



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



MASTER UNIVERSITARIO
BIOTECNOLOGIA
TRABAJO FIN DE MASTER

**Identificación de marcadores asociados a la fecha
de floración en garbanzo**

**Identification of markers associated with
flowering time in chickpea**

Adrián Pérez Rial

Grupo Mejora Genética Vegetal (AGR-114)

TUTOR(a) Y Director(a): Jose V. Die Ramón

CODIRECTOR(A): Patricia Castro López

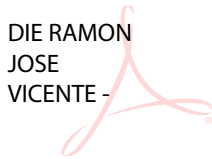
Córdoba, septiembre de 2022

Informe razonado de los Directores del Trabajo Fin de Máster

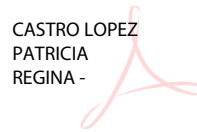
El documento presentado por Adrián Pérez Rial con el título “Identificación de marcadores asociados a la fecha de floración en garbanzo” corresponde a su Trabajo Fin de Máster en Biotecnología. El trabajo se ajusta perfectamente a los requisitos académicos exigidos para su lectura. A su vez, el excelente grado de formación científico-técnica alcanzado por el estudiante queda avalado por la presentación de sus resultados en el *X Congreso de Mejora Genética de Plantas* (Pontevedra, 19-22 septiembre 2022) y *10th International Conference on Legume Genomics and Genetics* (virtual conference, 8 noviembre 2022).

Por todo ello, se autoriza la presentación y defensa del TFM.

DIE RAMON
JOSE
VICENTE -



CASTRO LOPEZ
PATRICIA
REGINA -



Firma del alumno: Adrián Pérez Rial

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera darle las gracias al grupo de investigación AGR-114 de la UCO por todo el apoyo que me han brindado y tratarme como si fuera uno más desde el primer momento. Muchas gracias Lola, Juan, Teresa, Patricia y Jose. Un reconocimiento especial merece mi compañero de grupo, Alejandro, que me ha ayudado en todo el proceso de elaboración de este trabajo, acompañándome incluso varios fines de semana al laboratorio.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.	4
ÍNDICE DE TABLAS.	5
RESUMEN.	6
ABSTRACT.	7
INTRODUCCIÓN.	8
El garbanzo cultivado.	8
El control del inicio de la floración.	10
El desarrollo de líneas casi isogénicas.	13
OBJETIVOS.	15
MATERIALES Y MÉTODOS.	16
Material vegetal y condiciones de crecimiento.	16
Caracterización fenotípica.	19
Secuenciación de las NILs, caracterización a nivel de secuencia y selección de genes candidatos para la fecha de floración.	20
Diseño de cebadores para genes candidatos y genes relacionados con la fecha de floración.	22
Recogida de tejido vegetal para extracción de ARN y análisis de expresión.	23
RESULTADOS.	24
Caracterización fenotípica de las NILs.	24
Caracterización a nivel de secuencia de las NILs.	27
Genes candidatos para la fecha de floración en la pareja de NILs.	28
Secuencia de los cebadores diseñados para los genes candidatos y otros genes relacionados con la fecha de floración.	32
DISCUSIÓN.	35
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.	39
BIBLIOGRAFÍA.	40
ANEXOS.	49

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Flor y semilla de garbanzo.	9
Figura 2. Esquema de obtención de la pareja de NILs para la fecha de floración.	18
Figura 3. Fotografía de las plantas sembradas en campo.	17
Figura 4. Planta en el momento de la toma del dato de la fecha de floración.	19
Figura 5. (A) Ejemplo de medición de la altura de la planta. (B) Posición de los tres primeros nudos y ramificaciones que surgen de ellos.	20
Figura 6. (A) Plantas sembradas en macetas con perlita en cámara. (B) Imagen de un pool de tejido de hojas jóvenes.	23
Figura 7. Tiempo de floración representativo de cada línea en las distintas condiciones donde se sembraron.	24
Figura 8. Imagen en la que se señalan los entrenudos en una planta de la NIL precoz y en una planta de la NIL tardía.	26
Figura 9. (A) Índice de ramificación estimado mediante 5000 simulaciones Monte Carlo introduciendo los datos de seis plantas de cada NIL. (B) Fotografía de plantas de la NIL precoz y NIL tardía en la que se observan las diferencias en el grado de ramificación.	26
Figura 10. (A) Distribución en el genoma de las 65 262 variantes asignadas a un cromosoma. (B) Distribución en el genoma de las 235 variantes de alto impacto teórico asignadas a un cromosoma.	28
Figura 11. Diagrama de flujo resumen con los criterios de selección realizados hasta determinar los 23 genes candidatos para la fecha de floración.	29
Figura 12. Diagramas que muestran la localización de diferentes variaciones mediante una línea roja en el ARNm de los tres genes que son objeto de interés para un estudio de expresión posterior.	32
Figura 13. Representación gráfica de las estructuras secundarias esperadas en los amplicones.	34

