr. V) were located close or within the confidence interval of a significant QTL.

In summary, chromosome V accumulates most of the consistent and stable flowering time QTLs detected across different locations and years. These QTLs were distributed in two regions. The first including QTLs for DF1, DF50 and FL is located close to the marker Mtr7g084800, while the second including QTLs for DF1 and FL is close to Vf_Mtr7g104870. Additional relevant genomic regions were identified in chr. II and IV, where DF1 and FL QTLs co-localized in the distal part of both chromosomes and explained between 10.7-17.9% and 11-12.6% of the phenotypic variation, respectively.

To identify the orthologous genes flanking the QTLs, we performed a BLASTp search against the *Arabidopsis* protein database in the NCBI platform. These results are shown in **Supplementary Table 4**.

3. Discussion

Flowering time is one of the most important adaptive traits in plants (Patrick and Stoddard 2010) and its regulation crucially affects crop yield. As many other temperate legume crops, faba bean synchronizes flowering to match the seasons by monitoring cues such as temperature and photoperiod. Thus, exposure to winter cold (vernalization) results in the competence to flower during the following spring in response to increasing day length signals.

Both the vernalization pathway and the photoperiod pathway have been characterized in detail for the model plant *A. thaliana*, where more than 100 genes contributing to the flowering time control have been identified (Andrés and Coupland 2012). Most of the key genes and gene families of the *Arabidopsis* flowering time pathway appear to be conserved in legumes, with a few of them having undergone duplications (e.g. *CRY2*) or loss (e.g. *PHYC*) (Weller and Ortega 2015). Thus, there is significant potential for translating the knowledge on flowering control from the model or related legume species to faba bean.

Here we conducted a comprehensive analysis of the genetic determination of flowering time in faba bean by systematically evaluating three related traits in a segregating RIL population across different locations and years using a combination of comparative genomics, candidate gene mapping and QTL analysis. We selected a set of 31 genes controlling flowering time in *Arabidopsis* and chickpea to fine map faba bean target regions and identify genes co-localizing with previously identified QTLs, and were able to genotype and include 25 of them in the faba bean linkage map. Most of these markers showed a conserved synteny with the related legume crops *Medicago*, *Pisum* and *Cicer* (**Table 3**), although none of them co-localized with previously reported faba bean QTLs. Importantly, only *FT* gene mapped close to the most prominent and consistent QTL region (see below).

The analysis identified 12 significant QTLs for flowering time. The most important region in chr. V, contained five QTLs for different flowering traits that were stable and consistently detected across different years. The co-localization of two putative QTLs, DF1_11-12(1) and DF50_09-10(2), which did not reach the established significance level, further corroborates the importance of this genomic region flowering time control.

This region on chr. V was first identified by Cruz-Izquierdo et al. (2012), with a major QTL near markers Pis_GEN_6_3_1 (Mtr7g084800) and AnMtS37 (Mtr7g081220). Subsequent studies in faba bean (Catt et al. 2017; Sallam et al. 2016), showed a relation of days to flowering with the SNP marker Vf_Mt7g084010, which mapped close to Mtr7g084800. Our present results confirm that Mtr7g084800 is the marker mapping closest to the most relevant QTL peak (**Table 4, Figure 2**). Mtr7g084800 corresponds to a photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which participates in the Calvin cycle, is transcriptionally regulated by light (Chan et al. 2002) and highly expressed in leaves and floral stalks (Marri et al. 2005).

Studies in temperate legume species such as *M. truncatula*, chickpea, narrow-leaved lupin, alfalfa and *Lotus japonicus* confirmed the conservation of this major flowering time QTL in a region syntenic with a section of *Medicago* chr. 7, containing a tandem array of *FTa* and *FTC* genes (reviewed by Weller and Ortega 2015). As mentioned above, we found that *FT* was the only candidate gene mapping close to this QTL region, where marker Mtr7g084800 is surrounded by a cluster of *FT* flowering time loci (**Supplementary Table 5**). We attempted to design primers pairs corresponding to the different *FT* candidate genes present in the *M. truncatula* QTL interval (Pierre et al. 2008) but the high sequence conservation prevented further amplification. Using the available *M. truncatula*, *P. sativum* and *V. faba* *FT* sequences, we were able to design primer pairs for Mtr7g085040 (*FTC*) as well as for a second *V. faba* *FT*, although linkage analysis mapped both markers to the same position confirming the high sequence conservation. Because none of the new *FT* markers genotyped was directly linked to the QTL found in chr. V, the identity of the responsible gene(s) remains to be determined.

Also, in chr. V, marker Vf_Mtr7g104870 was associated with QTL FL_07-08(3) and DF1_11-12(1), although the latter did not reach the significance level.

Vf_Mtr7g104870 shows homology with the *A. thaliana* AT4G18590 gene encoding one of the three subunits of DNA Replication Protein A (RPA). RPA is a protein complex with a critical function in DNA replication, repair, recombination and epigenetic maintenance. These proteins play important roles in epigenetic gene silencing and in the regulation of the meristem development in *A. thaliana* (Xia et al. 2006). Interestingly, vernalization in *Arabidopsis* involves downregulation of *FLC*, primary floral repressor (Michaels and Amasino 1999; Sheldon et al. 1999). Bastow et al. (2004) showed that vernalization causes histone methylation in the *FLC* gene, thereby preventing the transition to the reproductive state.

Further, we detected QTLs in chr. I, II, III and IV. The QTL DF50_11-12(1) in chr. I was associated with marker Mtr2g039960, which corresponds to eukaryotic translation initiation factor 4A1 (*EIF4A1*) according to a BLASTp search against the *A. thaliana* genome database (**Supplementary Table 3**). *EIF4A1* was previously shown to modulate the light/dark cycle in mature leaves (Boex-Fontvieille et al. 2013). Interestingly, *A. thaliana* mutants in *EIF4A1* showed a pronounced late-flowering phenotype and significantly altered expression of *FLC* and *SOC1*, a positive and negative regulator of *FT* genes, respectively (Bush et al. 2016). Mutation in another *EIF4* gene (*EIF4G*) of *A. thaliana* resulted in a late flowering phenotype (Lellis et al. 2010). In maize, *EIF4A1* was also described as a candidate gene for flowering time (Durand et al. 2012).

In chr. II we detected QTL DF1_07-08(1), which co-localizes with FL_07-08(1), although it did not reach the significance level. Both are associated with markers Vf_c120857 and Vf_IRX3. Vf_c120857 (Mtr3g449590) shows homology with AT4G23820, a pectin lyase-like superfamily protein, which is apparently unlinked to flowering. A second QTL in chr. II, DF50_11-12(2), is flanked by markers GAI18 and Vf_Mtr3g096560. While GAI18 is a microsatellite, Vf_Mtr3g096560 corresponds to *A. thaliana*, DNA polymerase delta (δ) subunit 1 (AT5G63960), which is part of a

complex of three DNA polymerases. DNA polymerase α (Pol α) initiates DNA strand synthesis while Pol ϵ and Pol δ perform the synthesis in the leading and lagging strands, respectively. In *A. thaliana*, Pol δ was reported to regulate flowering via epigenetic marks (Iglesias et al. 2015). According to the proposed model Pol δ is delayed at high temperatures, triggering a DNA replication stress response which results in methylation of a H3K4me3 histone in the *SEPALLATA3* (*SEP3*) locus. This epigenetic mark promotes transcription *SEP3*, which participates in a feedback loop with *FT* genes, thus linking Pol δ activity to the establishment of transcriptional epigenetic marks affecting flowering. These findings are in line with the fact that in *Arabidopsis esd7* and *abo4-1* mutants, discrete regions at the *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) are enriched in H3K4me3, correlating with higher *FT* and lower *FLC* expression levels (del Olmo et al. 2010).

The QTL FL_06-07(2) in chr. III was associated with Mtr1g116330, a PRLI-interacting factor specifically expressed during flower development in *Acacia mangium* (Wang et al. 2005). In rice, genetic analysis and fine mapping of a set of complementary genes controlling late heading (flowering time) also identified a PRLI-interacting factor as a putative candidate for *LH1* (Liu et al. 2012).

Finally, consistent QTLs for DF1 and FL co-localized in chr. IV were associated with the 1947_02 marker corresponding to the *M. truncatula* Mtr4g132540 gene, a homolog of the jumonji domain-containing protein JmjC in *A. thaliana* (**Supplementary Table 3**). JmjC proteins regulate epigenetic processes involved in plant growth, development and disease resistance (Klose et al. 2006; Kouzarides 2007; Han et al. 2016). In *A. thaliana* several JmjC members have been characterized. They play a critical role in flowering time control via chromatin remodeling involving modifications of histones that either promote or repress gene expression. Members of the two known families of histone demethylases in eukaryotes, lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and Jumonji C-terminal domains

are involved in regulating both defense and developmental (flowering time) processes (Dutta et al. 2017; Zheng et al. 2019), as now is also suggested in faba bean.

The QTL analysis identified *EIF4A1* in chr. I and PRLI-interacting factor in chr. III, as well as three candidate genes involved in flowering time regulation through histone modifications, *RPA* in chr. V, DNA polymerase delta (δ) in chr. II and JmjC in chr. IV. This result highlights the important role of epigenetic modifications in faba bean flowering control. Based on this finding, we propose that conserved epigenetic pathways in plants can be exploited as a novel source to identify markers for flowering control and stress tolerance (Yaish et al. 2011).

The QTLs and candidate genes identified here provide a robust framework for further genetic studies aimed at elucidating the mechanisms controlling flowering time. The ongoing faba bean genome sequence assembly together with the development of dense, gene-based genetic maps will further facilitate fine mapping of relevant QTL regions. These QTLs need to be transferred to effective markers for further use in the breeding programs. Therefore, additional flowering time studies involving new faba bean genetic backgrounds and expression analyses will validate the usefulness of the identified candidates in flowering control. The predicted outcomes will provide targets for an effective selection of flowering traits in faba bean breeding programs.

4. Material and Methods

4.1. Plant material

A recombinant inbred line (RIL) population of 124 individuals derived from the faba bean cross Vf6 x Vf27 was used in this work. Vf6 is an equina medium-seeded field bean with beige seed coat and late flowering time while Vf27 is a black and small-seeded paucijuga primitive form with earlier date of flowering, with a

phenotype similar to the hypothetical wild progenitor (Cubero and Suso 1981). This RIL population was developed at IFAPA and well-studied in previous mapping and QTL research (Vaz Patto et al. 1999; Román et al. 2004; Ellwood et al. 2008).

4.2. Phenotypic evaluation

Evaluations were conducted at IFAPA-station in Alameda del Obispo, Cordoba in Spain (37.51°N, 4.48°W, 94m) during 2006/2007, 2007/2008 and 2011/2012 seasons) and at ICARDA, Terbol Research Station, Bekaa Valley in Lebanon (35.98°N, 33.88°E, 890m) during 2009/2010 and 2010/2011 winter cropping seasons. The mean annual temperature in Córdoba is 24.6 °C and the annual rainfall is 536 mm, mostly concentrated from December to February. In Terbol, the mean annual temperature is 15.4 °C and the annual rainfall of 559 mm. A randomized complete block design with two replicates per genotype was used in both environments. The experimental unit consisted of 10 plants including RILs and parental lines. Sowing dates were during the first half of November in the five growing seasons.

Flowering traits were recorded using different methods: DF1, scored as the number of days from the sowing until the appearance of the first flower; DF50, recorded as the number of days until the 50% of the plants had visible open flowers and FL (flowering length), scored as the difference of days between the start and the end of flowering period (when no flowers were present in the plants). DF1 was evaluated in 2006/07, 2007/08 and 2011/12 (only in Spain); DF50 was evaluated in 2009/10, 2010/11 and 2011/12 (in Spain and Lebanon) and FL was evaluated in 2006/07 and 2007/08 (only in Spain). Evaluations from 2006/07 and 2007/08 were previously reported by Cruz-Izquierdo et al. (2012).

Global means, ranges, standard error (SE), histograms of frequency and statistical analyses were carried using the R software version 4.02 (R Development Core Team 2020).

4.3. Flowering-related genes and primer design

To develop molecular markers associated with flowering time in faba beans, we used a candidate gene-based strategy (Pflieger et al. 2001). Thirty-one flowering-related genes described in other species (mostly in chickpea and *Arabidopsis thaliana*) were selected (**Supplementary Table 2**). Then using the BLAST tool, homologous sequences were identified in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*. Positive results were used as well to search for homologous sequences in faba bean transcriptome databases (Ocaña et al. 2015). The obtained sequences were aligned using the Geneious software suite (v. 7.1.9; Biomatters, Auckland, New Zealand) to identify conserved domains and design the primer pairs. When possible, primers were designed on faba bean sequences, otherwise, we used the sequence of related species.

A set of exonic primers flanking the intronic sequences with a size of 20–25 pb, GC contents of 45–60% and T_m of 60 ± 1 °C were designed to amplify fragments in a 300-1200 bp range. The markers developed in this work were named as the corresponding candidate gene preceded by Vf (**Supplementary Table 3**).

4.4. PCR amplification and polymorphism detection

Genomic DNA was isolated from young leaves using a CTAB protocol (Torres et al. 1993b). PCR amplification consisted in 25 μ l of reaction containing 4 ng template DNA, 1x PCR buffer, 2 mM of $MgCl_2$, 0.4 mM of dNTPs, 0.2 μ M of each primer and 1 unit of Taq polymerase (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain). The amplification profile was an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30

cycles of 45 sec at 94 °C, 45 sec at 56–60 °C and 45 sec at 72 °C, with a final extension step of 8 min at 72 °C. PCR products were separated using 2% agarose gels. Positive amplifications were purified using a standard 3 M sodium acetate (pH 4.5) and ethanol protocol. The purified DNA was used for direct sequencing (STABVIDA, Portugal). Finally, the sequences from parental and contrasted RILs for flowering time were aligned to detect SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Those SNPs with recognition sites for restriction enzyme digestion between lines were converted into CAPS makers (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence) to genotype the whole RIL population. Restriction digestions were performed following the supplier's instructions and visualized in 2% agarose gels. For SNPs lacking restriction enzymes in the polymorphic site, internal primers were designed using the technique Tetra-Primer ARMS-PCR described by (Medrano and de Oliveira 2014). When the internal primers did not yield amplification products or a clearly scorable segregation, the genotyping was carried out at CEGEN-PRB3-ISCIII (<http://www.cegen.org>) using the MassArray iPLEX (Sequenom) SNP genotyping platform from the Spanish National Genotyping Center facility of the University of Santiago de Compostela.

4.5. Genetic mapping and QTL analysis

The preceding maps developed in the Vf6xVf27 RIL population include approximately 425 RAPDs, ESTs and SNP markers (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Aguilar-Benitez et al. 2020b). The new polymorphic flowering time markers were genotyped in this RIL population and incorporated into the previous dataset (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Aguilar-Benitez et al. 2020b) to develop a new linkage map. Chi-squared tests to determine goodness of fit to the expected segregation ratio of 1:1 were carried out for all markers segregating in the RIL population. Linkage analysis was performed using JoinMap v4.0 (Van Ooijen 2006) with maximum likelihood option. Markers were grouped at a minimum LOD score of 3 and a maximum recombination fraction of 0.25 as general linkage criteria to establish

linkage groups. Kosambi's function was applied to convert the recombination frequencies into genetic distances (Kosambi 1943).

QTL analysis was conducted by MapQTL v5.0 software (van Ooijen 2004). First, the nonparametric Kruskal-Wallis test was performed to estimate the marker significance level and the marker-phenotype association. Then, the interval mapping (Lander and Botstein 1989; van Ooijen 1992) was applied to identify putative QTLs in each linkage group (LG). Markers significant at $P = 0.01$ were used as cofactors in the multiple QTL analysis (MQM) (Jansen 1993, 1994; Jansen and Stam 1994). QTL significance (P -value) was determined by permutation analysis using 1000 replicates (Churchill and Doerge 1994), as implemented in MapQTL 5.0. Only QTLs with a LOD higher than the P -value were declared as significant. MapChart software (Voorrips 2002) was used to represent the QTLs confidence interval. The support intervals were defined as LOD-1 and LOD-2 around the maximum LOD of QTL. If QTLs for the same trait detected in different environments had overlapping 2-LOD support intervals, they were considered to be the same QTL and also been designated as consistent QTLs.

4.6. Ethical approval

Faba bean is a common crop extensively cultivated in the world. The authors declare that the experimental research work conducted in this study was carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

Acknowledgements

This research was supported by funding from projects RTA2017-00041 co-financed by ERDF and PP.AVA.AVA2019.030 by the Junta de Andalucía. DAB acknowledges his Ph.D. fellowship INIA-CCAA. The authors are grateful to Dr. A. Di

Pietro for critical reading of the manuscript and Dr. S. Cruz-Izquierdo and Dr. F. Maalouf for the phenotypic data collection.

Supplementary Material

Supplementary Table 1. ANOVA showing the effects of genotypes (RIL) and Environment interaction. DF1: days to first flower; DF50: Days to 50% of flowering; FL: flowering length. Df: degree of freedom; Mean SQ: mean squares; *** significant at $P < 0.001$ probability level, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$.

DF1	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
Year	2	31956	15977.9	1134.3958	<2.2e-016***
RIL	122	33449	274.2	19.4658	<2.2e-016***
Rep	1	13	12.5	0.8876	0.3472
Year:RIL	226	8169	36.1	2.5663	4.02e-12 ***
Residuals	215	3028.3	14.1		

DF50	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
Year	2	12821.1	6410.5	528.4446	<2.2e-016***
RIL	122	31499.4	258.2	21.2837	<2.2e-016***
Rep	1	51.8	51.82	4.2718	0.03993 *
Year:RIL	218	8002.1	36.7	3.0259	7.211e-16 ***
Residuals	219	2656.7	12.1		

FL	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
Year	1	7885.1	7885.1	453.6540	<2.2e-016***
RIL	114	22068.4	193.6	11.1374	<2.2e-016***
Rep	1	210.7	210.7	12.1246	0.0006361 ***
Year:RIL	91	2503.6	27.5	1.5828	0.0054101 **
Residuals	166	2885.3	17.4		

Supplementary Table 2. BLASTp results of flowering candidate genes against chickpea, *Medicago* and pea genomes.