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Principales genes implicados en la vía de señalización por fotoperiodo y ritmos circadianos en <i>A. thaliana</i> .	12
Tabla 2. Principales características de las líneas JG62 e ILC72.	16
Tabla 3. Clasificación por impacto teórico de efectos producidos por mutaciones en los genes.	21
Tabla 4. Identificadores, posición cromosómica, localización en la cadena sentido (+) o antisentido (–) y anotación según NCBI de los genes para los que se diseñaron secuencias de cebadores.	22
Tabla 5. Media y desviación estándar de los caracteres fenotípicos cuantificados en las plantas de la NIL precoz y de la NIL tardía sembradas en campo.	25
Tabla 6. Identificadores, posición cromosómica, localización en la cadena sentido (+) o antisentido (–) y anotación según NCBI de los 23 genes candidatos para la fecha de floración en la pareja de NILs de <i>C. arietinum</i> estudiada.	30
Tabla 7. Identificadores de los genes de <i>C. arietinum</i> y secuencias de los cebadores diseñados.	33

RESUMEN.

El garbanzo cultivado (*Cicer arietinum* L.), la segunda leguminosa grano más producida a nivel mundial, presenta una productividad media muy alejada del potencial estimado debido, principalmente, a factores de tipo abiótico que tienen lugar al final del periodo del cultivo. Por ello, la floración precoz es un carácter de gran interés agronómico para los mejoradores. La identificación y caracterización de marcadores o genes candidatos asociados al control del inicio de la floración es fundamental para el éxito de los programas de mejora en garbanzo. En este contexto, el empleo en investigación de líneas casi isogénicas (NILs) que se diferencien en el tiempo de floración constituye una estrategia de gran potencial al permitir la eliminación de la mayor parte del ruido de fondo genético.

En este estudio, se ha fenotipado y secuenciado una pareja de NILs de *C. arietinum* desarrollada para la fecha de floración. Mediante la caracterización fenotípica se han encontrado diferencias significativas en caracteres (*i. e.* ramificación, altura, longitud del entrenudo y números de semillas producidas), además de la propia fecha de floración. Por otro lado, la secuenciación ha permitido constatar que la pareja de NILs empleada presenta la mayor parte de su genoma en homocigosis y que las diferencias a nivel de secuencia entre ellas son mínimas. Asimismo, ha permitido la identificación de 23 genes que presentan variaciones en homocigosis entre las NILs y que, por tanto, son potenciales candidatos asociados con los caracteres estudiados. Entre ellos, destaca el gen *ELF3A*, uno de los genes implicados en el reloj circadiano, cuyo alelo recesivo correspondiente con una delección de 11 pb parece provocar floración precoz, aunque también podría tener influencia en un menor grado de ramificación y un incremento de la longitud del entrenudo. Otros genes reseñables son LOC101501328 y LOC101504314 que codifican para una proteína similar a extensina y para un tipo de regulador implicado en la señalización por citoquininas, respectivamente.

En el marco de este trabajo se ha procedido a la recogida de tejido de hojas jóvenes de las que se extraerá ARN y al diseño de secuencias de cebadores, tanto para genes candidatos como para otros genes implicados en la cascada de señalización de la floración, con el fin de realizar un estudio de expresión mediante qPCR. El análisis de los diferentes perfiles temporales de transcripción permitirá la caracterización del efecto que provocan las variaciones presentes en las NILs y diseñar marcadores moleculares para el carácter fecha de floración.