Original plant	Gene	At Protein accession	Chickpea protein accession	Cover.	E-value	aa Ident.	Chickpea mRNA accession	Medicago protein accession	Cover.	E-value	aa Ident.	Medicago mRNA accession	Pisum protein accession	Cover.	E-value	aa Ident.	Pisum mRNA accession	E-value	Identity	Vicia faba transcriptome accession
<i>C. arietinum</i>	EIN4		XP_004495561.1				XM_004495504.3	XP_003590928.2	97.00%	0	90.50%	XM_003590880.3	AOD74920.1	98.00%	0	56.20%	KX261619.1	0	2111/2222 (95%)	Contig15971
<i>C. arietinum</i>	GA20ox		XP_004496635.1				XM_004496578.3	XP_003592363.2	100.00%	0	90.21%	XM_003592315.3	AAC49721.1	99.00%	0	76.72%	U70471.1	9.00E-118	274/295 (93%)	Locus_16998_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_807
<i>C. arietinum</i>	GA2ox3		XP_004495887.1				XM_004495830.3	XP_003591361.1	98.00%	0	84.30%	XM_003591313.3	AAD45425.1	88.00%	2.00E-97	49.03%	AF100955.1			
<i>C. arietinum</i>	ICCM0293		XP_004496043.1				XM_004495986.1	XP_003591412.3	100.00%	0	74.06%	XM_003591364.3								
<i>C. arietinum</i>	PIF3		XP_004495811.1				XM_004495754.3	XP_003591254.1	100.00%	0	79.62%	XM_003591206.3		1898/2226 (3311)	0	85.00%	Psat6g155920.2			
<i>C. arietinum</i>	PM3-AGL6		XP_027189121.1				XM_027333320.1	XP_003592353.3	100.00%	8.00E-114	85.56%	XM_003592305.3		247/285 (980)	1.00E-91	87.00%	Psat6g201800.4			
<i>C. arietinum</i>	SPL1		XP_004495874.1				XM_004495817.3	XP_003591325.1	100.00%	0	88.07%	XM_003591277.3		2783/3051 (6188)	0	91.00%	Psat6g160520.1	5.00E-60	138/144 (96%)	Locus_55084_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_145
<i>C. arietinum</i>	TICa		XP_027189815.1				XM_027334014.1	XP_003592415.1	100.00%	0	84.50%	XM_003592367.3		4109/4761 (6188)	0	86.00%	Psat6g208200.1			
<i>C. arietinum</i>	TICb		XP_012569782.1				XM_012714328.2	XP_003590638.2	100.00%	0	71.52%	XM_003590590.3								
<i>C. arietinum</i>	TT8		XP_027189966.1				XM_027334165.1	XP_024642244.1	99.00%	0	79.16%	XM_024786476.1								
<i>C. arietinum</i>	LHY		XP_004494878.1				XM_004494821.3	XP_003626618.2	99.00%	0	84.44%	XM_003626570.3						0	1301/1440 (90%)	Contig17202
<i>A. thaliana</i>	CO	NP_197088.1	XP_004498823.1	94.00%	6.00E-71	40.33%	XM_004498766.3	XP_013447714.1	95.00%	4.00E-99	52.05%	XM_013592260.2						0	1043/1278 (82%)	Contig3240
<i>A. thaliana</i>	COP1	NP_180854.1	XP_004491092.1	100.00%	0	77.50%	XM_004491035.3	XP_003616876.2	100.00%	0	77.50%	XM_003616828.3		1882/2019 (2377)	0	93.00%	Psat2g025120.1			
<i>A. thaliana</i>	CRY1	NP_567341.1	XP_004490375.1	98.00%	0	77.70%	XM_004490318.3	XP_024639243.1	98.00%	0	78.83%	XM_024783475.1						0	752/829 (91%)	Contig4322
<i>A. thaliana</i>	CRY2	NP_171935.1											AAS79665.1	98.00%	0	64.55%	AY508972.1	0	1849/1944 (95%)	Contig2088
<i>A. thaliana</i>	ELF3	NP_180164.1	XP_004501482.1	99.00%	1.00E-111	37.75%	XM_004501425.2	XP_003603108.1	99.00%	1.00E-101	37.48%	XM_003603060.3	AFR60580.1	99.00%	1.00E-103	37.80%	JN983406.1			
<i>A. thaliana</i>	ELF4	NP_565922.1	XP_004500487.1	78.00%	1.00E-35	66.67%	XM_004500430.3	XP_003600889.2	73.00%	2.00E-34	67.07%	XM_003600841.3		346/406 (770)	1.00E-128	85.00%	Psat5g128480.1			
<i>A. thaliana</i>	FD	NP_001329774.1	XP_027193461.1	71.00%	2.00E-11	35.71%	XM_027337660.1	XP_024640475.1	71.00%	4.00E-17	35.32%	XM_024784707.1		495/615 (649)	5.00E-157	80.00%	Psat2g152560.1			
<i>A. thaliana</i>	FKF1	NP_564919.1	XP_004503344.1	94.00%	0	81.56%	XM_004503287.3	XP_003630967.1	99.00%	0	79.94%	XM_003630919.3		842/1215 (2353)	7.00E-137	69.00%	Psat1g146560.1			
<i>A. thaliana</i>	FT	NP_001320342.1	XP_004493127.1	78.00%	3.00E-96	74.57%	XM_004493070.2	XP_013451589.1	79.00%	3.00E-95	71.43%	XM_013596135.1	ADZ05700.1	78.00%	2.00E-88	68.21%	HQ538823.1			Locus_48605_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_276
<i>A. thaliana</i>	TFL1																			
<i>A. thaliana</i>	GI	NP_564180.1	XP_004496435.1	99.00%	0	74.53%	XM_004496378.3	XP_003592048.2	99.00%	0	74.77%	XM_003592000.3		3306/3527 (4313)	0	94.00%	Psat6g190640.2			
<i>A. thaliana</i>	LFY	NP_001331273.1	XP_004501760.1	94.00%	8.00E-175	64.63%	XM_004501703.3	XP_003602745.1	92.00%	5.00E-172	66.83%	XM_003602697.2	AAC49782.1	94.00%	2.00E-177	65.53%	AF010190.2			
<i>A. thaliana</i>	LUX	NP_190248.1	XP_004507164.1	73.00%	7.00E-81	59.58%	XM_004507107.3	XP_003606714.1	70.00%	4.00E-77	57.74%	XM_003606666.3		775/953 (2087)	0	81.00%	Psat7g211480.2			
<i>A. thaliana</i>	PHYA	NP_172428.1	XP_004495828.1	100.00%	0	79.23%	XM_004495771.2	XP_013469103.1	100.00%	0	79.06%	XM_013613649.2		3096/3373 (3974)	0	92.00%	Psat6g156640.3			
<i>A. thaliana</i>	PHYB	NP_001325249.1	XP_004486544.1	92.00%	0	76.26%	XM_004486487.3	XP_024631997.1	96.00%	0	73.35%	XM_024776229.1	AAF14344.1	93.00%	0	74.53%	AF069305.1			
<i>A. thaliana</i>	PHYE	NP_193547.4	XP_004488314.1	98.00%	0	61.88%	XM_004488257.3	XP_003595571.1	98.00%	0	57.66%	XM_003595523.1		1752/2681 (3369)	3.00E-175	65.00%	Psat1g161560.1			
<i>A. thaliana</i>	SOC1	NP_182090.1	XP_004492667.1	97.00%	1.00E-92	66.83%	XM_004492610.3	XP_013444984.1	97.00%	1.00E-97	66.98%	XM_013589530.2						6.00E-60	162/180 (90%)	Contig18298
<i>A. thaliana</i>	SVP	NP_179840.2	XP_004515127.1	100.00%	7.00E-108	67.50%	XM_004515070.3	XP_003613054.1	100.00%	1.00E-108	67.08%	XM_003613006.3						5.00E-26	72/76 (95%)	Contig19046
<i>A. thaliana</i>	TEMP	NP_173927.1	XP_004514325.1	99.00%	1.00E-141	59.18%	XM_004514268.3	XP_003614455.2	99.00%	5.00E-138	57.25%	XM_003614407.3						0	925/1151 (80%)	Contig312
<i>A. thaliana</i>	TOC1	NP_200946.1	XP_004508720.1	94.00%	6.00E-177	49.51%	XM_004508663.3	XP_013457921.1	98.00%	1.00E-177	49.61%	XM_013602467.2						0	1265/1513 (84%)	Contig13284

Supplementary Table 3. Primer sequences developed for the amplification of flowering time candidate genes in faba bean, annealing temperature (Ta), product size, type of marker and restriction endonucleases or genotyping platform used.

Marker	Forward Sequence (5' -> 3')	Reverse Sequence (5' -> 3')	Ta (°C)	PCR product size (bp)	Marker type
Vf_EIN4	AGGTATGAGGGCAGATTGAGCTTTA	CGGAGAAGAAGTGTCATGCTTTGA	58	490	CAPS / <i>BsmI</i>
Vf_GA20ox	GGCATTCCATTACCCACATTCA	GATTCTGGGTTGTAATTGTCCACC	58	850	CAPS / <i>ApoI</i>
Vf_GA2ox3	TCTTAAGATCCAACAACGTGGGTG	TGCTTGTGTTGATTGGGCCCAT	58	500	CAPS / <i>XbaI</i>
Vf_ICCM	CAATGGCATTACTTCGACCTTCATC	GCTTGAATAATAACGGAGCCACC	58	530	CAPS / <i>MnlI</i>
Vf_PIF3	TAGAGAGAAGCTTGGGAATGAGACT	GCGGATATAACTGATTTGTGCTAGC	58	580	-
Vf_TICa	CTTCCCTCCGGCGAAAGTTTTTA	CGGTCTCGGTCTTTTCCTCTTT	58	800	CAPS / <i>PstI</i>
Vf_TT8	AAGAAGAACCACACACTACTCTCAAAC	TCAATTTTCCCACAAAGCATCAC	60	620	SNP / <i>Cegen</i>
Vf_LHY	CGATCACACTTGACACTTCAAC	GAATTTTGCATGACTCCTG	58	370	CAPS / <i>MnlI</i>
Vf_CO	CAACACTATTCTGCCGTTCTGAC	TCCGTAACCACAGTACGATATCTCC	58	710	CAPS / <i>AccI</i>
Vf_COP1	CAAATCAGGAGGCCAGTGTCTAA	GACTGGCCGGCTAATATTTCTCA	58	400/430	ALP
Vf_CRY1	GTGATGCTCTGGTTGGCAGTATA	GTATCCATTAGTGGTAGTCTTGC	58	670	CAPS / <i>AfaI</i>
Vf_CRY2	GACCGGATATCCTTTAGTTGATGCA	CACCTGCTAATGGATTCACATCAC	58	1150	CAPS / <i>NmuCI</i>
Vf_ELF3	GGAAAGCCAGAAAAGAAATTGCCA	ACATCCAAAATCCAGTCGCTAGAAG	58	660	CAPS / <i>BseGI</i>
Vf_ELF4	GACCACAGTTTATTCACCGTCTTCC	TACAAGGACACAACACAAGAGACC	58	610	-
Vf_FD	CTCTCAGTTTAAACACTCGGCCT	GGAGCTGTTAATGTTGATGTAAGC	58	650	CAPS / <i>MboI</i>
Vf_FKF1	CGGTTATCGTGCTGAAGAAGTTC	ATGGACCTCGACTGCAAGAAA	58	860	SNP / <i>Cegen</i>
Vf_FT	TGGTTGTGAGCTTAAACCTTCCCA	CGGTAGTTGCTGGAATATCAATCAC	58		ALP
Vf_TFL1*	GGATTGTGACAGATATCCAGGAAC	CGGTTTCTCTGAGCATTGAAGT	58	305	Internal
Vf_GI	CAATTTGCCGACGATATTGCTG	ACAGGGGCAGCCAACAAAATAT	58	900	-
Vf_LFY	CTCATTCAAGTTCAAGCCATCGC	GTGAACATAGTGTCTATTTTCGGC	58	550	Internal
Vf_LUX	ATGGGGGAAGAGATACGAACAGA	ATTAGGAGACATGTGAGGGTGAGA	58	880	CAPS / <i>TaqI</i>
Vf_PHYA	GGAAACCGAACAAGCGAATCG	ATACCCTCTCAGATTCTAGCACA	58	650	SNP / <i>Cegen</i>
Vf_PHYB	GTGGACAAGCTTCTTTCTCATGC	CCGGGCCAAAAGTCTTCATTTT	58	740	CAPS / <i>AluI</i>
Vf_PHYE	AGTACGGGACATTGCTCTAGAAAG	ACTGGACTTCGCCGTTCAATAC	58	950	CAPS / <i>BseJI</i>
Vf_SOC1	CGGAGATGGTTTAGGGAGTTGTT	AGCCTAGTATTTTCATCAACTAGGG	58	330	CAPS / <i>SspI</i>
Vf_SVP	CCGAGGGAATACTTGAAAGGCA	TGTTTTCTATTACAGACCCAAGCC	58	300	CAPS / <i>Cac8I</i>
Vf_TEM	GCTCCCTTCTCCAAATACAAAGG	CCAGTAGACCGTTGAAAACAACTG	58	650	CAPS / <i>ApoI</i>
Vf_TOC1	CCGATGCTGCTGTTATTGAGGAA	AGGCTGATGACTCTCCAATTCTTAG	58	550	CAPS / <i>HindIII</i>

(-): No polymorphism or failure of genotyping techniques.

(*): Based on the sequence published by

Avila, C.M., Nadal, S., Moreno, M.T. et al. Development of a Simple PCR-based Marker for the Determination of Growth Habit in *Vicia faba* L. using a Candidate Gene Approach. *Mol Breeding* 17, 185–190 (2006). [i.org/10.1007/s11032-005-4075-4](https://doi.org/10.1007/s11032-005-4075-4)

Avila, C.M., Atienza, S.G., Moreno, M.T. et al. Development of a new diagnostic marker for growth habit selection in faba bean (*Vicia faba* L.) breeding. *Theor Appl Genet* 115, 1075 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0633-y>

Supplementary Table 4. BLASTp hits in *Arabidopsis* obtained with the flanking *kwon* QTLs.

Marker	At gene	Gene description	Query	E-value	Identity
Mtr1g116330	AT5G19900	PRLI-interacting factor	91%	2.00E-120	49.25%
Mtr2g039960	AT3G13920	EIF4A1 eukaryotic translation initiation factor 4A1	100%	0.0	91.55%
Mtr3g096560	AT5G63960	DNA polymerase delta subunit 1	60%	0.0	82.58%
Vf_c120857 (Mtr3g449590)	AT4G23820	Pectin lyase-like superfamily protein	95%	0.0	75.81%
1947_02 (Mtr4g132540)	AT1G62310	transcription factor jumonji (jmiC) domain-containing protein	80%	0.0	56.97%
Mtr7g024320	AT2G39570	ACR9 ACT domain-containing protein	100%	0.0	62.86%
Mtr7g084800	AT1G12900	GAPA-2 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2	100%	0.0	87.41%
Vf_Mtr7g104870	AT4G18590	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	100%	2.00E-46	59.43%

Supplementary Table 5. Physical positions of FT genes in the *M. truncatula* genome.

Gene ID	<i>M. truncatula</i> loci	Start	End
<i>FTb1</i>	Mtr7g006630	773,969	776,655
<i>FTb2</i>	Mtr7g006690	814,053	817,876
<i>V. faba</i> marker mapped	Mtr7g084800	32,728,658	32,732,065
<i>FTa1</i>	Mtr7g084970	32,843,544	32,845,578
<i>FTa2</i>	Mtr7g085020	32,863,015	32,865,871
<i>FTC</i>	Mtr7g085040	32,874,550	32,877,433
<i>FTK</i>	Mtr7g115340	47,649,200	47,656,123

CAPÍTULO IV

Estudio y localización de QTLs para caracteres morfológicos y reproductivos implicados en la Autofertilidad de habas

En preparación

Resumen

El gran potencial productivo del haba (*Vicia faba* L.) se ve limitado por la alogamia parcial del cultivo, variando entre polinización cruzada y autopolinización. La ausencia de polinización debido al uso excesivo de insecticidas o el calentamiento global puede llevar a un descenso de la producción, debido a la falta de autofertilidad. La autofertilidad describe la habilidad de las flores de autofecundarse en ausencia de polinizadores o de perturbación mecánica y esta capacidad puede asegurar la producción del cultivo. Este estudio aprovecha el conocimiento previo sobre la autofertilidad en habas para desarrollar un análisis minucioso y pionero sobre la estructura genética de este carácter. Para ello, hemos combinado los porcentajes de formación de vainas y semillas de una población RIL segregante para autofertilidad en diferentes ambientes y años con las evaluaciones de caracteres morfológicos de la flor y del polen (producción y viabilidad) para desarrollar el primer análisis de QTL e identificar las regiones genómicas que afectan a la autofertilidad en las habas. El análisis reveló 19 QTLs co-localizando en seis regiones genómicas. La co-localización fue particularmente evidente entre los caracteres florales cuyos QTLs se agruparon en los cromosomas I, II y V, mientras que los QTLs de los cromosomas III, IV y especialmente VI, revelaron co-localizaciones entre características florales y la producción de vainas y semillas. El porcentaje de la variación explicada por los QTLs osciló entre 8,9 para la longitud del estilo (LE) y 25,7 para el ángulo del estigma (ANG_ESTIG). En tres de los QTLs que explicaban mayor porcentaje de variación fenotípica ($R^2 > 20$), los alelos procedían del parental autofértil Vf27. También se analizaron las funciones de los genes candidatos flanqueantes, un recurso valioso para su futura validación. Nuestros resultados se suman a la comprensión de la autofertilidad de las habas y ayudarán en la identificación de los genes responsables que aceleren la mejora genómica en este cultivo.

1. Introducción

Con una producción de 5.4 millones de toneladas (FAOSTAT 2019), las habas (*Vicia faba* L), son la cuarta legumbre más cultivada en el mundo tras el garbanzo (*Cicer arietinum*), el guisante (*Pisum sativum*) y la lenteja (*Lens culinaris*). Este cultivo está presente en distintas regiones de Asia, África, Oriente Medio y Australia, siendo usado tanto para consumo humano como animal. Esta leguminosa se distingue por su alto contenido proteico y su elevado potencial productivo. Además, es utilizada en la rotación de cultivos, contribuyendo a la fertilidad del suelo mediante la fijación de nitrógeno. Sin embargo, esta especie presenta algunas desventajas que limitan la aplicación de herramientas moleculares en sus programas de mejora. El gran tamaño del genoma (13 Gbp) y la falta de un genoma de referencia dificultan la identificación de genes candidatos para caracteres deseables útiles para la mejora asistida por marcadores.

El potencial productivo de las habas es variable. Aparte de estreses bióticos y abióticos, la productividad y estabilidad de la producción está limitada por su sistema reproductivo, intermedio entre polinización cruzada y autopolinización (Stoddard y Bond 1987). La polinización cruzada depende de polinizadores como abejas de la miel, abejas solitarias o abejorros y la baja tasa de visitas ha sido relacionada con una producción inestable así como una baja formación de vainas y semillas (Stoddard y Bond 1987; Guen et al. 1992; Cunningham y Le Feuvre 2013; Bishop et al. 2016a). El porcentaje de polinización cruzada va desde el 4 al 84% (media de 30-60%), y este depende principalmente de factores genéticos y ambientales (Bond y Pope 1974; Link 1990; Suso y Moreno 1999). Una escasa polinización puede limitar su potencial productivo, debido a la falta de autofertilidad (Stoddard y Bond 1987; Köpke y Nemecek 2010). La autopolinización puede depender también de la visita de un polinizador que manipule la flor (tripping).

La capacidad de la flor de fecundarse en ausencia de insectos polinizadores o de perturbación mecánica ha sido definida como autofertilidad (Drayner 1959). En

habas se han descrito dos tipos de autofertilidad: la "autofertilidad heterótica" de los híbridos F1 resultantes de un cruce y la "autofertilidad fija (o aditiva)" en líneas casi isogénicas (Stoddard y Bond 1987). El grado de autofertilidad (o autoesterilidad) difiere entre genotipos (Adcock y Lawes 1976; Link 1990; Robertson y El-Sherbeeney 1995). Los híbridos F1 son normalmente más autofértiles que las líneas puras, mostrando un mayor porcentaje de autofertilidad que sus parentales (Link 1990).

Aunque la polinización cruzada mejora la estabilidad del cultivo y la resistencia a estreses bióticos y abióticos (Link et al. 1994, 1996; Abdelmula et al. 1999; Gasim y Link 2007; Maalouf et al. 2008; Bartomeus et al. 2014), la selección para autofecundación puede asegurar la formación de vainas y semillas en ausencia o escasez de polinizadores (Adcock y Lawes 1976; Kambal et al. 1976; Torres et al. 1993a). Varios estudios previos usaron diferentes parámetros para analizar la autofertilidad como son el número de semillas por flor, vainas por planta y semillas por planta (Drayner 1959; Rowlands 1964). Stoddard (1986) utilizó diferentes parámetros para describir la autofertilidad, como la incidencia y efectividad de la polinización, la incidencia de la fertilización en flores y óvulos y el índice de fertilización. Link (1990) simplificó el análisis de autofertilidad medida como el número de vainas con semillas por el número estandarizado de flores. Más recientemente, Puspitasari (2017) cuantificó el nivel y variación de autofertilidad en el germoplasma de variedades de invierno y realizó un estudio de asociación para diferentes caracteres (p.e. posición de la primera flor, fecha de floración, peso de la planta, producción de semillas y peso de 100 semillas). Aunque encontró correlaciones significativas entre algunos caracteres agronómicos y caracteres relacionados con la autofertilidad, no identificó QTLs significativos.

La selección para altos niveles de autofertilidad (autofecundación) o polinización cruzada suele estar acompañada de cambios en caracteres florales relacionados con los polinizadores y la morfología de la flor, y estos cambios van en direcciones opuestas (Susó y Maalouf 2010; Susó y del Río 2014). Diferentes

características florales han sido relacionadas con la autofertilidad en habas, incluyendo la calidad y cantidad de polen, el ángulo estilo-ovario, la longitud de las papilas del estigma, el grosor y dureza de la cutícula que conserva el exudado estigmático, y la cantidad de este exudado (Kambal et al. 1976; Chen et al. 2006; Chen 2009).

Mientras que la necesidad de la liberación del exudado para que germine el polen y se inicie la polinización es evidente, la importancia de muchas de estas características no está aún clara. Kambal et al. (1976) describieron que las líneas puras más autofértiles mostraron ángulos estilo-ovario más abiertos, estilo más corto, menor número y longitud de pelos en el estilo y papilas estigmáticas y crestas más suaves en el interior de la quilla. En cuanto a la cantidad de polen, aunque los híbridos F1 producían más granos de polen que las líneas parentales, dichos autores observaron una asociación entre autofertilidad y baja cantidad de polen en líneas puras. Lord y Heslop-Harrison (1984) también observaron que la línea autofértil usada en su trabajo presentaba pocas papilas estigmáticas en el extremo receptivo del estigma, con una cutícula relativamente delgada, mientras que la línea autoestéril tuvo papilas más largas y una cutícula más gruesa. La línea con autofertilidad parcial presentaba características intermedias. Un trabajo más reciente de Chen (2009) describió asimismo un ángulo estilo-ovario más abierto, estilos más largos, menor número de papilas estigmáticas que eran, a su vez, más cortas y mayor producción de polen en los grupos autofértiles. También detalló que la liberación del exudado tras la ruptura de la cutícula estigmática se producía antes de la anthesis en líneas autofértiles. Aparte de los caracteres florales, otros estudios han asociado la limitación de agua o el estrés por calor con una reducción de la autofertilidad en habas (Lord y Heslop-Harrison 1984; Stoddard 1986; Bishop et al. 2016b; Stoddard 2017).

A pesar del gran número de estudios sobre autofertilidad y caracteres florales co-segregantes llevados a cabo, aún no se conoce como se heredan dichos caracteres (p.e. como una unidad o independientemente), qué caracteres florales o

parámetros reproductivos están implicados en la respuesta a la selección para autogamia y cual es su localización en el mapa genético de habas. Por ello, nuestro objetivo fue desarrollar un estudio completo de la autofertilidad en habas mediante: (i) la evaluación de diferentes caracteres asociados con el cuajado de vainas y semillas en una población recombinante (RIL) que segrega para autofertilidad, en diferentes ambientes (jaulón y campo abierto) y años, (ii) la evaluación de diferentes componentes de la estructura de la flor que se considera afectan a la autofertilidad (p.e. calidad y cantidad del polen, ángulo estilo-ovario, longitud de las papilas estigmáticas, etc.) y, (iii) el desarrollo del primer análisis de QTL para localizar las regiones cromosómicas que afectan significativamente a la variación de estos caracteres en la población RIL mencionada. Los resultados obtenidos aportan un mayor conocimiento de la autofertilidad en habas y ayudarán a la identificación de sus genes responsables para la futura mejora genómica de este cultivo.

2. Material y Métodos

2.1. Material Vegetal

Para el estudio de la autofertilidad se usó una población RIL resultante del cruce entre las líneas parentales Vf6 y Vf27. La población consiste en 124 líneas F8-F9 que ya han sido objeto de estudio en trabajos previos para identificar QTLs que controlan la fecha de floración (Cruz-Izquierdo et al. 2012; Aguilar-Benitez et al. 2021) o la dehiscencia (Aguilar-Benitez et al. 2020b), entre muchos otros. El parental Vf6 es una semilla tipo equina muy autoestéril mientras que Vf27 es tipo paucijuga muy autofértil, originaria de la India y considerada cercana al ancestro silvestre (Cubero y Suso 1981).

2.2. Evaluación de campo

La evaluación se realizó en el centro IFAPA Alameda del Obispo (Córdoba, España) durante cinco campañas agronómicas (2008-2009, 2009-2010, 2010-2011, 2012-2013 y 2014-2015). Las evaluaciones se realizaron en dos ambientes: bajo jaulones anti-insectos (años 2008-2009, 2009-2010 y 2014-2015) y/o en campo abierto (2009-2010, 2010-2011 y 2012-2013). Solo la campaña 2009-2010 se evaluó en ambos ambientes. Se sembraron diez semillas de cada RIL y de sus líneas parentales en un diseño completamente al azar con dos repeticiones. Se seleccionó un mínimo de cinco plantas por línea y repetición en cada campaña para evaluar, en diez nudos, los siguientes caracteres: número de flores por nudo (FN), número de vainas por nudo (VN), el porcentaje de vainas cuajadas por flor (%VF, medido como el número de vainas/número de flores x 100), óvulos por ovario (OV), semillas por vaina (SV) y el porcentaje de formación de semillas o semillas-óvulo (%SO, número de semillas por vaina/número de óvulos por ovario x 100). OV, SV y %SO no se evaluaron en 2010-2011 ni 2014-2015. En cada planta se obtuvo la media de los diez nudos para cada carácter.

Los análisis estadísticos se realizaron en la plataforma R v.3.6.1 (R Development Core Team 2020), usando el paquete lme4 (Bates et al. 2015). Se usaron modelos lineales generalizados mixtos (a partir de ahora GLMMs, de sus siglas en inglés) usando %VF y %SO como variables dependientes de tipo binomial (éxito = número de vainas o semillas; fracaso = número de flores-número de vainas o número de óvulos-número de semillas, respectivamente), año y ambiente como factores fijos y repeticiones como factores aleatorios anidados dentro de ambiente y año. Para analizar las diferencias entre ambientes en 2009-2010 también fueron analizados con GLMMs, se usó el porcentaje de cuajado de vainas y de semillas como variable dependiente de tipo binomial, ambiente como factor fijo y repeticiones como factor aleatorio anidado dentro del ambiente.

2.3. Tamaño del polen y cuantificación de la producción

Se recogieron cinco botones florales de aproximadamente 16-17 mm para cada línea parental y RIL y se conservaron en FAE (3.7% formaldehído, 5% ácido acético, 50% etanol) hasta que se realizó su análisis. Las flores fueron diseccionadas; diez anteras se depositaron en 1 ml de solución isotónica (Isoton II, Beckman, Fullerton, CA, USA) y se sonicaron durante 30 minutos para facilitar la liberación del polen. Las muestras se diluyeron en 50 ml de Isoton II y se analizaron en un contador de partículas (Coulter Multisizer III, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) para medir el ancho ecuatorial de los granos de polen (a partir de ahora, tamaño del polen) y el número total de partículas de un tamaño determinado (producción de polen). El rango de tamaño utilizado para la medición se estableció entre 15-50 μm . El tamaño del polen normal de habas en su plano ecuatorial es de aproximadamente 30 μm (Poulsen y Martin 1977), por lo que las partículas dentro del rango 27-38 μm fueron consideradas como polen normal y el resto como anormal. Finalmente, se consideraron las siguientes variables: cantidad de polen total en el rango 15-50 μm (PTOTAL), cantidad de polen de tamaño normal (PNORMAL), porcentaje de polen normal (%PNORMAL), tamaño medio de los granos de polen en el rango completo (TPTOTAL), tamaño medio del polen normal (TPNORMAL) y el ratio de TPNORMAL dividido por TPTOTAL (RATIO_TP). Todas las medidas se realizaron en el servicio de Herbario del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) de la Universidad de Sevilla, España.

Las diferencias entre las líneas parentales fueron analizadas con modelos lineales generalizados (GLMs), asumiendo errores de Poisson (log link function) de las variables PTOTAL y PNORMAL, y errores binomiales (logit link function) para %PNORMAL. Los modelos fueron ajustados usando errores quasi-binomiales y quasi-Poisson debido a la sobre-dispersión de los datos (Crawley 2007). El tamaño de polen fue analizado mediante test paramétricos (ANOVA, TPNORMAL) y no paramétricos (prueba Wilcoxon, TPTOTAL) en base a la normalidad de los datos. Todos los análisis se realizaron en R.

2.4. Viabilidad del polen y receptividad del estigma

Con el objetivo de conocer si existe una relación entre el tamaño del polen y su viabilidad, se utilizaron tres plantas de cada línea parental y en cada una de ellas se recogieron diez flores de dos tamaños (17-18 mm y 20-21 mm, cinco flores de cada tamaño). Posteriormente se seleccionaron al azar tres anteras por flor, que se aplastaron y tiñeron con carmín acético. Se contó el número de granos de polen viables (rojo oscuro) y no viables (rojo claro o sin teñir) en tres campos de visión y se midió su tamaño en el microscopio. Para evaluar las diferencias entre las líneas parentales se realizó un GLMM utilizando la viabilidad del polen como variable dependiente de tipo binomial (éxito = número de granos de polen viables; fracaso = número de granos de polen no viables), línea y tamaño de flor fueron usados como factores fijos y los campos de visión anidados dentro de la muestra de flor dentro de planta como variable aleatoria. Las diferencias entre las líneas parentales para tamaño de polen (log transformado) y tipo de polen (normal vs anormal) fueron analizadas mediante un análisis ANOVA de dos vías.

Para evaluar la receptividad del estigma, se recogieron diez flores de cada línea parental en cuatro fases del desarrollo (botón, pre-antesis, antesis y antesis tras realizar tripping). Las flores se diseccionaron inmediatamente y los estilos fueron introducidos en tubos de 0,2 µl que contenían agua destilada y un trozo de papel de Peroxtesmo KO (MACHEREY-NAGEL, Düren, DE). Los estigmas receptivos se caracterizan por una elevada actividad enzimática y el Peroxtesmo detecta la presencia de peroxidasa, una indicación fiable de su receptividad (Dafni y Maués 1998). Tras diez minutos de incubación a temperatura ambiente, se observaron los estilos en un microscopio estereoscópico para identificar un cambio de color en la superficie del estigma que indicaría la presencia de peroxidasa.

2.5. Medidas morfológicas de la flor, ovario y estilo

Se recogieron diez flores de 21-26 mm de cada línea parental y RIL que se conservaron en FAE hasta su análisis. Se realizó una fotografía de la flor completa para medir su longitud. A continuación, las flores fueron diseccionadas para extraer su pistilo, fotografiarlo y realizar las siguientes medidas utilizando el software ImageJ (Schneider et al. 2012): longitud de la flor (LF), longitud del ovario (LO), longitud del estilo (LE), longitud del ápice (LA) y el ángulo estilo-ovario (AEO) (**Figura suplementaria 1**). Además, para manejar la misma escala, todas las medidas fueron estandarizadas considerando la longitud de la flor y posteriormente se incluyeron en los análisis. Puesto que todas las variables fueron continuas, las diferencias entre las líneas parentales fueron analizadas con tests paramétricos y no paramétricos, dependiendo de si las variables estaban normalmente distribuidas o no.

2.6. Medidas del estigma en el Microscopio Electrónico de Barrido

Para cada línea parental y RIL se tomaron de cinco a diez flores y se conservaron en FAE. Las flores se diseccionaron y los ovarios se re-hidrataron en series crecientes de etanol/agua desde 50% hasta 100% de etanol. Posteriormente se secaron mediante el secador de punto crítico automático Leica EM CPD300. Las muestras se cubrieron con oro y se fotografiaron en los microscopios electrónicos de barrido JEOL JSM 6300 y JEOL JSM 7800F, disponibles en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. A partir de las fotos se evaluaron las siguientes medidas: longitud del estigma (LESTIG), longitud de la ruptura (LRUPT), porcentaje de ruptura (%RUPT, medido como $LRUPT/LESTIG \times 100$), área estigmática (AESTIG), área ruptura (ARUPT), porcentaje del área de ruptura (%ARUPT o $AESTIG/ARUPT \times 100$), número de papilas en la línea vertical del estigma o LESTIG (NPAP), longitud de la papila (LPAP), ancho de la papila (APAP), ratio longitud/ancho de la papila (LARATIO_PAP), número de papilas entre

la longitud del estigma (NPAP/LESTIG), densidad de papilas (DPAP, número de papilas en 6 mm²) y ángulo del estigma (ANG_ESTIG) (ver **Figura Suplementaria 2**). Para realizar todas las medidas se utilizó el software ImageJ. La longitud y ancho de la papila se obtuvo del promedio de tres medidas.

2.7. Análisis de QTL

Usando el mapa genético previo (Aguilar-Benitez et al. 2021) se realizó un análisis de QTL utilizando el software MapQTL v5.0 (van Ooijen 2004). Primero se realizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis para detectar la asociación entre los marcadores moleculares y los caracteres fenotípicos. A continuación, se utilizó la herramienta Interval Mapping (IM) (Lander y Botstein 1989; van Ooijen 1992) para la identificación de posibles QTLs en cada grupo de ligamiento (de sus siglas en inglés, LG). Los marcadores con $P = 0,01$ se usaron como cofactores en el análisis de QTL múltiple (MQM) (Jansen 1993, 1994; Jansen y Stam 1994). Para determinar el nivel de significación de un QTL se utilizó el test de permutaciones usando 1000 réplicas (Churchill y Doerge 1994) implementado en el programa MapQTL v5.0. Solo los QTLs con un valor de LOD mayor que el P -value obtenido en el test de permutaciones se consideraron significativos. Para la representación de los QTLs se utilizó el software MapChart (Voorrips 2002). Los intervalos de QTL fueron definidos como LOD-1 y LOD-2 alrededor del LOD máximo del QTL.

3. Resultados

3.1. Evaluación de campo

Los resultados para flores por nudo (FN), vainas por nudo (VN), vainas-flor (%VF), óvulos por ovario (OV), semillas por vaina (SP) y semillas-óvulo (%SO) de cada campaña agronómica se muestran en la **Tabla 1**. La media de flores por nudo fue mucho mayor en la línea Vf6 (7,65 flores \pm 0,50; media \pm error estándar) que en Vf27 (1,23 flores \pm 0,07). Por otro lado, la media de vainas por nudo fue similar

en ambos genotipos (0,54 vainas \pm 0,13 para Vf6 y 0,53 vainas \pm 0,10 para Vf27). Por tanto, el porcentaje de vainas-flor (%VF) es mucho mayor en la línea Vf27 (44,19% \pm 8,95) que en Vf6 (6,81% \pm 1,51). En cuanto al número de óvulos y semillas, Vf6 mostró menor número (2.41 óvulos \pm 0.38; 1.88 semillas \pm 0.40) que Vf27 (3.02 óvulos \pm 0.12; 2.93 semillas \pm 0.11), además, el porcentaje de cuajado de óvulos a semillas (%SO) fue mayor en Vf27 (96.03 \pm 1.54) que en Vf6 (77.74 \pm 7.99).

Tabla 1. Media \pm Error estándar (SE) de flores por nudo, vainas por nudo, vainas-flor, óvulos por ovario, semillas por vaina y semillas-óvulo para cada campaña agronómica y ambiente. J: evaluación en jaulón; C: evaluación en campo abierto.

	Vf6		Vf27		Vf6		Vf27		Vf6		Vf27	
	FLORES POR NUDO (FN)				VAINAS POR NUDO (VN)				VAINAS-FLOR (%VF)			
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
2008-2009J	6,67	0,50	1,38	0,14	0,53	0,11	0,83	0,05	7,78	1,70	64,25	6,41
2009-2010C	8,00	0,31	1,02	0,02	0,00	0,00	0,26	0,11	0,00	0,00	26,00	10,77
2009-2010J	8,76	0,20	1,19	0,08	0,63	0,08	0,66	0,15	7,10	0,85	59,63	14,28
2010-2011C	6,58	0,57	1,15	0,07	0,58	0,20	0,21	0,10	7,40	2,40	17,75	8,41
2012-2013C	8,81	0,21	1,17	0,04	0,99	0,09	0,78	0,04	11,29	0,94	67,31	3,43
2014-2015J	7,08	0,22	1,54	0,08	0,51	0,13	0,45	0,09	7,30	1,91	30,21	5,87

	ÓVULOS POR OVARIO (OV)				SEMILLAS POR VAINA (SV)				SEMILLAS-ÓVULO (%SO)			
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
2008-2009J	2.66	0.23	3.24	0.09	1.46	0.1	3.08	0.1	56.22	3.37	95.22	1.66
2009-2010J	2.48	0.12	2.68	0.14	2.24	0.1	2.62	0.14	90.64	2.12	97.72	0.97
2009-2010C	1.33	-	3.11	0.23	1.00	-	3.00	0.19	75.00	-	92.11	1.04
2012-2013C	3.15	0.08	3.06	0.13	2.80	0.09	3.03	0.12	89.11	1.72	99.10	0.65

La campaña 2009-2010 fue evaluada para ambos ambientes (campo abierto y jaulón). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas para el cuajado de vainas ($P < 0,001$) y la formación de semillas ($P < 0,05$) entre ambientes

($P < 0,001$), y sorprendentemente, con valores mayores para ambos caracteres en las plantas crecidas dentro de jaulón frente a las de campo abierto (**Figura 1**).

Figura 1 no mostrada (pendiente de publicación)

Teniendo en cuenta los datos de todas las campañas, y solo incluyendo como variable fija el ambiente, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de vainas-flor y semillas-óvulo entre campo y jaulón (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando el año (campaña agronómica) fue considerado en el modelo detectamos diferencias significativas entre ambientes y años (**Tabla 2, Figura 1**). En concreto, para %VF, las campañas 2012-2013 y 2014-2015 fueron significativamente diferentes a 2008-2009, mientras que 2009-2010 y 2010-2011 fueron similares a la campaña 2008-2009. Para %SO, las campañas 2009-2010 y 2012-2013 fueron significativamente diferentes a la campaña 2008-2009 (**Tabla 2, Figura 1**).

Tabla 2. Resultados del análisis GLMM del efecto del ambiente y campaña (año) para vainas-flor (%VF) y semillas-óvulo (%SO). El modelo fue ajustado usando las repeticiones anidadas dentro del ambiente y año como factor aleatorio. Las estimaciones de los parámetros para el nivel de factores fijos se calcularon utilizando "jaulón" como referencia para la condición variable y "2008_09" para la variable año.

Condición	Vainas-flor (%VF)			Semillas-óvulo (%SO)		
	Estimado ± SE	z	P	Estimado ± SE	z	P
Campo abierto	-0,31 ± 0,13	-2,37	0,0178 *	-0,8 ± 0,29	-2,75	0,006 **
Año						
2009-10	0,17 ± 0,11	1,523	0,1278	2,25 ± 0,27	8,268	< 0,001 ***
2010-11	0,27 ± 0,17	1,581	0,1139	-	-	-
2012-13	0,71 ± 0,17	4,216	< 0,001 ***	2,68 ± 0,38	6,974	< 0,001 ***
2014-15	-0,50 ± 0,11	-4,512	< 0,001 ***	-	-	-

3.2. Tamaño del polen y cuantificación de la producción

Se encontraron diferencias significativas entre las líneas parentales en la producción total de polen (PTOTAL) ($P < 0,01$). Vf6 presentó más del doble de polen que Vf27, con 22.837 ± 2.011 y 11.184 ± 1.859 granos de polen por flor,

respectivamente. La producción media de las RILs fue 19.102 ± 491 con un mínimo de 8.432 granos de polen (RIL75) y un máximo de 32.744 granos de polen (RIL03).

El tamaño de los granos de polen (TPTOTAL) fue diferente entre líneas parentales ($P < 0,01$). Para Vf6 fue de $22,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$, mientras que para Vf27 fue de $30,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$. El tamaño medio de grano de polen para las RILs fue de $26,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$, con un mínimo de $20,0 \mu\text{m}$ (RIL16) y un máximo de $32,6 \mu\text{m}$ (RIL77).

Puesto que el diámetro ecuatorial del grano de polen ha sido descrito en $30 \mu\text{m}$ aproximadamente (Poulsen y Martin 1977), analizamos más atentamente algunas líneas que habían presentado valores medios más bajos de lo esperado. En la **Figura 2** se muestra el número de granos de polen encontrados en el rango $15-50 \mu\text{m}$ en cinco muestras de los parentales Vf6 y Vf27. Ambas líneas mostraron un pico cercano al tamaño de polen esperado en esta especie ($27\sim 38 \mu\text{m}$), que a partir de ahora se considerará como polen normal; sin embargo, Vf6 mostró además una gran cantidad de granos de polen con tamaños más pequeños (a partir de ahora considerado como polen anormal).

Para calcular la producción y el tamaño del polen normal en las muestras, restringimos el tamaño a $27-38 \mu\text{m}$. En este rango, la cantidad de polen (PNORMAL) siguió siendo diferente entre líneas parentales ($P < 0,01$). Vf27 mostró más del doble de cantidad de polen normal (10.100 ± 1.644) que Vf6 (4.934 ± 308). La cantidad media de polen normal de las RILs fue 11.001 ± 527 con un mínimo de 1.676 (RIL117) y un máximo de 24.656 granos de polen (RIL02). El tamaño del polen normal (TPNORMAL) también mostró diferencias significativas entre líneas parentales ($P < 0,001$) con mayores tamaños en Vf6 ($33,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$) que en Vf27 ($31,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$). La media de tamaño de polen normal de las RILs fue de $32,6 \pm 0,05 \mu\text{m}$.

Figura 2 no mostrada (pendiente de publicación)

3.3. Viabilidad del polen y receptividad del estigma

El análisis GLMM confirmó las diferencias significativas en el porcentaje de polen viable entre los parentales ($P < 0,001$) con una mayor proporción de polen no viable en Vf6 que en Vf27, mostradas en la **Figura 2**. No se detectaron diferencias entre los dos tamaños de flor analizados, pero la interacción línea:tamaño de flor fue significativa ($P < 0,001$), indicando que la viabilidad del polen en Vf6 es menor en las flores de mayor tamaño (**Figura Suplementaria 3**). Por otro lado, el análisis ANOVA de dos vías mostró diferencias en el tamaño y tipo de polen entre parentales ($P < 0,001$). Esto indica que el tamaño de polen de Vf6 es mayor que el de Vf27 (como se mencionó anteriormente), y que los granos de polen viables fueron significativamente mayores que los no viables en ambas líneas parentales (**Figura Suplementaria 4, Tabla Suplementaria 1**).

El análisis de la receptividad del estigma mediante tinción se realizó en diez flores y cuatro etapas del desarrollo: botón floral, pre-antesis, antesis y antesis tras realizar tripping. El estigma de la línea parental Vf27 fue siempre receptivo, tiñéndose en las muestras de las cuatro etapas mientras que en Vf6 se mantuvo mayormente sin teñir (resultados no mostrados). Solo se tiñeron algunos estigmas en antesis tras el tratamiento de tripping (tres de diez muestras) (**Figura Suplementaria 5**).

3.4. Medidas morfológicas de las flor, ovario y estilo

Las medidas de longitud para flor, ovario y estilo fueron significativamente mayores en el parental Vf6 que en Vf27 (**Tabla 3**), mientras que la longitud del ápice fue similar entre ambas líneas. Por ello decidimos estandarizar todas las medidas morfológicas eliminando los efectos causados por la diferencia en el tamaño de flor. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias entre las medidas estandarizadas, lo que indica que la morfología de las flores es proporcionalmente similar entre las líneas parentales.