Palabras clave: *Cicer arietinum*, floración precoz, NILs, secuenciación, SNPs.

ABSTRACT.

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the second grain legume cultivated in the world. However, the average yield is far from its potential of 3 – 5 t/ha mainly due to constraints imposed by terminal abiotic stresses. For this reason, early flowering is a desirable trait for chickpea. Identification and characterization of molecular markers and candidate genes associated with flowering time are essential for the success of breeding programs. Near-isogenic lines (NILs) provide plant material differing only in a small target region of the genome facilitating the detection of candidate genes underlying phenotypes. Thus, analysis of NILs that differ from flowering time represents an effective tool to dissect the trait.

In this study, a pair of *C. arietinum* NILs has been phenotyped and sequenced. On the one hand, phenotypic evaluation has shown significant differences in some traits (*i.e.* branching, height, internode length and number of seeds) besides flowering initiation. On the other hand, sequencing has confirmed high levels of homozygosity with minimal sequence variations between them. Moreover, sequencing has allowed the identification of 23 genes potentially associated with flowering time. We focused on locus *ELF3A*, a gene involved in the circadian clock, whose recessive allele corresponding to a deletion of 11 bp seems to confer early flowering. However, it could also have an influence on a lower branching and an increase in internode length. Other notable genes are LOC101501328 (encoding an extensin-like protein) and LOC101504314 (two-component response regulator ARR5-like involved in cytokinin signaling).

During this study, we have collected young leaves that will be used eventually for gene expression analyses. Primer sequences for selected candidate genes regulating flowering time have been designed considering strict criteria for successful qPCR assays. Expression profile differences will enable the characterization of the alleles in the contrasting NILs and eventually the development of molecular markers linked to flowering time.

Keywords: *Cicer arietinum*, early flowering, NILs, sequencing, SNPs.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. El garbanzo cultivado.

El garbanzo cultivado (*Cicer arietinum* L.) es una planta anual y autógama que pertenece a la familia de las leguminosas (Leguminosae) y, en concreto, al género *Cicer* (van der Maesen et al., 2007). Se trata de una especie diploide ($2n = 2x = 16$) que posee un tamaño de genoma de ≈ 530 Mb (Varshney et al., 2013). El género *Cicer* incluye un total de 44 especies, 35 perennes y 9 anuales, de las cuales únicamente se cultiva *C. arietinum* (van der Maesen et al., 2007). La especie silvestre *C. reticulatum*, cuya distribución se reduce a ciertas zonas del sudeste de Turquía, está considerada como la progenitora del garbanzo cultivado. Es una de las primeras especies que se domesticaron hace más de 10 000 años en el *Creciente Fértil* (este de Asia), asociado con el origen de la agricultura junto con otros importantes cultivos actuales como el trigo o el guisante (Abbo et al., 2003; Ladizinsky & Adler, 1976).

Dentro de la familia Leguminosae, el garbanzo y otras especies conforman el grupo de alimentos que se conoce como legumbres. Las legumbres son definidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) como un tipo de leguminosas que se cosecha para obtener sus semillas comestibles secas. La FAO lleva años dedicando grandes esfuerzos a la promoción del cultivo y consumo de legumbres debido a su enorme potencial de contribuir al cumplimiento de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, ya que permitirían fortalecer la seguridad alimentaria global y prevenir la desnutrición. Esto es debido a que son una fuente barata de proteínas y micronutrientes esenciales. Además, contribuyen a la fijación de nitrógeno atmosférico gracias a la asociación simbiótica que se establece entre las raíces de las plantas y bacterias del suelo del género *Rhizobium*, aumentando así la fertilidad del terreno sin necesidad de emplear productos artificiales (Frailey et al., 2022; Jacob et al., 2016). Desde el punto de vista nutricional, el garbanzo contiene *grosso modo* un 60 % de carbohidratos, un 20 % de proteínas y un 6 % de lípidos (Wood & Grusak, 2007). Presenta una composición balanceada de todos los aminoácidos esenciales excepto de los que contienen azufre, hecho que puede compensarse añadiendo cereales a la dieta (Jukanti et al., 2012). Asimismo, es rico en fibra y minerales como P, Ca, Mg, Fe y Zn (Rachwa-Rosiak et al., 2015). Además, al contrario que otras legumbres, no contiene apenas antinutrientes (Millan et al., 2006; Wood & Grusak, 2007).