El carácter más interesante fue el del ángulo estilo-ovario (AEO), que varió significativamente entre los genotipos parentales. Vf6 mostró ángulos más agudos ($\sim 79^\circ$) que Vf27, con ángulos más abiertos ($\sim 96^\circ$). En la población RIL, el ángulo más agudo fue observado en la RIL119 ($75,65^\circ$) mientras que el más amplio se observó en la RIL14 ($100,77^\circ$).

Tabla 3. Media \pm error estándar (SE) para longitud (cm) de la flor (LF), longitud (cm) del ovario (LO), longitud (cm) del estilo (LE), longitud (cm) del ápice (LA), ángulo ($^{\circ}$) estilo-ovario (AEO) y sus estandarizaciones por longitud de flor para Vf6, Vf27 y la población RIL. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas parentales (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

	Vf6			Vf27			Población RIL	
	N	Media	SE	N	Media	SE	Rango (Min-Max)	Media \pm SE
LF** (cm)	22	24,02	0,32	11	22,27	0,36	22,19 – 25,65	23,80 \pm 0,05
LO*** (cm)	22	14,67	0,14	11	13,41	0,18	12,65-15,33	14,24 \pm 0,05
LE*** (cm)	22	3,93	0,03	11	3,63	0,03	3,28-4,40	3,84 \pm 0,02
LA (cm)	22	1,42	0,03	11	1,37	0,03	1,09-1,72	1,35 \pm 0,01
AEO*** ($^{\circ}$)	22	79,24	0,54	11	95,63	1,13	75,65-100,77	85,69 \pm 0,45
LO/LF	22	0,61	0,00	11	0,60	0,00	0,55-0,66	0,60 \pm 0,002
LE/LF	22	0,16	0,00	11	0,16	0,00	0,15-0,18	0,16 \pm 0,001
LA/LF	22	0,06	0,00	11	0,06	0,00	0,04-0,07	0,06 \pm 0,00

3.5. Medidas del estigma en el Microscopio Electrónico de Barrido

La longitud y área del estigma fueron significativamente mayores en Vf6 que en Vf27 ($P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente). No se encontraron diferencias en cuanto a LRUPT o ARUPT ni en sus respectivos porcentajes, %RUPT y %ARUPT (**Tabla 4**). El número de papilas, su longitud y anchura fueron significativamente mayores en Vf6 que en Vf27, mientras que LARATIO_PAP o el número de papilas dividido entre la longitud del estigma (NPAP/LESTIG) fueron similares en ambos parentales. La densidad de papilas (DPAP) fue significativamente mayor en Vf6 que en Vf27 ($P < 0,001$). Finalmente, el ángulo del estigma también mostró diferencias entre ambos genotipos, con ángulos más amplios en Vf6 que en Vf27 ($P < 0,001$, **Tabla 4**).

Tabla 4. Media \pm error estándar (SE) para la longitud (μm) del estigma (LESTIG), longitud (μm) de la ruptura (LRUPT), porcentaje de la ruptura (%RUPT), área (μm^2) del estigma (AESTIG), área (μm^2) de la ruptura (ARUPT), porcentaje del área de ruptura (%ARUPT), número de papilas (NPAP), longitud (μm) de la papila (LPAPL), ancho (μm) de la papila (APAP), ratio longitud/ancho de papila (LARATIO_PAP), número de papilas por longitud del estigma (NPAP/LESTIG), densidad de papilas (DPAP) (n° papilas/6 mm^2) y ángulo ($^\circ$) del estigma (ANG_ESTIG) para Vf6, Vf27 y la población RIL. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas parentales (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

	Vf6		Vf27		Población RIL	
	Media	SE	Media	SE	Rango (Mín-Máx)	Media \pm SE
Longitud (μm) del estigma (LESTIG)**	226,14	4,59	200,26	5,71	144,36 – 248,94	195,74 \pm 1,94
Longitud (μm) de la ruptura (LRUPT)	22,49	6,99	33,04	5,91	0 – 89,42	18,97 \pm 1,86
Porcentaje de ruptura (%RUPT)	10,09	3,18	16,76	2,90	0 – 38,07	9,35 \pm 0,86
Área (μm^2) del estigma (AESTIG)***	5.6350,69	1.755,11	40.248,23	1.110,68	21.127,9 – 69.665,6	40.166,6 \pm 769,7
Área (μm^2) de la ruptura (ARUPT)	3.158,60	1.167,04	2.540,60	987,49	0 – 9.648,4	1.793,0 \pm 189,8
Porcentaje del área de ruptura (%ARUPT)	5,92	2,26	6,53	2,58	0 – 25,5	4,5 \pm 0,46
Número de papilas (NPAP) ***	13,29	0,36	10,17	0,31	7 – 14,75	11,3 \pm 0,11
Longitud (μm) de la papila (LPAP)*	12,94	0,50	11,58	0,36	7,60 – 14,50	10,81 \pm 0,12
Ancho (μm) de la papila (APAP)*	8,08	0,17	7,40	0,23	4,85 – 8,98	7,03 \pm 0,07
Ratio longitud/ancho de papila (LARATIO_PAP)	1,60	0,05	1,57	0,03	1,24 – 2,16	1,52 \pm 0,01
Número de papilas/LESTIG (NPAP/LESTIG)	0,06	0,00	0,05	0,00	0,0435 – 0,0735	0,0590 \pm 0,0006
Densidad de papilas (n° papilas/6 mm^2) (DPAP)***	24,44	0,67	20,11	0,79	19,6 – 35,0	26,9 \pm 0,28
Ángulo ($^\circ$) del estigma (ANG_ESTIG)***	64,79	2,05	48,49	0,67	33,75 – 73,40	54,1 \pm 0,71

3.6. Análisis de QTL

Se detectaron 19 QTLs significativos (umbral de LOD $> 3,3$). Cinco de ellos, correspondientes a vainas-flor (%VF) y semillas-óvulo (%SO), se localizaron en los cromosomas III, IV, V y VI. Además, se detectaron seis QTLs para tamaño y producción de polen (cr. II, V y VI), siete para las medidas morfológicas (cr. I, III, IV y VI) y uno para las medidas de microscopio electrónico (cr. II) (**Figura 3, Tabla 5**). Se encontraron varios picos que no superaron el valor de LOD establecido pero que co-localizaban con QTLs significativos (**Figura 3, Tabla Suplementaria 2**).

Doce de los QTLs mostraron un efecto aditivo positivo, indicando que los alelos se originan en el parental femenino Vf6. En los restantes siete, los alelos derivan de la línea autofértil Vf27 y algunos de ellos presentan los valores más altos de variación fenotípica (p.e. ANG_ESTIG, LA/LF, %SO12-13_R2C y TTOTAL).

Cuatro de los cinco QTLs de los datos de campo fueron evaluados en jaulón: vainas-flor (%VF) en 2014-2015 y semillas-óvulo (%SO) en 2009-2010. Los QTLs para %VF se localizaron en los cr. III, IV y V, explicando el 14,1, 13,2 y 18,2% de la variación fenotípica del carácter, respectivamente; mientras que el QTL para %SO, en el cr. VI (%SO09-10_R1J), mostró un 15,8% de la variación. También encontramos un segundo QTL para %SO evaluado en campo abierto en 2012-2013 que co-localizó con %SO09-10_R1J con el mayor porcentaje de explicación de variación fenotípica de los QTLs para los caracteres florales y de polen.

Las medidas de polen revelaron dos zonas importantes en los cr. II y VI. En el cr. II, se localizaron tres QTLs en la misma posición (alrededor de los marcadores LG34b y Mtr3g049400), explicando entre el 11,3 y el 13,3% de la variación fenotípica de los caracteres RATIO_TP(1), %PNORMAL(1) y TPTOTAL(1). En el cr. VI, los caracteres PNORMAL(2) y TPTOTAL(2) mapearon muy cerca entre sí explicando el 10 y 17,6% de la variación fenotípica, respectivamente. Además, en el cr. V, se identificó otro QTL para cantidad de polen de tamaño normal, PNORMAL(1), explicando el 9,4% de la variación fenotípica. Respecto a las medidas morfológicas de la flor, la longitud del ovario (LO), longitud del ápice (LA), longitud del estilo (LE) y sus estandarizaciones mostraron valores de LOD significativos repartidos por los cromosomas I, III, IV y VI y explicaron entre un 8,9 (LE(2)) y un 20,1% (LA/LF) de su variación fenotípica. El único QTL para las medidas de microscopía electrónica (ángulo del estigma, ANG_ESTIG) en el cromosoma II, explicó el mayor de los porcentajes de la variación fenotípica de los caracteres estudiados (25,7%) (**Figura 3, Tabla 5**).

Figura 3 no mostrada (pendiente de publicación)

Figura 3 no mostrada (pendiente de publicación)

Figura 3 no mostrada (pendiente de publicación)

Además, se encontraron once putativos QTLs no significativos, pero cercanos al valor umbral, que co-localizaron con uno o varios de los QTLs significativos ya descritos (**Tabla suplementaria 2**). De estos, uno pertenece a evaluaciones de campo, dos a medidas del polen, seis a medidas morfológicas y dos a caracteres del estigma medidos bajo microscopio electrónico. Cuatro caracteres relativos a la morfología de la flor (LE/LF(3), LO(2), LO/LF(2) y LA) co-localizaron con otros caracteres del mismo tipo en los cromosomas I, III y VI, mientras que los dos restantes (AEO/LF y AEO) co-localizaron con la cantidad de polen de tamaño normal (PNORMAL) en el cromosoma V. Los QTLs no significativos para las medidas de polen (RATIO_TP(2) y %PNORMAL(2)) co-localizaron con el carácter morfológico LO en el cromosoma VI, mientras que los QTLs de medidas del estigma (NPAP y LESTIG) co-localizaron con el QTL significativo para ángulo del estigma (ANG_ESTIG) en el cromosoma II. Por último, FS08-09_R1J co-localizó con el QTL para la medida morfológica LE/LF(2) en el cromosoma VI.

Tabla 5. Lista de QTLs significativos para la población Vf6 x Vf27. Blanco: medidas de campo; verde: medidas del polen; azul: medidas morfológicas; rojo: medidas del estigma.

Carácter	QTL	Pico	Cr.	Marcadores flanqueantes	LOD	Efecto aditivo	R ²
Evaluaciones de campo	%VF14-15_R1J	184,859	III	Vf_Ein4	3,44	0,0522183	14,1
	%VF14-15_R2J(1)	439,630	IV	MTR1g106005(210)	3,64	-0,0475825	13,2
	%VF14-15_R2J(2)	557,567	V	Vf_MTR7g112740/Vf_MTR7g118320	3,41	0,0563514	18,2
	%SO09-10_R1J	202,410	VI	Mtr4g088524	3,69	-0,0280308	15,8
	%SO12-13_R2C	204,410	VI	Mtr4g088524/OPA11_4	4,52	-0,0251499	22,4
Medidas de polen	RATIO_TP(1)	795,357	II	LG34b/MTR3g049400	3,34	0,0353550	11,5
	%PNORMAL(1)	795,357	II	LG34b/MTR3g049400	3,36	8,17150	11,3
	TPTOTAL(1)	796,735	II	MTR3g049400	3,75	1,23320	13,3
	PNORMAL(1)	289,096	V	MTR7g050950	3,83	24,8395	9,4
	TPTOTAL(2)	189,393	VI	Mtr4g092820/Mtr4g091610b	4,60	-1,43284	17,6
PNORMAL(2)	192,178	VI	Mtr4g091610b	3,32	-18,5145	10,0	
Medidas morfológicas	LO/LF(1)	426,395	I	OPL12_2	4,36	0,00913200	14,8
	LA/LF	226,615	III	Vf_TT8/OPJ14	3,68	-0,00189393	20,1
	LE(1)	496,976	IV	MTR4g107940	4,82	0,0615140	13,2
	LE/LF(1)	532,928	IV	LOC109362751	3,64	0,00256029	12,5
	LO(1)	147,245	VI	OPL18_2/OPK09_2	3,39	0,225942	14,5
	LE/LF(2)	226,008	VI	Mtr4g088595	4,58	0,00293051	13,2
	LE(2)	295,070	VI	Mtr8g085280(81)	4,00	0,0564763	8,9
Medidas del estigma	ANG_ESTIG	819,677	II	MTR1g102900/OPJ09_5	4,59	-0,0267602	25,7

Se realizó una búsqueda BLASTp utilizando *Arabidopsis* como modelo con el objetivo de identificar los genes ortólogos que flanqueaban cada QTL y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla Suplementaria 3**.

4. Discusión

El cambio climático es uno de los temas más importantes de este siglo debido a su efecto en el incremento de la temperatura y concentración de CO₂ y en la alteración de los patrones de lluvia (IPCC 2007). Uno de los procesos claves afectados por la subida de temperatura es el éxito reproductivo vegetal (Hedhly et al. 2009; Stoddard 2017), ya sea directamente mediante alteraciones fisiológicas cruciales en las etapas de desarrollo (Porter et al. 2014) o, indirectamente mediante cambios en las interacciones planta-polinizador (Settele et al. 2016). El cambio climático puede causar, por ejemplo, un desacople entre el ciclo de los insectos y la fenología floral (Memmott et al. 2007) o cambios en la distribución poblacional de los polinizadores (Rasmont et al. 2015). Puesto que las habas tienen un comportamiento reproductivo intermedio entre polinización cruzada y autopolinización (y por lo tanto, cierta dependencia de polinizadores), el conocimiento de los caracteres que favorecen uno u otro modo de reproducción es de gran importancia en los programas de mejora.

Aunque la línea parental Vf6 produce mayor número de flores y un número similar de vainas que Vf27, el porcentaje de vainas-flor es mayor en la línea Vf27. Este hallazgo, junto con los altos valores de semillas-óvulo implica que Vf27 presenta mayor éxito reproductivo que Vf6. El análisis de vainas-flor y semillas-óvulo en toda la población RIL en los diferentes años y condiciones (jaulón y campo abierto) mostró importantes variaciones, además de confirmar el efecto significativo del ambiente en la producción. Es interesante observar que el análisis del año donde se evaluaron ambas condiciones reveló valores más altos para vainas-flor y semillas-óvulo en ausencia de polinizadores (jaulón) que en campo abierto. Bishop et al. (2020) encontró que los tratamientos de polinizadores generalmente mejoran la producción, pero en ciertos cultivares, la producción fue incluso más baja con la polinización adicional. La dependencia de polinización también varió entre condiciones de cultivo (jaulones o campo abierto), años y el

parámetro usado para la evaluación del rendimiento.

En cuanto a la producción de polen, la cantidad de polen en las líneas parentales y RILs (Vf6: 22,837; Vf27: 11,184; RILs: 19,102 granos de polen) estuvo dentro del rango definido en otros estudios (Chen 2009; Bailes et al. 2018) pero era diferente al reportado por Kambal et al. (1976). En relación al tamaño de polen, encontramos que el ancho ecuatorial del polen normal fue $\sim 33 \mu\text{m}$. Un resultado similar fue encontrado por Poulsen y Martin (1977), mientras que Kurkina et al. (2020) describió un tamaño de polen más pequeño ($24,5 \mu\text{m}$). Esto puede indicar cierta variabilidad en el tamaño de polen dependiendo de las variedades utilizadas. Nuestros datos revelaron otros resultados interesantes, así Vf6 produjo mayor cantidad de granos de polen, pero una gran proporción de estos ($> 70\%$) tuvieron un tamaño más pequeño del esperado para el polen normal. Además, en los test de viabilidad realizados se encontró que estos granos de polen más pequeños eran no viables. Por otro lado, a pesar de la baja producción de polen del parental Vf27, la cantidad y viabilidad del polen normal fue mayor que en Vf6. De forma similar, Chen (2009) encontró que los híbridos F1 y los segregantes para autofertilidad de un cruce entre K25 (autofértil) y D07 (autoestéril) mostraron mayores producciones de polen que las líneas autoestériles. Vf6 es una línea asináptica y esto puede ser la causa de la gran cantidad de polen no viable. Diferentes trabajos que incluyen líneas asinápticas mostraron alta cantidad de polen no viable en *V. faba* (Sjödin 1970) y *Solanum nigrum* (Singhal et al. 2012).

Los test de receptividad del estigma mostraron que la punta del estigma de la línea autoestéril Vf6 se mantuvo sin teñir incluso en antesis, y solo algunas flores se tiñeron tras el tratamiento de tripping; mientras que en Vf27 los estigmas fueron receptivos antes de la antesis e incluso sin manipulación. La receptividad del estigma de las líneas autofértiles previa a la antesis ha sido descrita por Chen (2009), estando la cutícula de las líneas autoestériles intacta incluso después de la

antesis, mientras que las autofértiles fueron ya receptivas en pre-antesis (Chen et al. 2011). Nuestros resultados confirman que la receptividad del estigma en líneas autofértiles está mejor sincronizada con la disponibilidad de polen (dado que las anteras dehiscen antes de la antesis). Por el contrario, las líneas autoestériles mostraron un desfase en la receptividad del estigma (un mayor grado de protandria) y por lo tanto, menor probabilidad de encontrar polen propio fresco y viable. Puesto que la adhesión, hidratación y germinación del polen es solo posible cuando se ha liberado el exudado estigmático, el momento de la ruptura de la cutícula estigmática es de gran importancia para la fertilización (Paul et al. 1978; Lord y Heslop-Harrison 1984). En este estudio, los valores medios para LRUPT y ARUPT obtenidos en el microscopio de barrido se mostraron ligeramente mayores en Vf27 que en Vf6, a pesar de no mostrar diferencias significativas. Por esto, nuestros datos no pueden confirmar una ruptura más temprana de la cutícula estigmática en la línea autofértil, posiblemente debido a errores de manipulación o a un número insuficiente de muestras en los análisis.

Los caracteres morfológicos como la longitud de la flor, del ovario y el estilo mostraron valores más altos en Vf6 que en Vf27. Un estilo más largo en la línea autoestéril también fue descrito por Kambal et al. (1976), mientras que Chen (2009) reportó un hallazgo contrario. Similar a lo mostrado en otros estudios, el ángulo estilo-ovario en la línea autoestéril Vf6 fue más cerrado que en la línea autofértil Vf27 (Kambal et al. 1976; Chen 2009). Kambal et al. (1976) hipotetizó que los ángulos más agudos podrían bloquear el pasaje ventral para el movimiento de polen en las líneas autoestériles, mientras que los ángulos más abiertos de las líneas autofértiles permitirían el paso de polen en este pasaje y favoreciendo su llegada al estigma. Por otro lado, la longitud del estilo, así como el ángulo estilo-ovario, podrían estar implicados en el acoplamiento entre la flor y los polinizadores (Suso y Moreno 2004).

Las medidas del estigma obtenidas en las fotografías del microscopio electrónico de barrido (LESTIG, AESTIG, NPAP, LPAP, APAP, DPAP y ANG_ESTIG) mostraron diferencias significativas entre líneas parentales. Para todos los caracteres, Vf6 mostró valores mayores que Vf27, los cuales pueden ser explicados por su mayor tamaño de flor. Por otro lado, la densidad media de papilas, medida por conteo en la misma área, fue mayor en Vf6 que en Vf27. Estos resultados son consistentes con los descritos por Kambal et al. (1976); Chen (2009) y Chen et al. (2011), donde se revela una mayor densidad y tamaño de las papilas en las líneas autoestériles que en las autofértiles. Kambal et al. (1976) también mencionó que las líneas autofértiles presentan mayoritariamente la punta del estigma libre de papilas, pero estos resultados no se corresponden con nuestros análisis (resultados no mostrados).

En este trabajo, analizamos varios componentes florales relacionados con la autofertilidad en la población RIL del cruce Vf6 x Vf27. También aprovechamos el fenotipado previo de seis caracteres que diseccionaban la transformación de flores en vainas y de óvulos en semillas en varias campañas agronómicas y ambientes: campo abierto (favoreciendo la polinización cruzada) y jaulones con malla anti-insectos (favoreciendo la autofertilidad). Los análisis revelaron 19 QTLs relacionados con el cuajado de vainas y semillas, la cantidad y tamaño de polen y las medidas morfológicas y del estigma, co-localizando en seis regiones genómicas, uno en cada cromosoma de habas.

El QTL para %VF, en el cromosoma III, se asoció con el marcador Vf_Ein4, que corresponde con una EIN4 histidina kinasa de *A. thaliana*. EIN4 está relacionada con la síntesis de etileno en el estigma y estilo tras la polinización de las flores (O'Neill 1997). El etileno causa la senescencia del periantio cuando la polinización tiene éxito. Fuertes señales de EIN4 en los lóculos de los estambres, incluyendo las células precursoras de polen y del tapete fueron descritas por Hua et al (1998)

destacando así la relación de la síntesis de etileno y el desarrollo del polen en *A. thaliana*. En el cromosoma IV, el QTL para %VF se encontró asociado a Mtr1g106005(210), que corresponde a una proteína tubulina de cadena 4-alfa TUA4 relacionada con la estructura celular y la dirección de elongación en el desarrollo de órganos (Buschmann et al. 2009). Esta proteína fue encontrada en análisis proteómicos del exudado estigmático de *Olea europaea* (Rejón et al. 2013), apoyando su posible rol de la estructura y receptividad estigmática y en el cuajado de vainas y semillas. El QTL en el cromosoma V está relacionado con dos marcadores que se corresponden con genes expresados en los tallos florales de *A. thaliana*, tabaco, álamo, alfalfa y soja (Goujon et al. 2003). El último marcador (Mtr4g088595), asociado con un QTL para %SO en el cromosoma VI, codifica para una proteína ribosomal S6e (RPS6e) de *Arabidopsis* perteneciente a una familia proteica con múltiples funciones. Creff et al. (2010) describe que el doble heterocigoto para RPS6 (*RPS6A/rps6a*, *RPS6B/rps6b*) mostró óvulos abortados en las silicuas. Esto indica la posible función redundante de RPS6e con otras RPSs y nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis.

Para los caracteres relacionados con el tamaño y la producción de polen, se encontraron tres regiones con QTLs significativos en los cromosomas II, V y VI. Los QTLs en el cromosoma II y V, se relacionaron con los marcadores MTR3g049400 (identificados como *GTP1/2*, un translocador de glucosa 6-fosfato 1/2) y MTR7g050950 (correspondiente a *PMEPCRA*, una metilesterasa PCR A), respectivamente, y ambos genes están asociados con el desarrollo del polen. *GTP1/2* es un gen clave en el almacenamiento de lípidos durante el desarrollo de polen y su pérdida de función reduce la acumulación de componentes de almacenamiento, afectando a la viabilidad y germinación del polen (Niewiadomski et al. 2005; Zheng et al. 2018). Por otro lado, *PMEPCRA* ha sido relacionado con la síntesis de pectinas y la adhesión de la pared celular. Los niveles de esterificación de las pectinas están relacionados con los eventos de proliferación y diferenciación durante el desarrollo y embriogénesis del polen en *Capsicum annuum* L. (Bárány et

al. 2010; Bethke et al. 2014). Es interesante remarcar que estos marcadores se encontraron relacionados con los caracteres de la cantidad y calidad de polen (p.e. RATIO_TP, %PNORMAL, TPTOTAL y PNORMAL), indicando su posible efecto en el desarrollo y cantidad de polen final. Por otro lado, los dos marcadores flanqueantes de los QTLs del cromosoma VI están relacionados con el desarrollo de la flor y la maduración de la vaina, en particular con componentes celulares de los botones florales (Cao et al. 2006).

En relación a las medidas morfológicas, se detectaron cinco zonas con QTLs significativos en los cromosomas I, III, IV y VI. El QTL del cromosoma I se encuentra asociado a un marcador RAPD con función desconocida. En los cromosomas III y IV, los marcadores flanqueantes Vf_TT8 y MTR4g107940 están implicados en la regulación de la síntesis de prolina (Deuschle et al. 2004; Rai et al. 2016), mientras que en los cromosomas IV y VI los marcadores LOC109362751 y Mtr8g085280(81) se relacionan con genes implicados en el transporte y la relación de las hormonas auxina y ABA (Tsugeki et al. 2009; Maleckova et al. 2019).

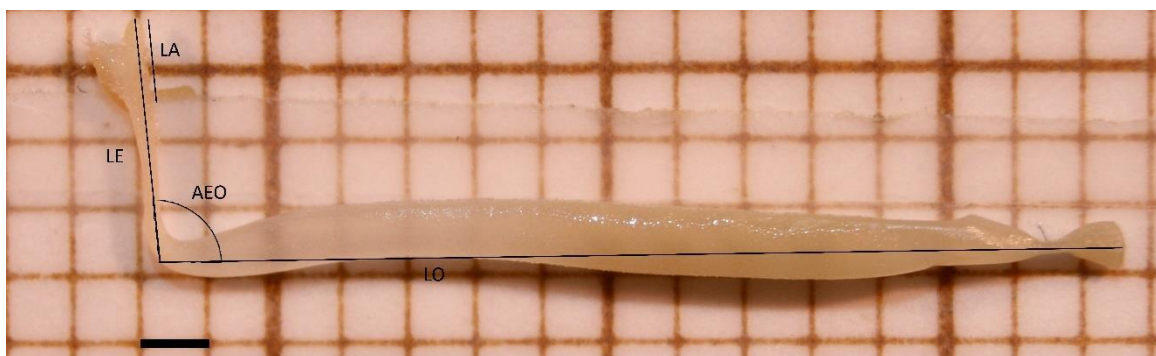
Finalmente, en el cromosoma II, detectamos un único QTL significativo para el carácter ANG_ESTIG medido bajo microscopio electrónico de barrido. El marcador flanqueante MTR1g102900 corresponde a una proteína con motivo CCT/dominio TIFY (PPD1) de *A. thaliana*. Este gen es un regulador del crecimiento de órganos en *Arabidopsis* (Wang et al. 2016), promoviendo un agrupamiento temprano de las células meristemáticas proliferantes, incluyendo el desarrollo floral. La co-localización de dos posibles QTLs (no significativos) relacionados con el número de papilas y la longitud del estigma apoya la función de *PPD1* durante el desarrollo de órganos y flores. Tanto la pleiotropía como los genes estrechamente ligados pueden explicar esta co-localización de QTLs.

Este es el primer estudio que localiza determinantes genéticos para la formación de vainas y semillas en el genoma de las habas tras su autofecundación. Para ello hemos realizado un análisis holístico de caracteres morfológicos florales

y de la producción y viabilidad del polen en la población RIL derivada del cruce Vf6 x Vf27. Los datos se integraron en un análisis de QTLs de seis caracteres de autofertilidad que diseccionan la transformación de flores en vainas y de óvulos en semillas, durante varios años y en distintas condiciones. Al combinar la posición de los QTLs hemos identificado seis intervalos genómicos con candidatos posicionales y funcionales que controlan el carácter. Observamos un agrupamiento entre QTLs para diferentes caracteres de autofertilidad. Así, los cromosomas I, II y V contenían QTLs para caracteres florales y de polen que co-localizaban en las mismas posiciones. Curiosamente, los QTLs en los cromosomas III, IV y especialmente VI, revelaron co-localizaciones entre las medidas de flores y polen con los datos de formación de vainas y semillas registrados en jaulón. Este resultado confirma que la autofertilidad es un proceso para el que conseguir el valor óptimo para un carácter determinado puede influir por pleiotropía en el valor de otra característica relacionada. Esto debe tenerse en cuenta especialmente cuando se plantee aplicar la selección asistida por marcadores para la autofertilidad. Nuestro estudio aporta nuevos conocimientos sobre las regiones genómicas que controlan la autofertilidad en habas y constituye la base para futuras estrategias de mejora molecular en este cultivo.

Material Suplementario

Figura suplementaria 1. Medidas morfológicas de la flor. Longitud del ovario (LO), longitud del estilo (LE), longitud del ápice (LA) y ángulo estilo-ovario (AEO). Barra: 1 mm.



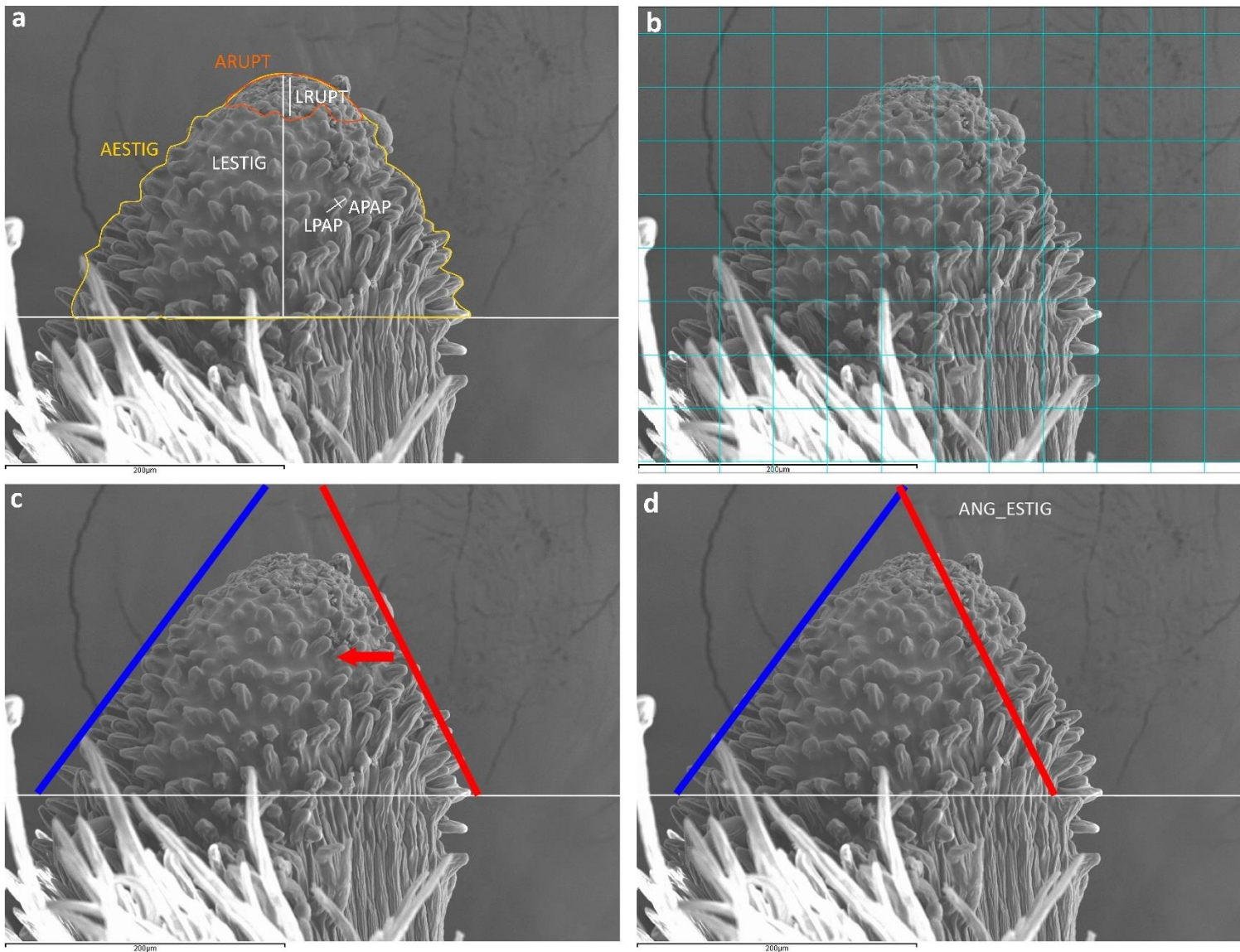


Figura Suplementaria 2. Medidas de la flor en el Microscopio Electrónico de Barrido. a) Longitud del estigma (LESTIG), longitud de la ruptura (LRUPT), área del estigma (AESTIG), área de la ruptura (ARUPT), longitud de la papila (LPAP), ancho de la papila (APAP). b) Densidad de papilas (DPAP, número de papilas en 6 mm²). c y d) Medida del ángulo del estigma (ANG_ESTIG). Barra: 200 μm.

Figura Suplementaria 3 no mostrada (pendiente de publicación)**Figura Suplementaria 4 no mostrada (pendiente de publicación)****Tabla Suplementaria 1.** Resultados del ANOVA de dos vías analizando el efecto de la línea parental y el tipo de polen (normal vs anormal).

Fuente de la variación	Df	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor F	Pr(>F)
Línea	1	0,941	0,941	65,319	< 0,001 ***
Tipo	1	2,479	2,479	172,134	< 0,001 ***
Línea:Tipo	1	0,144	0,144	9,969	0,002 **
Residuos	116	1,671	0,014		

Figura Suplementaria 5 no mostrada (pendiente de publicación)

Tabla Suplementaria 2. Posibles QTLs no significativos. Blanco: medidas de campo; verde: medidas del polen; azul: medidas morfológicas; rojo: medidas del estigma.

Carácter	Co-localiza con	Pico	Cr.	Marcadores flanqueantes	LOD	Efectos aditivos	R²
%SO08-09_R1J*	LE/LF(2)	229,008	VI	MTR4g088595	2,71	-0,0717358	18,4
RATIO_TP(2)*	LO(1)	153,147	VI	OPK09_2	3,15	0,0396093	9,0
%PNORMAL(2)*	LO(1)	153,147	VI	OPK09_2	3,00	9,07106	8,7
LE/LF(3)*	LO/LF	417,609	I	OPJ09_4/OPL12_2	3,12	0,00293325	14,9
LO(2)*	LO/LF	428,395	I	OPL12_2	3,14	0,205966	12,7
LA*	LA/LF	229,589	III	OPJ14	2,44	-0,0310725	10,4
AEO_LF*	PNORMAL(1)	289,096	V	MTR7g050950	2,89	-0,0792338	11,2
AEO*	PNORMAL(1)	289,096	V	MTR7g050950	2,42	-1,47345	8,8
LO/LF(2)*	LO(1)	149,245	VI	OPL18_2/OPK09_2	2,98	0,00799998	10,5
NPAP*	ANG_ESTIG	825,007	II	OPJ09_5	2,36	0,387295	12,3
LESTIG	ANG_ESTIG	824,007	II	OPJ09_5	2,99	6,54215	10,7

Tabla Suplementaria 3. Resultados del BLASTp de los marcadores flanqueantes.

Carácter	Cr.	Marcadores	Gen At	Descripción	Cobertura	E-value	Identidad
RATIO_TP; %PNORMAL; TPTOTAL	II	MTR3g049400	<i>AT1G61800</i>	GPT2 glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2	89%	0,0	80,33%
			<i>AT5G54800</i>	GPT1 glucose 6-phosphate/phosphate translocator 1	99%	0,0	72,82%
ANG_ESTIG	II	MTR1g102900	<i>AT4G14713</i>	PPD1 TIFY domain/Divergent CCT motif family protein	96%	4e-64	40,58%
%VF14-15_R1J	III	Vf_Ein4 (MTR1g079790)	<i>AT3G04580</i>	EIN4 Signal transduction histidine kinase, hybrid-type, ethylene sensor	96%	0,0	59,81%
LA/LF	III	Vf_TT8 (MTR1g072320)	<i>AT4G09820</i>	TT8 basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	76%	3e-102	72,14%
%VF14-15_R2J	IV	MTR1g106005(210)	<i>AT1G04820</i>	TUA4 tubulin alpha-4 chain	100%	0,0	95,78%
LE	IV	MTR4g107940	<i>AT5G62530</i>	ALDH12A1 aldehyde dehydrogenase 12A1	100%	0,0	80,22%
LE/LF	IV	LOC109362751	<i>AT2G26900</i>	BASS2 Sodium Bile acid symporter family	100%	0,0	78,15%
PNORMAL	V	MTR7g050950	<i>AT1G11580</i>	PMEPCRA methylesterase PCR A	98%	0,0	52,67%
%VF14-15_R2J	V	Vf_MTR7g112740	<i>AT3G05545</i>	RING/U-box superfamily protein	92%	3e-84	44,39%
%VF14-15_R2J	V	Vf_MTR7g118320	<i>AT5G54160</i>	OMT1 O-methyltransferase 1	97%	1e-136	51,84%
PNORMAL	VI	Mtr4g091610b	<i>AT1G13130</i>	Cellulase (glycosyl hydrolase family 5) protein	94%	3e-140	40,16%
TPTOTAL	VI	Mtr4g092820	<i>AT1G58290</i>	HEMA1 Glutamyl-tRNA reductase family protein	88%	0,0	70,79%
%SO09-10_R1	VI	Mtr4g088524	<i>AT5G10360</i>	EMB3010 Ribosomal protein S6e	99%	3e-164	91,97%
LE/LF	VI	Mtr4g088595	<i>AT5G10360</i>	EMB3010 Ribosomal protein S6e	99%	2e-164	91,97%
LE	VI	Mtr8g085280(81)	<i>AT4G13750</i>	NOV Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein	99%	0,0	43,03%

DISCUSIÓN GENERAL

Dentro de los programas de mejora, la utilización de marcadores genéticos supone un gran avance, ya que reduce el tiempo y coste necesarios para desarrollar nuevas variedades. Para ello, la selección asistida por marcadores (MAS) requiere de buenos marcadores que maximicen su eficiencia, y un requisito previo a su obtención es, en ocasiones, el conocimiento de los mecanismos de regulación génica del carácter buscado. Aunque actualmente se está haciendo uso cada vez más de técnicas de secuenciación masiva para saturar los mapas genéticos e identificar genes candidatos para los caracteres agronómicos deseados, la búsqueda de genes por homología y la sintenia siguen siendo una herramienta muy útil, sobre todo en especies que no tienen su genoma secuenciado, como es el caso de habas.

El objetivo de esta tesis ha sido analizar diferentes caracteres de interés en la mejora del rendimiento de las habas y profundizar en el conocimiento de los genes implicados que puedan servir de base para el desarrollo de marcadores diagnóstico. Uno de los caracteres analizados, la dehiscencia de la vaina, se ha realizado en dos especies de leguminosas, con aproximaciones parecidas, pero con resultados muy distintos.

La dehiscencia de la vaina es uno de los caracteres presentes en especies silvestres que se han ido perdiendo durante la domesticación y selección histórica de los cultivos (Di Vittori et al. 2019). Por ello, en muchas especies cultivadas dicho carácter ya no está presente, como por ejemplo en el garbanzo, pero en otros cultivos aún ocasiona serias pérdidas de rendimiento (Bhor et al. 2014). El conocimiento de la regulación génica del carácter y el desarrollo de marcadores ligados o, mejor aún, de marcadores diagnóstico puede permitir a los mejoradores el uso de especies silvestres o de otros fondos genéticos en sus programas de mejora para introgresar resistencias u otros caracteres perdidos, omitiendo un carácter no deseable (como, por ejemplo, la dehiscencia de la vaina).

Este carácter ha sido ampliamente estudiado en especies modelo y en otras leguminosas, pero en garbanzo y habas existe una falta de estudios al respecto. En *A. thaliana* se ha descrito la ruta genética que regula los diferentes pasos para que se produzca la dehiscencia (Ballester and Ferrándiz 2017), y en otras especies, varios autores describen la existencia de diferentes loci reguladores, llegando en algunos casos concretos a describir genes candidatos (Weeden et al. 2002; Weeden 2007; Fratini et al. 2007; Suzuki et al. 2010; Dong et al. 2014; Funatsuki et al. 2014; Hradilová et al. 2017).

Gracias a estos trabajos y a los resultados de los capítulos I y II se pudieron establecer relaciones de sintenia entre grupos de ligamiento de leguminosas cercanas y constatar que existe un alto grado de conservación entre las especies (Cannon et al. 2009; Aguilar-Benitez et al. 2020a,b). También se observa una mayor complejidad en la regulación de la dehiscencia de la vaina en leguminosas, frente a la estudiada en otras especies. Cuando se analizan los diferentes genes que regulan la dehiscencia encontramos nuevamente un alto grado de conservación en la secuencia de los mismos (datos no mostrados) y de su sintenia, indicando que es posible que exista una regulación general del carácter muy similar entre especies cercanas pero que, como se explica en otros trabajos (Di Vittori et al. 2019; Rau et al. 2019), presenta modificaciones específicas en diferentes especies de leguminosas.

En esta tesis se han genotipado varios genes candidatos para la regulación de la dehiscencia de la vaina en garbanzo, todos ellos integrantes de la ruta general de la dehiscencia en *A. thaliana* (Ballester and Ferrándiz 2017). Estos genes son *FRUITFULL*, *ALCATRAZ* y *APETALA2*, además del gen *PDH1* descrito en soja (Funatsuki et al. 2014). Dichos genes regulan varias funciones dentro de la ruta, como la deposición de lignina en la zona de sutura (o de dehiscencia) entre las valvas de la vaina y en otras zonas de la misma, la expansión e identidad de las células en la zona de sutura, además de ser genes autorreguladores en la ruta.

Cuando se realizó el mismo estudio en habas ninguno de los genes ortólogos descritos en *A. thaliana* mostró asociación directa con los QTLs o regiones detectados para el control de la dehiscencia en esta especie salvo el gen *SEPALLATA3*, el cual forma parte del complejo ABCDE de formación de la flor (Immink et al. 2009; Kaufmann et al. 2009; Shi et al. 2015; Chi et al. 2017). Se encontraron ligados otros genes relacionados con el flujo de auxina que está altamente implicado en la determinación de la zona de dehiscencia en *A. thaliana* (Tsugeki et al. 2009; Ballester and Ferrándiz 2017). Esta falta de relación de los genes de la ruta general de dehiscencia es un hecho que parecería alejar a *V. faba* de la regulación conservada del carácter. Sin embargo, se han descrito situaciones similares en estudios de expresión de *V. sativa* y *Vigna unguiculata*, en las que los genes descritos en *Arabidopsis* no presentan cambios importantes de expresión entre variedades dehiscentes y no dehiscentes (Suanum et al. 2016; Dong et al. 2017b).