Comercialmente, se distinguen dos tipos principales de garbanzo cultivado según sus características morfológicas: el tipo desi y el tipo kabuli (*Figura 1*). El tipo desi, más similar al progenitor silvestre, se caracteriza por presentar flores rosadas y semillas de un tamaño más pequeño, angulares, con una cubierta rugosa, dura y de color marrón oscuro. Este tipo se cultiva sobre todo en el sur de Asia y en

África. Por otra parte, el tipo kabuli, cultivado principalmente en los países de la cuenca mediterránea, presenta flores blancas y semillas de un tamaño más grande, con forma redondeada, de superficie lisa y color beige. El tipo desi es el más cultivado y representa aproximadamente el 70 % del garbanzo producido mundialmente (Ortega Martínez, 2018; van der Maesen, 1972).



Figura 1. Flor y semilla de garbanzo de tipo kabuli (izquierda) y tipo desi (derecha).¹

Actualmente, el garbanzo es la segunda especie de legumbre más producida a nivel mundial, solo por detrás de la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), con 15,08 millones de toneladas que fueron sembradas en 14,84 millones ha y en, al menos, 49 países de los cinco continentes, sobre todo en regiones templadas y semiáridas (FAOSTAT, 2020). Los principales países productores son India (11,08 millones de toneladas), Turquía (630 000 t), Pakistán (497 608 t), Myanmar (481 668 t) y Etiopía (457 319 t). Estos cinco países produjeron más del 87 % del garbanzo cultivado en 2020. La mayor parte de la producción de garbanzos, por tanto, tiene lugar en los países en desarrollo y menos del 14 % de la producción llega al mercado internacional, lo que refleja la alta importancia de este cultivo en el autoconsumo (FAOSTAT, 2020).

La productividad media del garbanzo fue de aproximadamente 1,02 t/ha en 2020 (FAOSTAT, 2020), lejos del potencial estimado de 3 – 5 t/ha en condiciones favorables (Ortega Martínez, 2018) y prácticamente el mismo que el máximo alcanzado en el año 2013 (1,05 t/ha; FAOSTAT, 2013). Este hecho es debido principalmente a la constricción impuesta por estreses abióticos como las altas temperaturas o la sequía

¹ Imágenes modificadas tomadas de (de izquierda a derecha y de arriba a abajo):
<https://www.agric.wa.gov.au/chickpeas/neelam-desi-chickpea-southern-australia>,
<https://sumtradecorp.com/product/chickpeas/>,
<https://plantvillage.psu.edu/topics/chickpea-gram-pea/infos>,
<https://www.scienceimage.csiro.au/image/3600>

que reducen el periodo óptimo de crecimiento (Arriagada et al., 2022; Kumar & Abbo, 2001). En el contexto actual de cambio climático, en el que estas condiciones se verán agravadas, es fundamental desarrollar diferentes estrategias con el objetivo de mejorar el cultivo. Uno de los enfoques empleados, complementario a la búsqueda de resistencia a los estreses abióticos, es el de desarrollar variedades con una fenología y maduración temprana que permita evitar las condiciones más desfavorables que se dan al final del periodo de cultivo. Por ello, aumentar el conocimiento acerca del control genético subyacente a caracteres como el tiempo de floración constituye una aproximación prometedora para facilitar la implementación de programas de mejora con los que aumentar el rendimiento agronómico del garbanzo.

1.2. El control del inicio de la floración.

Las plantas con flor sufren, en algún punto de su ciclo vital, la transición desde la fase vegetativa a la reproductiva, siempre y cuando coincidan unas condiciones ambientales (*e. g.* temperatura y fotoperiodo) y unas condiciones internas (*e. g.* edad, balance de energía, hormonas y reloj circadiano) adecuadas que permitan la expresión de los genes que promueven y controlan el proceso de floración (Huijser & Schmid, 2011). La idoneidad del momento en el que se produce esa transición es crítica para el éxito reproductivo de la planta y, desde un punto de vista agronómico, para maximizar su rendimiento (Ortega Martínez, 2018). Por tanto, la regulación del inicio de la floración y los cambios genéticos que le afectan son fundamentales para la supervivencia y adaptación a diferentes entornos ambientales de las especies vegetales con flor, tanto en el caso de los cultivos como en el de las plantas silvestres. Sin embargo, sigue existiendo en la mayoría de los casos un conocimiento bastante limitado sobre los mecanismos moleculares que tienen lugar (Weller & Macknight, 2019).