A continuación, se realizó un estudio histológico de las vainas de habas para comprobar el patrón de deposición de lignina entre las líneas parentales Vf6 (indehiscente) y Vf27 (dehiscente). Los resultados mostraron que la lignina se deposita de una forma similar a la descrita en otras leguminosas como soja (Dong et al. 2014) o *P. vulgaris* (Murgia et al. 2017; Di Vittori et al. 2020; Parker et al. 2020), así como en la crucífera, *B. napus* (Zhang et al. 2016), presentando mayor lignificación en la zona de dehiscencia las variedades indehiscentes. Por otro lado, el patrón de lignificación de la capa de fibras alrededor de la vaina se comportaba de forma opuesta a soja y judías (Funatsuki et al. 2014; Murgia et al. 2017; Di Vittori et al. 2019; Takahashi et al. 2019; Di Vittori et al. 2020; Parker et al. 2020), pero similar a la de algunas especies de *Brassica* (Zhang et al. 2016) donde las especies indehiscentes mostraban un endocarpio más lignificado que las dehiscentes. Estos resultados nos llevan a apoyar la hipótesis de una mayor complejidad en la

regulación de la dehiscencia de la vaina en leguminosas, y en concreto habas, frente a otras especies cercanas.

Otro de los caracteres analizados en esta tesis ha sido la fecha de floración. La importancia de este carácter radica en que es una característica adaptativa de las plantas (Patrick y Stoddard 2010), permitiendo que acoplen el momento de floración con el periodo de mejores condiciones climáticas y con la presencia de los agentes polinizadores. Esta adaptación se consigue mediante la regulación de diferentes señales como son la vernalización y la sensibilidad al fotoperiodo, ambas rutas muy estudiadas, nuevamente, en plantas modelo como *A. thaliana* (Andrés y Coupland 2012). Dentro de estas rutas se han descrito variedad de genes, los cuales aparecen representados y conservados entre las leguminosas, sólo con pequeñas modificaciones como la duplicación o pérdida de algunos de ellos. Los objetivos de este trabajo fueron mapear en habas 25 genes ortólogos descritos en *Arabidopsis* y garbanzo relacionados con la floración con el fin de saturar regiones dianas para el carácter e identificar genes que co-localizaran con QTLs responsables.

Se identificaron 12 QTL significativos para la fecha de floración y duración de la floración, y la región genómica más relevante se localizó en el cromosoma V donde se detectaron cinco de los QTL más estables descritos en trabajos previos del grupo (Cruz-Izquierdo et al. 2012), relacionados con los marcadores Pis_GEN_6_3_1 (Mtr7g084800) y AnMtS37 (Mtr7g081220). Otros estudios posteriores (Sallam et al. 2016; Catt et al. 2017) confirman el interés de dicha zona al relacionar los días a floración con marcadores SNP muy cercanos a los obtenidos en este estudio. Otra evidencia del interés del cromosoma V en habas es la detección de un importante QTL (con pico cercano al marcador Mtr7g084800), en una región de sinténica entre leguminosas como garbanzo, altramuz, alfalfa y *Lotus japonicus*, correspondiente a un segmento del cromosoma 7 de *Medicago*. Esta zona contiene varios genes de la familia *Flowering Time (FT)* (Weller and Ortega

2015) cercanos al marcador Mtr7g084800, lo que valida nuestros resultados y la implicación de dicha zona en la regulación del carácter.

El resto de marcadores ligados a los QTLs detectados muestran una tendencia clara: varios marcadores corresponden a genes descritos en *A. thaliana* cuyas funciones incluyen la regulación de la floración mediante marcas epigenéticas. Estos marcadores son Mtr2g039960, que corresponde a *EIF4A1* (eukaryotic translation initiation factor 4A1) en el cromosoma I (Lellis et al. 2010; Durand et al. 2012; Boex-Fontvieille et al. 2013; Bush et al. 2016); Mtr1g116330, descrito en *Acacia mangium* y arroz como un factor de interacción PRLI en el cromosoma III (Wang et al. 2005; Liu et al. 2012); y otros marcadores cuyos genes se relacionan con la modificación de histonas como *RPA* en el cromosoma V (Michaels y Amasino 1999; Sheldon et al. 1999; Bastow et al. 2004; Xia et al. 2006), ADN polimerasa delta (δ) en el cromosoma II (del Olmo et al. 2010; Iglesias et al. 2015) y una proteína que contiene un dominio jumonji (JmjC) en el cromosoma IV (Dutta et al. 2017; Zheng et al. 2019). Estos resultados nos llevan a plantear la hipótesis de que exista una red de señales epigenéticas que regulan procesos como la resistencia a estreses y el control de la floración en plantas (Yaish et al. 2011), y en concreto en habas.

Por último, se realizó un estudio sobre la autofertilidad en el cultivo de habas. Este carácter, definido como la capacidad de una flor para autofertilizarse en ausencia de insectos polinizadores o perturbación mecánica (Drayner 1959), es de sumo interés en este cultivo debido al comportamiento reproductivo intermedio entre polinización cruzada y autopolinización (Stoddard y Bond 1987). A pesar de la cantidad de estudios donde se analizan diferentes parámetros de autofertilidad, no se habían descrito QTLs significativos para este carácter. Diversos autores establecen una relación entre diferentes características florales y la autofertilidad (Kambal et al. 1976; Lord y Heslop-Harrison 1984; Chen et al. 2006; Chen 2009). Debido a la complejidad y número de factores que determinan este carácter, se

propuso diseccionar este carácter en distintos componentes y realizar el primer análisis de QTL para la búsqueda de genes candidatos.

Para ello empleamos una población RIL procedente del cruce Vf6 x Vf27 donde analizamos la transformación de flores en vainas y de óvulos en semillas. Además, se tomaron medidas de la cantidad y calidad del polen y medidas morfológicas de la flor mediante fotografía óptica y microscopía electrónica de barrido. Los resultados mostraron que el parental Vf6 (autoestéril) presentaba mayor número de flores, pero un menor porcentaje de transformación vainas-flor y semillas-óvulo que el parental Vf27 (autofértil). En cuanto a la producción de polen, Vf6 presentó una mayor cantidad de polen total, pero con un alto porcentaje de menor tamaño al esperado (Poulsen y Martin 1977). Tras la tinción de viabilidad se observó que Vf27 presentaba una mayor proporción de polen viable. Estos resultados se deben a que Vf6 es una línea asináptica que produce altas cantidad de polen no viable al igual que otras líneas asinápticas (Sjödin 1970). También se observó que la receptividad del estigma se presenta en estadios muy tempranos en el desarrollo floral de Vf27, permitiendo una mayor sincronización con la disponibilidad de polen, al igual que ocurre en otras líneas autofértiles analizadas por Chen et al. (2011). La línea Vf6 también presentó medidas morfológicas mayores, puesto que tiene una flor de mayor tamaño, aunque trabajos anteriores no relacionan la longitud del estilo con la capacidad autoestéril/autofértil de una variedad (Kambal et al. 1976; Chen 2009). Por el contrario, sí se observó una clara relación entre el ángulo estilo-ovario y la capacidad de autofecundación, donde las líneas autoestériles (como la Vf6 en nuestro caso) presentaron un ángulo más cerrado que las líneas autofértiles (Kambal et al. 1976; Chen 2009).

El estudio permitió detectar 19 QTLs significativos repartidos en todos los cromosomas. Cinco de ellos corresponden al porcentaje de transformación de flores a vainas y de óvulos a semillas y se relacionaron con genes implicados en: la síntesis de etileno en el estigma y estilo tras la polinización y con el desarrollo del polen (O'Neill 1997; Hua et al. 1998); con la morfogénesis y el exudado estigmático

(Buschmann et al. 2009; Rejón et al. 2013) y con la gametogénesis del ovario (Creff et al. 2010). Se identificaron seis QTLs para las medidas de polen en los cromosomas II, V y VI, los cuales se relacionaron con genes implicados en el desarrollo del polen (Niewiadomski et al. 2005; Bárány et al. 2010; Bethke et al. 2014; Zheng et al. 2018). Para las medidas morfológicas se encontraron siete QTLs significativos en los cromosomas I, III, IV y VI, asociados a la producción de compuestos secundarios y al transporte de hormonas (Deuschle et al. 2004; Tsugeki et al. 2009; Rai et al. 2016; Maleckova et al. 2019). Por último, se identificó un único QTL para la medida del ángulo del estigma bajo microscopio electrónico de barrido que se relaciona con una proteína PPD1 de *Arabidopsis* implicada en la regulación del crecimiento de órganos, incluyendo el desarrollo floral (Wang et al. 2016).

Los resultados de este trabajo suponen un salto cualitativo sustancial en el conocimiento de los caracteres descritos. La explotación de la sintenia con leguminosas cercanas como *P. sativum* y *C. arietinum* o con especies modelo como *Arabidopsis* o *Medicago* nos ha permitido saturar el mapa disponible con nuevos genes candidatos posicionales o funcionales e identificar QTLs relevantes para su control. Un estudio más exhaustivo de los QTLs detectados facilitará el uso efectivo de genes reguladores en la selección de caracteres claves para el rendimiento y la estabilidad del cultivo. La aplicación de nuevos enfoques genómicos, transcriptómicos y de mejora (como los GWAS y la GS), impulsados por técnicas de secuenciación de alto rendimiento (ó NGS), se están implementando cada vez más en cultivos modelo y tradicionales como las habas. Este enfoque unido a la inminente secuencia de su genoma (actualmente en desarrollo), permitirá saturar regiones clave y desarrollar marcadores eficientes en programas de MAS que aceleren la obtención de nuevas variedades.

CONCLUSIONES

1. Se ha realizado el primer estudio para identificar genes implicados en la dehiscencia del garbanzo y *PDH1*, *FUL*, *ALC* y *AP2*, ubicados en los cromosomas 6, 7 y 8 mostraron una clara correlación con el carácter. La función combinada de estos genes junto a otros reguladores dirige la compleja ruta de la dehiscencia en este cultivo.
2. Se ha caracterizado un estado intermedio de la dehiscencia (denominado vaina fisurada) que se relaciona con *PDH1* y con otros dos QTLs en los cromosomas 2 y 3. Dichos QTLs explicaban el mayor porcentaje de la variación fenotípica en cada uno de los cromosomas.
3. Veintinueve de los 37 genes relacionados con dehiscencia descritos en *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* y *Cicer arietinum* mostraron sintenia en habas, co-localizando en los respectivos cromosomas homólogos.
4. Los QTLs de dehiscencia detectados en habas, aunque no fueron estables entre años, mostraron sintenia con QTLs descritos en otras leguminosas, indicando la existencia de una ruta genética común.
5. Los análisis histológicos muestran mayor lignificación en la zona de sutura de la vaina en la línea indehisciente Vf6, similar a lo descrito en *Glycine max*, *Brassica napus* y *Phaseolus vulgaris*.
6. La lignificación de las células del esclerénquima en las paredes de la vaina tuvo un patrón similar al de algunas Brassicas, con presencia de un anillo de células muy lignificadas en la línea indehisciente Vf6, ausente en la dehisciente Vf27. Esta observación es contraria a la descrita en leguminosas como judía y soja, donde la pared en la vaina de líneas indehiscientes carece totalmente de lignina.

7. El estudio de la fecha de floración reveló que 22 de los 25 genes candidatos de *Arabidopsis* y *Cicer*, mapeados en habas fueron sinténicos con otras leguminosas cercanas, aunque ninguno de ellos co-localizó con los QTLs para fecha de floración descritos.
8. El análisis de QTLs para floración detectó 12 QTLs significativos, destacando el cromosoma V por presentar un mayor número de QTLs estables y consistentes entre años y ambientes, y por mostrar clara sintenia con otras especies y por su cercanía a los genes *FT*.
9. Los marcadores asociados a QTLs para fecha de floración en habas sugieren una posible regulación a nivel epigenético del carácter.
10. La autofertilidad en habas es un carácter cuantitativo influenciado por una gran cantidad de factores, pese a ello, los porcentajes de cuajado de vainas y de formación de semillas obtenidos en el estudio reflejan un mayor éxito reproductivo del parental autofertil Vf27 frente a la línea Vf6.
11. La línea autoesteril Vf6 presentó una mayor cantidad de polen que Vf27 aunque más del 70% de su polen era no viable.
12. Las pruebas de receptividad del estigma mostraron que en Vf6 el extremo permanecía sin teñir incluso en antesis, mientras que en Vf27 era receptivo antes de antesis y sin manipulación. Este hecho facilita la sincronía con la disponibilidad de polen y favorece la autofecundación.
13. El ángulo estilo-ovario es más cerrado en Vf6 que en Vf27, apoyando la hipótesis del bloqueo de la cavidad ventral de la quilla al paso del polen propio en las líneas autoestériles. La mayor apertura en la línea autofertil Vf27 favorecería la llegada del polen propio al estigma.
14. El análisis de QTLs para autofertilidad ha detectado 19 QTLs significativos relacionados con el cuajado de vainas y semillas, la cantidad y tamaño del polen y medidas morfológicas florales, co-localizando en seis regiones

genómicas, una en cada cromosoma de la especie. El QTL para el ángulo estigma-ovario es el que explica un mayor porcentaje de la variación fenotípica. Los marcadores flanqueantes de dichos QTLs se corresponden con genes candidatos funcionales relacionados con la morfogénesis, gametogénesis y el desarrollo del polen.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbo S, Berger J, Turner NC. 2003. Viewpoint: Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biol.* 30(10):1081
- Abdelmula AA, Link W, von Kittlitz E, Stelling D. 1999. Heterosis and inheritance of drought tolerance in faba bean, *Vicia faba* L. *Plant Breeding.* 118(6):485–90
- Adcock ME, Lawes DA. 1976. Self-fertility and the distribution of seed yield in *Vicia faba* L. *Euphytica.* 25(1):89–96
- Aguilar-Benitez D, Rubio J, Millán T, Gil J, Die JV, Castro P. 2020a. Genetic analysis reveals *PDH1* as a candidate gene for control of pod dehiscence in chickpea. *Mol. Breeding.* 40(4):40
- Aguilar-Benitez D, Casimiro-Soriguer I, Torres AM. 2020b. First approach to pod dehiscence in faba bean: genetic and histological analyses. *Sci. Rep.* 10(1):17678
- Aguilar-Benitez D, Casimiro-Soriguer I, Torres AM. 2021. Linkage mapping and QTL analysis of flowering time in faba bean. *Sci Rep*
- Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Lee JH, et al. 2006. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. *EMBO J.* 25(3):605–14
- Andrés F, Coupland G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13(9):627–39
- Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408(6814):796–815
- Armon S, Efrati E, Kupferman R, Sharon E. 2011. Geometry and mechanics in the opening of chiral seed pods. *Science.* 333(6050):1726–30
- Aryamanesh N, Nelson MN, Yan G, Clarke HJ, Siddique KHM. 2010. Mapping a major gene for growth habit and QTLs for ascochyta blight resistance and flowering time in a population between chickpea and *Cicer reticulatum*. *Euphytica.* 173(3):307–19

- Atienza SG, Palomino C, Gutierrez N, Alfaro CM, Rubiales D, et al. 2016. QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.): validation in field and controlled conditions. *Crop Pasture Sci.* 67(2):216–24
- Avila CM, Atienza SG, Moreno MT, Torres AM. 2007. Development of a new diagnostic marker for growth habit selection in faba bean (*Vicia faba* L.) breeding. *Theor. Appl. Genet.* 115(8):1075–82
- Avila CM, Nadal S, Moreno MT, Torres AM. 2006. Development of a Simple PCR-based Marker for the Determination of Growth Habit in *Vicia faba* L. using a Candidate Gene Approach. *Mol. Breeding.* 17(3):185–90
- Avila CM, Satovic Z, Sillero JC, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM. 2004. Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108(6):1071–78
- Avila CM, Sillero JC, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM. 2003. Identification of RAPD markers linked to the *Uvf-1* gene conferring hypersensitive resistance against rust (*Uromyces viciae-fabae*) in *Vicia faba* L. *Theor. Appl. Genet.* 107(2):353–58
- Ávila CM, Ruiz-Rodríguez MD, Cruz-Izquierdo S, Atienza SG, Cubero JI, Torres AM. 2017. Identification of plant architecture and yield-related QTL in *Vicia faba* L. *Mol. Breeding.* 37(7):88
- Bailes EJ, Pattrick JG, Glover BJ. 2018. An analysis of the energetic reward offered by field bean (*Vicia faba*) flowers: Nectar, pollen, and operative force. *Ecol. Evol.* 8(6):3161–71
- Balanzà V, Roig-Villanova I, Di Marzo M, Masiero S, Colombo L. 2016. Seed abscission and fruit dehiscence required for seed dispersal rely on similar genetic networks. *Development.* 143(18):3372–81
- Ballester P, Ferrándiz C. 2017. Shattering fruits: variations on a dehiscent theme. *Curr. Opin.*

- Plant Biol. 35:68–75
- Bárány I, Fadón B, Risueño MC, Testillano PS. 2010. Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. J. Exp. Bot. 61(4):1159–75
- Bartomeus I, Potts SG, Steffan-Dewenter I, Vaissière BE, Woyciechowski M, et al. 2014. Contribution of insect pollinators to crop yield and quality varies with agricultural intensification. PeerJ. 2:e328
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C. 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. Nature. 427(6970):164–67
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J. Stat. Softw. 67(1):1–48
- Bennett M. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Ann. Bot. 76(2):113–76
- Bethke G, Grundman RE, Sreekanta S, Truman W, Katagiri F, Glazebrook J. 2014. *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASEs contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. Plant Physiol. 164(2):1093–1107
- Bhor T, Chimote V, Deshmukh M. 2014. Inheritance of pod shattering in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Electronic Journal of Plant Breeding. 5:671–76
- Bishop J, Garratt MPD, Breeze TD. 2020. Yield benefits of additional pollination to faba bean vary with cultivar, scale, yield parameter and experimental method. Sci. Rep. 10(1):2102
- Bishop J, Jones HE, Lukac M, Potts SG. 2016a. Insect pollination reduces yield loss following heat stress in faba bean (*Vicia faba* L.). Agric. Ecosyst. Environ. 220:89–96
- Bishop J, Potts SG, Jones HE. 2016b. Susceptibility of Faba Bean (*Vicia faba* L.) to Heat Stress

- During Floral Development and Anthesis. *J. Agro. Crop Sci.* 202(6):508–17
- Boex-Fontvieille E, Davenport M, Jossier M, Zivy M, Hodges M, Tcherkez G. 2013. Photosynthetic control of *Arabidopsis* leaf cytoplasmic translation initiation by protein phosphorylation. *PLoS ONE.* 8(7):e70692
- Bond DA, Pope M. 1974. Factors affecting the proportions of cross-bred and selfed seed obtained from field bean (*Vicia faba* L.) crops. *J. Agric. Sci.* 83(2):343–51
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E. 1997. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science.* 275(5296):80–83
- Buschmann H, Hauptmann M, Niessing D, Lloyd CW, Schäffner AR. 2009. Helical growth of the *Arabidopsis* mutant *tortifolia2* does not depend on cell division patterns but involves handed twisting of isolated cells. *Plant Cell.* 21(7):2090–2106
- Bush MS, Pierrat O, Nibau C, Mikitova V, Zheng T, et al. 2016. eIF4A RNA Helicase Associates with Cyclin-Dependent Protein Kinase A in Proliferating Cells and Is Modulated by Phosphorylation. *Plant Physiol.* 172(1):128–40
- Cannon SB, May GD, Jackson SA. 2009. Three sequenced legume genomes and many crop species: rich opportunities for translational genomics. *Plant Physiol.* 151(3):970–77
- Cao D, Cheng H, Wu W, Soo HM, Peng J. 2006. Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142(2):509–25
- Catt SC, Braich S, Kaur S, Paull JG. 2017. QTL detection for flowering time in faba bean and the responses to ambient temperature and photoperiod. *Euphytica.* 213(6):125
- Chan CS, Peng H-P, Shih M-C. 2002. Mutations affecting light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130(3):1476–86

- Chen W, Stoddard FL, Baldwin TC. 2006. Developmental Regulation of Mannan, Arabinogalactan-Protein, and Pectic Epitopes in Pistils of *Vicia faba* (Faba Bean). *Int. J. Plant Sci.* 167(5):919–32
- Chen W, Stoddard F, Baldwin TC. 2011. Variable Pressure Scanning Electron Microscopy of *Vicia faba* Stigmatic Papillae. *Microsc Anal (Am Ed)*
- Chen W. 2009. Pollination, Fertilization and Floral Traits Co-Segregating with Autofertility in Faba Bean. *Journal of New Seeds.* 10(1):14–30
- Chi Y, Wang T, Xu G, Yang H, Zeng X, et al. 2017. *GmAGL1*, a MADS-Box Gene from Soybean, Is Involved in Floral Organ Identity and Fruit Dehiscence. *Front. Plant Sci.* 8:175
- Choi H-K, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, et al. 2004a. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics.* 166(3):1463–1502
- Choi H-K, Mun J-H, Kim D-J, Zhu H, Baek J-M, et al. 2004b. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(43):15289–94
- Chooi WY. 1971. Comparison of the DNA of Six *Vicia* Species by the Method of DNA-DNA Hybridization. *Genetics.* 68(2):213–30
- Christiansen LC, Dal Degan F, Ulvskov P, Borkhardt B. 2002. Examination of the dehiscence zone in soybean pods and isolation of a dehiscence-related endopolygalacturonase gene. *Plant Cell Environ.* 25(4):479–90
- Churchill GA, Doerge RW. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics.* 138(3):963–71
- Cobos MJ, Rubio J, Strange RN, Moreno MT, Gil J, Millan T. 2006. A new QTL for *Ascochyta* blight resistance in an RIL population derived from an interspecific cross in chickpea. *Euphytica.* 149(1–2):105–11

- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142(1–2):169–96
- 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(1491):557–72
- Crawley MJ. 2007. Proportion Data. In *The R Book*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd., pp. 569–92
- Creff A, Sormani R, Desnos T. 2010. The two *Arabidopsis RPS6* genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent. *Plant Mol. Biol.* 73(4–5):533–46
- Cronquist A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*.
- Croser JS, Ahmad F, Clarke HJ, Siddique KHM. 2003. Utilisation of wild *Cicer* in chickpea improvement — progress, constraints, and prospects. *Aust. J. Agric. Res.* 54(5):429
- Cruz-Izquierdo S, Avila CM, Satovic Z, Palomino C, Gutierrez N, et al. 2012. Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theor. Appl. Genet.* 125(8):1767–82
- Cubero JI, Moreno MT. 1983. *Leguminosas de Grano*. Madrid: MundiPrensa.
- Cubero JI, Nadal S. 2005. Faba bean (*Vicia faba* L.). In Singh RJ, Jauhar PP (Eds) *Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement*, CRC Press, pp. 164–80
- Cubero JI, Suso M-J. 1981. Primitive and modern forms of *Vicia faba*. *Die Kulturpflanze*. 29(1):137–45
- Cubero JI. 1974. On the evolution of *Vicia faba* L. *Theor. Appl. Genet.* 45(2):47–51
- Cubero JI. 1982. Interspecific hybridization in *Vicia*. In *Faba Bean Improvement*, eds. G

- Hawtin, C Webb, pp. 91–108. Dordrecht: Springer Netherlands
- Cubero JI. 1984. Utilization of wild relatives and primitive forms of food legumes. In Genetic Resources and Their Exploitation — Chickpeas, Faba Beans and Lentils, eds. JR Witcombe, W Erskine, pp. 73–84. Dordrecht: Springer Netherlands
- Cunningham SA, Le Feuvre D. 2013. Significant yield benefits from honeybee pollination of faba bean (*Vicia faba*) assessed at field scale. *Field Crops Res.* 149:269–75
- Daba K, Deokar A, Banniza S, Warkentin TD, Tar'an B. 2016. QTL mapping of early flowering and resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. *Genome.* 59(6):413–25
- Dafni A, Maués MM. 1998. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sex. Plant Reprod.* 11(3):177–80
- Dardick C, Callahan AM. 2014. Evolution of the fruit endocarp: molecular mechanisms underlying adaptations in seed protection and dispersal strategies. *Front. Plant Sci.* 5:284
- del Olmo I, López-González L, Martín-Trillo MM, Martínez-Zapater JM, Piñeiro M, Jarillo JA. 2010. *EARLY IN SHORT DAYS 7 (ESD7)* encodes the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon and is required for flowering repression through a mechanism involving epigenetic gene silencing. *Plant J.* 61(4):623–36
- Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, et al. 2004. The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell.* 16(12):3413–25
- Die JV. 2018. RefseqR: Common Computational Operations Working with GenBank. Zenodo
- Di Vittori V, Bitocchi E, Rodriguez M, Alseekh S, Bellucci E, et al. 2020. Pod indehiscence in common bean is associated to the fine regulation of PvMYB26 and a non-functional

- abscission layer. BioRxiv
- Di Vittori V, Gioia T, Rodriguez M, Bellucci E, Bitocchi E, et al. 2019. Convergent evolution of the seed shattering trait. *Genes (Basel)*. 10(1):68. doi: 10.3390/genes10010068
- Díaz-Ruiz R, Satovic Z, Ávila CM, Alfaro CM, Gutierrez MV, et al. 2009. Confirmation of QTLs controlling *Ascochyta fabae* resistance in different generations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop Pasture Sci*. 60(4):353
- Díaz-Ruiz R, Torres AM, Satovic Z, Gutierrez MV, Cubero JI, Román B. 2010. Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) across environments and generations. *Theor. Appl. Genet*. 120(5):909–19
- Dixon RA, Sumner LW. 2003. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol*. 131(3):878–85
- Doebley JF, Gaut BS, Smith BD. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*. 127(7):1309–21
- Dong D, Yan L, Dong R, Liu W, Wang Y, Liu Z. 2017a. Evaluation and Analysis of Pod Dehiscence Factors in Shatter-Susceptible and Shatter-Resistant Common Vetch. *Crop Sci*. 57(5):2770–76
- Dong R, Dong D, Luo D, Zhou Q, Chai X, et al. 2017b. Transcriptome Analyses Reveal Candidate Pod Shattering-Associated Genes Involved in the Pod Ventral Sutures of Common Vetch (*Vicia sativa* L.). *Front. Plant Sci*. 8:649
- Dong Y, Wang Y-Z. 2015. Seed shattering: from models to crops. *Front. Plant Sci*. 6:476
- Dong Y, Yang X, Liu J, Wang B-H, Liu B-L, Wang Y-Z. 2014. Pod shattering resistance associated with domestication is mediated by a *NAC* gene in soybean. *Nat. Commun*. 5:3352
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a

- phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131(3):900–910
- Drayner JM. 1959. Self- and cross-fertility in field beans (*Vicia faba* Linn.). *J. Agric. Sci.* 53(3):387–403
- Duc G, Aleksić JM, Marget P, Mikic A, Paull J, et al. 2015. Faba Bean. In *Grain Legumes*, Vol. 10, ed. AM De Ron, pp. 141–78. New York, NY: Springer New York
- Duc G. 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res.* 53(1–3):99–109
- Durand E, Bouchet S, Bertin P, Ressayre A, Jamin P, et al. 2012. Flowering time in maize: linkage and epistasis at a major effect locus. *Genetics.* 190(4):1547–62
- Dutta A, Choudhary P, Caruana J, Raina R. 2017. JM27, an *Arabidopsis* H3K9 histone demethylase, modulates defense against *Pseudomonas syringae* and flowering time. *Plant J.* 91(6):1015–28
- El-Rodeny W, Kimura M, Hirakawa H, Sabah A, Shirasawa K, et al. 2014. Development of EST-SSR markers and construction of a linkage map in faba bean (*Vicia faba*). *Breed. Sci.* 64(3):252–63
- Ellis RH, Roberts EH, Summerfield RJ. 1988a. Variation in the Optimum Temperature for Rates of Seedling Emergence and Progress Towards Flowering Amongst Six Genotypes of Faba Bean (*Vicia faba*). *Ann. Bot.* 62(2):119–26
- Ellis RH, Summerfield RJ, Roberts EH. 1988b. Effects of Temperature, Photoperiod and Seed Vernalization on Flowering in Faba Bean *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 61(1):17–27
- Ellis RH, Summerfield RJ, Roberts EH. 1990. Flowering in faba bean: genotypic differences in photoperiod sensitivity, similarities in temperature sensitivity, and implications for screening germplasm. *Ann. Bot.* 65(2):129–38
- Ellwood SR, Phan HTT, Jordan M, Hane J, Torres AM, et al. 2008. Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure

- with *Lens culinaris*. BMC Genomics. 9:380
- Erskine W, Nassib AM, Telaye A. 1988. Breeding for morphological traits. In World Crops: Cool Season Food Legumes, Vol. 5, ed. RJ Summerfield, pp. 117–27. Dordrecht: Springer Netherlands
- Evans LT. 1959. Environmental Control of Flowering in *Vicia faba* L. Ann. Bot. 23(4):521–46
- FAOSTAT. 2019. In FAOSTAT 2019. <https://www.fao.org/>. Accessed 20 Jan 2021
- Ferrándiz C, Liljegren SJ, Yanofsky MF. 2000. Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. Science. 289(5478):436–38
- Flavell RB, Bennett MD, Smith JB, Smith DB. 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. Biochem. Genet. 12(4):257–69
- Francia E, Tacconi G, Crosatti C, Barabaschi D, Bulgarelli D, et al. 2005. Marker assisted selection in crop plants. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 82(3):317–42
- Fratini R, Durán Y, García P, Pérez de la Vega M. 2007. Identification of quantitative trait loci (QTL) for plant structure, growth habit and yield in lentil. Span. J. Agric. Res. 5(3):348
- Fratini R, Ruiz ML, de la Vega MP. 2004. Intra-specific and inter-sub-specific crossing in lentil (*Lens culinaris* Medik.). Can. J. Plant Sci. 84(4):981–86
- Funatsuki H, Suzuki M, Hirose A, Inaba H, Yamada T, et al. 2014. Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean. Proc Natl Acad Sci USA. 111(50):17797–802
- Gao M, Zhu H. 2013. Fine mapping of a major quantitative trait locus that regulates pod shattering in soybean. Mol. Breeding. 32(2):485–91
- Garg N, Geetanjali. 2007. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. Agronomy Sust. Developm. 27(1):59–68
- Gasim S, Link W. 2007. Agronomic Performance and the Effect of Self-Fertilization on

- German Winter Beans. *Journal of Central European Agriculture*. 8:121–27
- Goujon T, Sibout R, Pollet B, Maba B, Nussaume L, et al. 2003. A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Mol. Biol.* 51(6):973–89
- Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131(3):872–77
- GrowerNotes, ed. 2018. Faba Bean section 12 harvest. In (GRDC) Grains Research and Development Cooperation. Canberra, Australia
- Gubert CM, Christy ME, Ward DL, Groner WD, Liljegren SJ. 2014. *ASYMMETRIC LEAVES1* regulates abscission zone placement in *Arabidopsis* flowers. *BMC Plant Biol.* 14:195
- Guen JL, Mesquida J, Morin G, Brunet F, Tasei JN, Carré S. 1992. Effect of insect pollination on abortion rate in faba bean. *Fabis Newsletter*
- Gutierrez N, Avila CM, Torres AM. 2020. The bHLH transcription factor VfTT8 underlies *zt2*, the locus determining zero tannin content in faba bean (*Vicia faba* L.). *Sci. Rep.* 10(1):14299
- Gutierrez N, Torres AM. 2019. Characterization and diagnostic marker for TTG1 regulating tannin and anthocyanin biosynthesis in faba bean. *Sci. Rep.* 9(1):16174
- Gutiérrez N, Palomino C, Satovic Z, Ruiz-Rodríguez MD, Vitale S, et al. 2013. QTLs for *Orobanche spp.* resistance in faba bean: identification and validation across different environments. *Mol. Breeding.* 32(4):909–22
- Hammer K. 1984. Das Domestikationssyndrom. *Die Kulturpflanze.* 32(1):11–34
- Han Y, Li X, Cheng L, Liu Y, Wang H, et al. 2016. Genome-Wide Analysis of Soybean JmjC Domain-Containing Proteins Suggests Evolutionary Conservation Following Whole-Genome Duplication. *Front. Plant Sci.* 7:1800

- Hecht V, Foucher F, Ferrándiz C, Macknight R, Navarro C, et al. 2005. Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes. *Plant Physiol.* 137(4):1420–34
- Hecht V, Laurie RE, Vander Schoor JK, Ridge S, Knowles CL, et al. 2011. The pea *GIGAS* gene is a *FLOWERING LOCUS T* homolog necessary for graft-transmissible specification of flowering but not for responsiveness to photoperiod. *Plant Cell.* 23(1):147–61
- Hedhly A, Hormaza JI, Herrero M. 2009. Global warming and sexual plant reproduction. *Trends Plant Sci.* 14(1):30–36
- Hofhuis H, Moulton D, Lessinnes T, Routier-Kierzkowska A-L, Bompfrey RJ, et al. 2016. Morphomechanical innovation drives explosive seed dispersal. *Cell.* 166(1):222–33
- Hospital F. 2009. Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica.* 136(2):303–10
- Hradilová I, Trněný O, Válková M, Cechová M, Janská A, et al. 2017. A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum sp.*). *Front. Plant Sci.* 8:542
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, et al. 1998. EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10(8):1321–32
- Hu Z, Yang H, Zhang L, Wang X, Liu G, et al. 2015. A large replum-valve joint area is associated with increased resistance to pod shattering in rapeseed. *J. Plant Res.* 128(5):813–19
- Iglesias FM, Bruera NA, Dergan-Dylon S, Marino-Buslje C, Lorenzi H, et al. 2015. Correction: the *Arabidopsis* DNA polymerase δ has a role in the deposition of transcriptionally active epigenetic marks, development and flowering. *PLoS Genet.* 11(6):e1005318

- Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA. 2003. *FKF1* is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*. 426(6964):302–6
- Immink RGH, Tonaco IAN, de Folter S, Shchennikova A, van Dijk ADJ, et al. 2009. *SEPALLATA3*: the “glue” for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol*. 10(2):R24
- IPCC. 2007. *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. In Core Writing Team, Pachauri, R.K., Reisinger, A. (Eds.), IPCC, Geneva, Switzerland., p. 104
- Jain M, Misra G, Patel RK, Priya P, Jhanwar S, et al. 2013. A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant J*. 74(5):715–29
- Jansen RC, Stam P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*. 136(4):1447–55
- Jansen RC. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*. 135(1):205–11
- Jansen RC. 1994. Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics*. 138(3):871–81
- Jung C, Müller AE. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci*. 14(10):563–73
- Kahrıman A, Yılmaz Temel H, Aydoğan A, Tanyolaç MB. 2015. Major quantitative trait loci for flowering time in lentil. *Turk J Agric For*. 39:588–95
- Kaló P, Seres A, Taylor SA, Jakab J, Kevei Z, et al. 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol. Genet. Genomics*. 272(3):235–46
- Kambal AE, Bond DA, Toynebee-Clarke G. 1976. A study on the pollination mechanism in

- field beans (*Vicia faba* L.). J. Agric. Sci. 87(03):519
- Kamran A, Iqbal M, Spaner D. 2014. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. Euphytica. 197(1):1–26
- Kaufmann K, Muiño JM, Jauregui R, Airoidi CA, Smaczniak C, et al. 2009. Target genes of the MADS transcription factor *SEPALLATA3*: integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower. PLoS Biol. 7(4):e1000090
- Kaur S, Kimber RBE, Cogan NOI, Materne M, Forster JW, Paull JG. 2014. SNP discovery and high-density genetic mapping in faba bean (*Vicia faba* L.) permits identification of QTLs for *Ascochyta* blight resistance. Plant Sci. 217–218:47–55
- Khazaei H, O’Sullivan DM, Jones H, Pitts N, Sillanpää MJ, et al. 2015. Flanking SNP markers for vicine–convicine concentration in faba bean (*Vicia faba* L.). Mol. Breeding. 35(1):38
- Khazaei H, O’Sullivan DM, Sillanpää MJ, Stoddard FL. 2014. Use of synteny to identify candidate genes underlying QTL controlling stomatal traits in faba bean (*Vicia faba* L.). Theor. Appl. Genet. 127(11):2371–85
- Kim MY, Shin JH, Kang YJ, Shim SR, Lee S-H. 2012. Divergence of flowering genes in soybean. J. Biosci. 37(5):857–70
- Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. Nat. Rev. Genet. 7(9):715–27
- Konishi S, Izawa T, Lin SY, Ebana K, Fukuta Y, et al. 2006. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. Science. 312(5778):1392–96
- Köpke U, Nemecek T. 2010. Ecological services of faba bean. Field Crops Res. 115(3):217–33
- Kosambi DD. 1943. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugen. 12(1):172–75

- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128(4):693–705
- Kreplak J, Madoui M-A, Cápál P, Novák P, Labadie K, et al. 2019. A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nat. Genet.* 51(9):1411–22
- Kumar J, Gupta S, Gupta DS, Singh NP. 2018. Identification of QTLs for agronomic traits using association mapping in lentil. *Euphytica*. 214(4):75
- Kurkina YN, Ngo Thi Ziem Kieu, Kolesnikov DA, Maradudina ON, Lazarev AV. 2020. Analysis of the ultrastructure of pollen grains and seeds to identify plant materials. *Eurasian Journal of Biosciences*
- Ladizinsky G. 1975. On the origin of the broad bean, *Vicia faba* L. *Isr J Bot.* (24):80–88
- Ladizinsky G. 1979. Seed dispersal in relation to the domestication of Middle East Legumes. *Econ. Bot.* 33(3):284–89
- Lamprecht H. 2010. Beiträge zur genetik von *Phaseolus vulgaris*. *Hereditas*. 16(1–2):169–211
- Lander ES, Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 121(1):185–99
- Lavana D, Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Singh AK, Kumar R, Grover A. 2015. Genetic approaches for breeding heat stress tolerance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Acta Physiol. Plant.* 37(1):1737
- Lawes DA, Bond DA. 1983. Classification, origin, breeding methods and objectives. In *The Faba Bean (Vicia Faba L.)*. PD Hebblethwaite (Ed). Butterworths, London., pp. 23–76
- Lee Y-S, An G. 2015. Regulation of flowering time in rice. *J. Plant Biol.* 58(6):353–60
- Lellis AD, Allen ML, Aertker AW, Tran JK, Hillis DM, et al. 2010. Deletion of the eFiso4G subunit of the *Arabidopsis* eFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Mol. Biol.* 74(3):249–63

- Lewis G, Schrirer B, Mackinder B, Lock M. 2005. Legumes of the World; Royal. Botanical Gardens: Kew, UK
- Lewis MW, Leslie ME, Liljegren SJ. 2006. Plant separation: 50 ways to leave your mother. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(1):59–65
- Liljegren SJ, Roeder AHK, Kempin SA, Gremski K, Østergaard L, et al. 2004. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell.* 116(6):843–53
- Link W, Ederer W, Metz P, Buiel H, Melchinger AE. 1994. Genotypic and environmental variation for degree of cross-fertilization in faba bean. *Crop Sci.* 34(4):960–64
- Link W, Schill B, von Kittlitz E. 1996. Breeding for wide adaptation in faba bean. *Euphytica.* 92(1–2):185–90
- Link W. 1990. Autofertility and rate of cross-fertilization: crucial characters for breeding synthetic varieties in faba beans (*Vicia faba* L.). *Theor. Appl. Genet.* 79(5):713–17
- Liu D, Wang D, Qin Z, Zhang D, Yin L, et al. 2014. The SEPALLATA MADS-box protein SLMBP21 forms protein complexes with JOINTLESS and MACROCALYX as a transcription activator for development of the tomato flower abscission zone. *Plant J.* 77(2):284–96
- Liu S, Wang F, Gao LJ, Li JH, Li RB, et al. 2012. Genetic analysis and fine mapping of *LH1* and *LH2*, a set of complementary genes controlling late heading in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 62(4):310–19
- Li LF, Olsen KM. 2016. To have and to hold: selection for seed and fruit retention during crop domestication. *Curr. Top. Dev. Biol.* 119:63–109
- Lord EM, Heslop-Harrison Y. 1984. Pollen-Stigma Interaction in the Leguminosae: Stigma Organization and the Breeding System in *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 54(6):827–36
- Maalouf F, Ahmed KS, Munzir K. 2008. The effect of mating system for developing

- combined resistance to chocolate spot and *Ascochyta* blight in faba bean. , p. 416
- Maleckova E, Brilhaus D, Wrobel TJ, Weber APM. 2019. Transcript and metabolite changes during the early phase of abscisic acid-mediated induction of crassulacean acid metabolism in *Talinum triangulare*. *J. Exp. Bot.* 70(22):6581–96
- Mallikarjuna BP, Samineni S, Thudi M, Sajja SB, Khan AW, et al. 2017. Molecular Mapping of Flowering Time Major Genes and QTLs in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Front. Plant Sci.* 8:1140
- MAPA. 2019. In MAPA 2019. <https://www.mapa.gob.es/>. Accessed 20 Jan 2021
- Marri L, Sparla F, Pupillo P, Trost P. 2005. Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase, and CP12 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 56(409):73–80
- McDonald GK, Adisarwanto T, Knight R. 1994. Effect of time of sowing on flowering in faba bean (*Vicia faba*). *Aust. J. Exp. Agric.* 34(3):395
- Meakin PJ, Roberts JA. 1990a. Dehiscence of Fruit in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.* 41(8):1003–11
- Meakin PJ, Roberts JA. 1990b. Dehiscence of Fruit in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.* 41(8):995–1002
- Medrano RFV, de Oliveira CA. 2014. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol. Biotechnol.* 56(7):599–608
- Memmott J, Craze PG, Waser NM, Price MV. 2007. Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions. *Ecol. Lett.* 10(8):710–17
- Menancio-Hautea D, Fatokun CA, Kumar L, Danesh D, Young ND. 1993. Comparative genome analysis of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and cowpea (*V. unguiculata* L. Walpers) using RFLP mapping data. *Theor. Appl. Genet.* 86(7):797–810

- Meyer RS, Purugganan MD. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* 14(12):840–52
- Michaels SD, Amasino RM. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* 11(5):949–56
- Millan T, Winter P, Jüngling R, Gil J, Rubio J, et al. 2010. A consensus genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on 10 mapping populations. *Euphytica.* 175(2):175–89
- Millán T, Madrid E, Castro P, Gil J, Rubio J. 2017. Genetic mapping and quantitative trait loci. In *The Chickpea Genome*, eds. RK Varshney, M Thudi, F Muehlbauer, pp. 83–106. Cham: Springer International Publishing
- Mimida N, Goto K, Kobayashi Y, Araki T, Ahn JH, et al. 2001. Functional divergence of the *TFL1-like* gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells.* 6(4):327–36
- Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G. 2002. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* 14 Suppl, S111-30
- Murgia ML, Attene G, Rodriguez M, Bitocchi E, Bellucci E, et al. 2017. A Comprehensive Phenotypic Investigation of the “Pod-Shattering Syndrome” in Common Bean. *Front. Plant Sci.* 8:251
- Muzquiz M, Varela A, Burbano C, Cuadrado C, Guillamón E, Pedrosa MM. 2012. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochem. Rev.* 11(2–3):227–44
- Niewiadomski P, Knappe S, Geimer S, Fischer K, Schulz B, et al. 2005. The *Arabidopsis* plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator *GPT1* is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell.* 17(3):760–75

- Nutman PS. 1976. IBP field experiments on nitrogen fixation by nodulated legumes. In Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. P.S. Nutman (Ed.). Cambridge University Press., pp. 211–237
- O'Neill SD. 1997. Pollination regulation of flower development. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:547–74
- Ocaña S, Seoane P, Bautista R, Palomino C, Claros GM, et al. 2015. Large-Scale Transcriptome Analysis in Faba Bean (*Vicia faba* L.) under *Ascochyta fabae* Infection. PLoS ONE. 10(8):e0135143
- Ogutcen E, Pandey A, Khan MK, Marques E, Penmetsa RV, et al. 2018. Pod shattering: A homologous series of variation underlying domestication and an avenue for crop improvement. Agronomy. 8(8):137
- Østergaard L, Kempin SA, Bies D, Klee HJ, Yanofsky MF. 2006. Pod shatter-resistant *Brassica* fruit produced by ectopic expression of the *FRUITFULL* gene. Plant Biotechnol. J. 4(1):45–51
- Paniagua C, Bilkova A, Jackson P, Dabravolski S, Riber W, et al. 2017. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. J. Exp. Bot. 68(13):3287–3301
- Parker TA, Berny Mier Y Teran JC, Palkovic A, Jernstedt J, Gepts P. 2020. Pod indehiscence is a domestication and aridity resilience trait in common bean. New Phytol. 225(1):558–70
- Parween S, Nawaz K, Roy R, Pole AK, Venkata Suresh B, et al. 2015. An advanced draft genome assembly of a desi type chickpea (*Cicer arietinum* L.). Sci. Rep. 5:12806
- Patrick JW, Stoddard FL. 2010. Physiology of flowering and grain filling in faba bean. Field Crops Res. 115(3):234–42

- Paul C, Gates P, Harris N, Boulter D. 1978. Asynchronous sexual development determines the breeding system in field beans. *Nature*. 275(5675):54–55
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA MADS-box* genes. *Nature*. 405(6783):200–203
- Pérez-de-Luque A, Lozano MD, Cubero JI, González-Melendi P, Risueño MC, Rubiales D. 2006. Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanche crenata* and *Vicia sativa*. *J. Exp. Bot.* 57(4):931–42
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. Springer Science and Business Media LLC
- Pickersgill B, Jones JK, Ramsay G, Stewart H. 1983. Problems and prospects of wide crossing in the Genus *Vicia* for the improvement of Faba bean. In Proceedings of the International Workshop on Faba Beans, Kabuli Chickpeas and Lentil in the 1980s, Saxena, M.C. and Varma, S., Eds., ICARDA, Aleppo, Syria, 57
- Pierre J-B, Huguet T, Barre P, Huyghe C, Julier B. 2008. Detection of QTLs for flowering date in three mapping populations of the model legume species *Medicago truncatula*. *Theor. Appl. Genet.* 117(4):609–20
- Platten JD, Foo E, Foucher F, Hecht V, Reid JB, Weller JL. 2005. The cryptochrome gene family in pea includes two differentially expressed *CRY2* genes. *Plant Mol. Biol.* 59(4):683–96
- Porter JR, Xie L, Challinor AJ, Cochrane K, Howden SM, et al. 2014. Chapter 7. Food Security and Food Production Systems. In *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Working Group II Contribution to the IPCC 5th Assessment Report*, Geneva, Switzerland
- Poulsen MH, Martin A. 1977. A reproductive tetraploid *Vicia faba* L. *Hereditas*. 87(1):123–

- Puspitasari W. 2017. Association analyses to genetically study reproduction and seed quality features of faba bean (*Vicia faba* L.). Doctoral dissertation thesis. Georg-August-Universität Göttingen
- Raina SN, Ogihara Y. 1995. Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in 49 *Vicia* species. *Theor. Appl. Genet.* 90(3–4):477–86
- Rai A, Umashankar S, Rai M, Kiat LB, Bing JAS, Swarup S. 2016. Coordinate regulation of metabolite glycosylation and stress hormone biosynthesis by *TT8* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 171(4):2499–2515
- Rajani S, Sundaresan V. 2001. The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr. Biol.* 11(24):1914–22
- Ramsay G, Pickersgill B, Jones JK, Hammond L, Stewart MH. 1984. Barriers to Interspecific Hybridisation between *Vicia Faba* and other Species of Section Faba. In *Vicia Faba: Agronomy, Physiology and Breeding*, eds. PD Hebblethwaite, TCK Dawkins, MC Heath, G Lockwood, pp. 201–8. Dordrecht: Springer Netherlands
- Rasmont P, Franzen M, Lecocq T, Harpke A, Roberts S, et al. 2015. Climatic risk and distribution atlas of european bumblebees. *BR.* 10:1–236
- Rau D, Murgia ML, Rodriguez M, Bitocchi E, Bellucci E, et al. 2019. Genomic dissection of pod shattering in common bean: mutations at non-orthologous loci at the basis of convergent phenotypic evolution under domestication of leguminous species. *Plant J.* 97(4):693–714
- Ray H, Bock C, Georges F. 2015. Faba Bean: Transcriptome Analysis from Etiolated Seedling and Developing Seed Coat of Key Cultivars for Synthesis of Proanthocyanidins, Phytate, Raffinose Family Oligosaccharides, Vicine, and Convicine. *Plant Genome.*

- 8(1):eplantgenome2014.07.0028
- Rejón JD, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, Carapito C, Zienkiewicz K, et al. 2013. Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate. *J. Exp. Bot.* 64(18):5695–5705
- Ridge S, Deokar A, Lee R, Daba K, Macknight RC, et al. 2017. The chickpea *early flowering 1 (efl1)* locus is an ortholog of *Arabidopsis ELF3*. *Plant Physiol.* 175(2):802–15
- Ripoll JJ, Roeder AHK, Ditta GS, Yanofsky MF. 2011. A novel role for the floral homeotic gene *APETALA2* during *Arabidopsis* fruit development. *Development.* 138(23):5167–76
- Robertson LD, El-Sherbeeney MH. 1995. Autofertility in a pure line faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 42(2):157–63
- Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH. 2002. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:131–58
- Roeder AHK, Ferrándiz C, Yanofsky MF. 2003. The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Curr. Biol.* 13(18):1630–35
- Román B, Satovic Z, Pozarkova D, Macas J, Dolezel J, et al. 2004. Development of a composite map in *Vicia faba*, breeding applications and future prospects. *Theor. Appl. Genet.* 108(6):1079–88
- Romkaew J, Nagaya Y, Goto M, Suzuki K, Umezaki T. 2008. Pod dehiscence in relation to chemical components of pod shell in soybean. *Plant Prod. Sci.* 11(3):278–82
- Román B, Satovic Z, Avila CM, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM. 2003. Locating genes associated with *Ascochyta fabae* resistance in *Vicia faba*. *Aust. J. Agric. Res.* 54(1):85
- Román B, Torres AM, Rubiales D, Cubero JI, Satovic Z. 2002. Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome.* 45(6):1057–63

- Rowlands DG. 1964. Fertility studies in the broad bean (*Vicia faba* L.). *Heredity*. 19(2):271–77
- Ruzin SE. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. New York: Oxford University Press
- R Development Core Team. 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Sallam A, Dhanapal AP, Liu S. 2016. Association mapping of winter hardiness and yield traits in faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop Pasture Sci*. 67(1):55
- Sallam A, Martsch R. 2015. Association mapping for frost tolerance using multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) population in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genetica*. 143(4):501–14
- Satovic Z, Avila CM, Cruz-Izquierdo S, Díaz-Ruíz R, García-Ruíz GM, et al. 2013. A reference consensus genetic map for molecular markers and economically important traits in faba bean (*Vicia faba* L.). *BMC Genomics*. 14:932
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, et al. 2008. Genome structure of the legume *Lotus japonicus*. *DNA Res*. 15(4):227–39
- Sattell, R.; Dick, R.; Luna, J.; McGrath, D.; Peachey, E. 1998. *Common Vetch (Vicia sativa L.)*. In: *Oregon cover crops*. Oregon State University Extension Service, Corvallis
- Schilling S, Pan S, Kennedy A, Melzer R. 2018. MADS-box genes and crop domestication: the jack of all traits. *J. Exp. Bot*. 69(7):1447–69
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, et al. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. 463(7278):178–83
- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, et al. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat. Genet*.

46(7):707–13

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*. 9(7):671–75

Sehra B, Franks RG. 2017. Redundant CARG Box Cis-motif Activity Mediates *SHATTERPROOF2* Transcriptional Regulation during *Arabidopsis thaliana* Gynoecium Development. *Front. Plant Sci.* 8:1712

Settele J, Bishop J, Potts SG. 2016. Climate change impacts on pollination. *Nat. Plants*. 2(7):16092

Shapiro SS, Wilk MB. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 52(3/4):591-611.

Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, et al. 1999. The *FLF MADS box* gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*. 11(3):445–58

Shim JS, Kubota A, Imaizumi T. 2017. Circadian clock and photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: *CONSTANS* is a hub for signal integration. *Plant Physiol.* 173(1):5–15

Shi Q, Zhou J, Wang P, Lin X, Xu Y. 2015. Protein expression and characterization of SEP3 from *Arabidopsis thaliana*. *Genet. Mol. Res.* 14(4):12529–36

Singhal VK, Kaur M, Kumar HP, Gupta RC. 2012. High Pollen Sterility and 2n Pollen Grains in an Asynaptic 4x Cytotype (2n=48) of *Solanum nigrum* L. *Cytologia (Tokyo)*. 77(3):333–42

Singh AK, Bharati, Ch N, Ra M, Pedpati A. 2013. An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect. *Afr. J. Agric. Res.* 8:

Singh M, Kumar K, Bisht IS, Dutta M, Rana MK, et al. 2015. Exploitation of wild annual *Cicer* species for widening the gene pool of chickpea cultivars. *Plant Breed.* 134(2):186–92

- Singh RP, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J. 1998. *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology*. 88(9):890–94
- Sjödin JAN. 1970. Induced asynaptic mutants in *Vicia faba* L. *Hereditas*. 66(2):215–32
- Smith ML. 1982. Factors affecting flower abscission in field beans (*Vicia Faba* L. Minor). Doctoral dissertation thesis. Durham Theses, Durham University
- Song YH, Ito S, Imaizumi T. 2013. Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends Plant Sci*. 18(10):575–83
- Stoddard FL, Bond DA. 1987. The pollination requirements of the faba bean. *Bee World*. 68(3):144–52
- Stoddard FL. 1986. Pollination and fertilization in commercial crops of field beans (*Vicia faba* L.). *J. Agric. Sci*. 106(1):89–97
- Stoddard FL. 2017. Climate change can affect crop pollination in unexpected ways. *J. Exp. Bot*. 68(8):1819–21
- Suanum W, Somta P, Kongjaimun A, Yimram T, Kaga A, et al. 2016. Co-localization of QTLs for pod fiber content and pod shattering in F2 and backcross populations between yardlong bean and wild cowpea. *Mol. Breeding*. 36(6):80
- Summers JE, Bruce DM, Vancanneyt G, Redig P, Werner CP, et al. 2003. Pod shatter resistance in the resynthesized *Brassica napus* line DK142. *J. Agric. Sci*. 140(1):43–52
- Suresh S, Park J-H, Cho G-T, Lee H-S, Baek H-J, et al. 2013. Development and molecular characterization of 55 novel polymorphic cDNA-SSR markers in faba bean (*Vicia faba* L.) using 454 pyrosequencing. *Molecules*. 18(2):1844–56
- Suso MJ, Cubero JI. 1986. Genetic changes under domestication in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet*. 72(3):364–72
- Suso MJ, del Río R. 2014. Faba bean gene-pools development for low-input agriculture:

- understanding early stages of natural selection. *Euphytica*. 196(1):77–93
- Suso MJ, Maalouf F. 2010. Direct and correlated responses to upward and downward selection for outcrossing in *Vicia faba*. *Field Crops Res.* 116(1–2):116–26
- Suso MJ, Moreno MT. 1999. Variation in outcrossing rate and genetic structure on six cultivars of *Vicia faba* as affected by geographic location and year L. *Plant Breeding*. 118(4):347–50
- Suso MJ, Moreno MT. 2004. Floral traits variation in *Vicia faba* L. with special reference to predictors of allogamy.
- Suzuki M, Fujino K, Funatsuki H. 2009. A Major Soybean QTL, *qPDH1*, Controls Pod Dehiscence without Marked Morphological Change. *Plant Prod. Sci.* 12(2):217–23
- Suzuki M, Fujino K, Nakamoto Y, Ishimoto M, Funatsuki H. 2010. Fine mapping and development of DNA markers for the *qPDH1* locus associated with pod dehiscence in soybean. *Mol. Breeding*. 25(3):407–18
- Takahashi Y, Kongjaimun A, Muto C, Kobayashi Y, Kumagai M, et al. 2019. Genetic factor for twisting legume pods identified by fine-mapping of shattering-related traits in azuki bean and yard-long bean. *BioRxiv*
- Tang H, Cuevas HE, Das S, Sezen UU, Zhou C, et al. 2013. Seed shattering in a wild sorghum is conferred by a locus unrelated to domestication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(39):15824–29
- Tao Z, Huang Y, Zhang L, Wang X, Liu G, Wang H. 2017. BnLATE, a Cys2/His2-Type Zinc-Finger Protein, Enhances Silique Shattering Resistance by Negatively Regulating Lignin Accumulation in the Silique Walls of *Brassica napus*. *PLoS ONE*. 12(1):e0168046
- Torres AM, Avila CM, Gutierrez N, Palomino C, Moreno MT, Cubero JI. 2010. Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res.* 115(3):243–52

- Torres AM, Moreno MT, Cubero JI. 1993a. Genetics of Six Components of Autofertility in *Vicia faba*. *Plant Breeding*. 110(3):220–28
- Torres AM, Weeden NF, Martín A. 1993b. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 85(8):937–45
- Tsugeki R, Ditengou FA, Sumi Y, Teale W, Palme K, Okada K. 2009. *NO VEIN* mediates auxin-dependent specification and patterning in the *Arabidopsis* embryo, shoot, and root. *Plant Cell*. 21(10):3133–51
- Udvardi M, Poole PS. 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:781–805
- Van Gastel A. 2007. Chickpea seed production. In *Chickpea Breeding and Management*, pp. 417–44
- van Ooijen JW. 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor. Appl. Genet.* 84(7–8):803–11
- van Ooijen JW. 2004. MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma B.V. Wageningen, Netherlands.
- Van Ooijen JW. 2006. JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, 33. 33(10):4
- Varshney RK, Chen W, Li Y, Bharti AK, Saxena RK, et al. 2011. Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nat. Biotechnol.* 30(1):83–89
- Varshney RK, Dubey A. 2009. Novel Genomic Tools and Modern Genetic and Breeding Approaches for Crop Improvement. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 18(2):127–38
- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, et al. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat. Biotechnol.*

- 31(3):240–46
- Varshney RK, Thudi M, Roorkiwal M, He W, Upadhyaya HD, et al. 2019. Resequencing of 429 chickpea accessions from 45 countries provides insights into genome diversity, domestication and agronomic traits. *Nat. Genet.* 51(5):857–64
- Vaughan DA, Balázs E, Heslop-Harrison JS. 2007. From crop domestication to super-domestication. *Ann. Bot.* 100(5):893–901
- Vaz Patto MC, Torres AM, Koblizkova A, Macas J, Cubero JI. 1999. Development of a genetic composite map of *Vicia faba* using F2 populations derived from trisomic plants. *Theor. Appl. Genet.* 98(5):736–43
- Voorrips RE. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93(1):77–78
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJM, McQuinn R, Chung M, et al. 2009. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *Plant Cell.* 21(10):3041–62
- Wang R, Ripley VL, Rakow G. 2007. Pod shatter resistance evaluation in cultivars and breeding lines of *Brassica napus*, *B. juncea* and *Sinapis alba*. *Plant Breeding.* 126(6):588–95
- Wang XJ, Cao XL, Hong Y. 2005. Isolation and characterization of flower-specific transcripts in *Acacia mangium*. *Tree Physiol.* 25(2):167–78
- Wang Z, Li N, Jiang S, Gonzalez N, Huang X, et al. 2016. SCF(SAP) controls organ size by targeting PPD proteins for degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* 7:11192
- Watanabe S, Harada K, Abe J. 2012. Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean. *Breed. Sci.* 61(5):531–43
- Webb A, Cottage A, Wood T, Khamassi K, Hobbs D, et al. 2016. A SNP-based consensus

- genetic map for synteny-based trait targeting in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Biotechnol. J.* 14(1):177–85
- Webb CJ, Lloyd DG. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *N.Z. J. Bot.* 24(1):163–78
- Weeden NF, Brauner S, Przyborowski JA. 2002. Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7(2B):657–63
- Weeden NF, Muehlbauer FJ, Ladizinsky G. 1992. Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. *J. Hered.* 83(2):123–29
- Weeden NF. 2007. Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: is there a common genetic basis to the “domestication syndrome” for legumes? *Ann. Bot.* 100(5):1017–25
- Weller JL, Hecht V, Liew LC, Sussmilch FC, Wenden B, et al. 2009. Update on the genetic control of flowering in garden pea. *J. Exp. Bot.* 60(9):2493–99
- Weller JL, Ortega R. 2015. Genetic control of flowering time in legumes. *Front. Plant Sci.* 6:207
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18(24):7213–18
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22):6531–35
- Xia R, Wang J, Liu C, Wang Y, Wang Y, et al. 2006. ROR1/RPA2A, a putative replication protein A2, functions in epigenetic gene silencing and in regulation of meristem development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18(1):85–103
- Xu Y, Crouch JH. 2008. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to

- Practice. Crop Sci. 48(2):391
- Yaish MW, Colasanti J, Rothstein SJ. 2011. The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. J. Exp. Bot. 62(11):3727–35
- Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T. 2005. *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. Plant Cell Physiol. 46(8):1175–89
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM. 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. Nature. 346(6279):35–39
- Yoon J, Choi H, An G. 2015. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. J. Integr. Plant Biol. 57(11):902–12
- Yoo SJ, Chung KS, Jung SH, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH. 2010. *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* has *TFL1-like* activity and functions redundantly with *TFL1* in inflorescence meristem development in *Arabidopsis*. Plant J. 63(2):241–53
- Yoo SY, Kardailsky I, Lee JS, Weigel D, Ahn JH. 2004. Acceleration of flowering by overexpression of *MFT (MOTHER OF FT AND TFL1)*. Mol. Cells. 17(1):95–101
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, et al. 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature. 480(7378):520–24
- Zhang Q, Tu B, Liu C, Liu X. 2018. Pod anatomy, morphology and dehiscing forces in pod dehiscence of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Flora. 248:48–53
- Zhang Y, Shen YY, Wu XM, Wang JB. 2016. The basis of pod dehiscence: anatomical traits of the dehiscence zone and expression of eight pod shatter-related genes in four species of *Brassicaceae*. Biol. Plant. 60(2):343–54
- Zheng S, Hu H, Ren H, Yang Z, Qiu Q, et al. 2019. The *Arabidopsis* H3K27me3 demethylase

JUMONJI 13 is a temperature and photoperiod dependent flowering repressor. *Nat. Commun.* 10(1):1303

Zheng Y, Deng X, Qu A, Zhang M, Tao Y, et al. 2018. Regulation of pollen lipid body biogenesis by MAP kinases and downstream WRKY transcription factors in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 14(12):e1007880

Zhu H, Choi H-K, Cook DR, Shoemaker RC. 2005. Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol.* 137(4):1189–96