En la comprensión del control del proceso de la floración se ha avanzado significativamente gracias a los trabajos realizados en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. La información generada en esta planta modelo proporciona la base ideal para abordar el estudio en especies de interés agronómico (Ortega Martínez, 2018; Weller & Macknight, 2019). En general, las principales familias de los genes centrales que controlan el inicio de la floración parecen estar conservadas en las leguminosas, aunque existen duplicaciones y deleciones de genes (Hecht et al., 2005; Weller & Ortega, 2015) así como discrepancias en la importancia funcional que estos tienen en el proceso (Wong et al., 2014), reflejo de su historia evolutiva independiente desde la divergencia de los linajes a los que pertenecen. Las leguminosas cultivadas más importantes se pueden clasificar dentro de dos grupos taxonómicos con distintos patrones de respuesta estacional: el clado *galegoide* y el clado *faseoloide*. El clado *galegoide* (*e. g.* guisante, lenteja, garbanzo, habas y *Medicago truncatula*) incluye especies de regiones templadas en las

que, por lo general, la vernalización y los días largos promueven la floración (al igual que en *A. thaliana*). Por su parte, el clado *faseoloide* (*e. g.* soja y judía) se corresponde con especies que carecen de una respuesta a la vernalización y florecen en condiciones de día corto (Smýkal et al., 2015; Weller & Ortega, 2015).

La floración es un proceso sumamente complejo cuya iniciación depende de la integración de diferentes señales en las que participan cientos de genes (Weller & Macknight, 2019), destacando la influencia que ejercen la percepción de la luz y los ritmos circadianos. La importancia de esta vía se evidencia en que mutaciones de genes implicados en ella causan variaciones en el tiempo de floración (Hecht et al., 2007; Ridge et al., 2017; Weller & Ortega, 2015; Weller et al., 2012). En la *Tabla 1* se recogen los principales loci que participan en esta cascada de señalización. Los fotorreceptores proporcionan la información sobre el entorno lumínico que permite la detección de la duración del día, es decir, del fotoperiodo (Shim et al., 2017). En las leguminosas se han identificado diferentes clases de fotorreceptores: tres fitocromos que absorben luz en el espectro del rojo y rojo lejano (*PHYA*, *PHYB* y *PHYE*), dos criptocromos que absorben luz en el azul (*CRY1* y *CRY2*; Hecht et al., 2005; Platten et al., 2005) y solo dos fotorreceptores de flavoproteínas de dominio LOV en la familia *FKF1/ZTL* (Weller & Ortega, 2015). Todas estas señales convergen en el reloj circadiano que en *A. thaliana* está compuesto por varios factores de transcripción interconectados por regulaciones de retroalimentación que se suceden en el tiempo actuando como un oscilador genético. Simplificando, en las primeras horas del día se expresan *CCA1* y *LHY*; a medida que avanzan las horas, comienza la expresión de *PRR9*, *PRR7* y *PRR5* que reprimen la expresión de los anteriores. Por la tarde, se expresan los genes *LUX*, *ELF3* y *ELF4* que conforman el denominado *Evening Complex*, reprimiendo la transcripción de *PRR9* y *LUX*. Posteriormente, ya en la noche, se expresa *TOC1* que reprime a todos los demás (Shim et al., 2017). Otro gen relacionado con el reloj circadiano es *GI* que codifica una proteína que promueve la floración y cuya acumulación cíclica parece depender de su degradación mediada por *COP1* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1*; gen que codifica una ubiquitin-ligasa) junto con *ELF3* (Sawa & Kay, 2011; Xu et al., 2016; Yu et al., 2008). Todos estos genes del reloj están representados en las leguminosas, aunque las del grupo *galegoide* parecen tener solo un gen ortólogo a los genes *CCA1* y *LHY*, mientras que los dos grupos de leguminosas presentan duplicaciones de *TOC1*, *ELF3* y *GI* (Weller & Ortega, 2015).

Tabla 1. Principales genes implicados en la vía de señalización por fotoperiodo y ritmos circadianos en *A. thaliana* ordenados según el rol asignado.

Rol asignado	Nombre	Símbolo
Fotorreceptores		
	CRYPTOCHROME	<i>CRY</i> (<i>CRYA</i> , <i>CRYB</i>)
	Familia FLAVIN-BINDING KELCH-REPEAT F-BOX1/ZEITLUPE	<i>FKF1/ZTL</i>
	PHYTOCHROME	<i>PHY</i> (<i>PHYA</i> , <i>PHYB</i> , <i>PHYE</i>)
Genes del reloj circadiano		
Expresión por la mañana	<i>CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1</i>	<i>CCA1</i>
	<i>LATE ELONGATED HYPOCOTYL</i>	<i>LHY</i>
Expresión al mediodía	<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 5</i>	<i>PRR5</i>
	<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7</i>	<i>PRR7</i>
	<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9</i>	<i>PRR9</i>
Expresión por la tarde (<i>Evening Complex</i>)	<i>EARLY FLOWERING 3</i>	<i>ELF3</i>
	<i>EARLY FLOWERING 4</i>	<i>ELF4</i>
	<i>LUX ARRHYTHMO</i>	<i>LUX</i>
Expresión por la noche	<i>TIMING OF CAB EXPRESSION 1</i>	<i>TOC1</i>
Expresión dependiente del reloj circadiano		
	<i>GIGANTEA</i>	<i>GI</i>
Integradores florales		
	<i>CONSTANS</i>	<i>CO</i>
	<i>FLOWERING LOCUS T</i>	<i>FT</i>
Genes relacionados con <i>FT</i> (familia PEBP)		
	<i>BROTHER OF FT AND TFL1</i>	<i>BFT</i>
	<i>CENTRORADIALIS</i>	<i>CEN</i>
	<i>MOTHER OF FT AND TFL1</i>	<i>MFT</i>
	<i>TERMINAL FLOWER 1</i>	<i>TFL1</i>
	<i>TWIN SISTER OF FT</i>	<i>TSF</i>

En la integración de la señalización del fotoperiodo y los ritmos circadianos en *A. thaliana*, juega un papel central la proteína CO cuya acumulación y actividad está regulada a varios niveles (Shim et al., 2017; Yu et al., 2008). En condiciones inductivas de día largo, promueve la expresión de *FT* cuya proteína es conocida como el *florigeno*, la molécula de señalización móvil clave en la promoción de la floración en el meristemo apical del tallo. Sin embargo, los distintos genes ortólogos a *CO* encontrados en las leguminosas no parecen tener este papel fundamental en la respuesta al fotoperiodo, por lo que deben existir otros mecanismos alternativos (Wong et al., 2014). *FT* pertenece a la familia PEBP que incluye a otros genes como *TSF*, *TFL1*, *MFT*, *BFT* y *CEN*. *TFL1* actúa como un inhibidor de *FT* mediante la unión competitiva al factor de transcripción *FD*, impidiendo la expresión de genes de identidad del meristemo

floral (Ahn et al., 2006). En las leguminosas existen múltiples homólogos de *TFL1* y *FT* debido a la expansión que ha experimentado esta familia génica. Los múltiples genes *FT* pueden agruparse en tres clases filogenéticas distintas y específicas de leguminosas: *FTa*, *FTb* y *FTc* que incluyen distinto número de genes dependiendo de la especie (Weller & Ortega, 2015). Concretamente, en garbanzo se identificaron tres genes *FTa* (*FTa1*, *FTa2* y *FTa3*), un solo gen *FTb* (diferencia con respecto a otras especies de leguminosas), un gen *FTc* y tres genes *FLL1* (*FLL1a*, *FLL1b* y *FLL1c*). Es destacable señalar que *FTa1*, *FTa2* y *FTc* se encuentran ubicados juntos en tándem en el cromosoma 3, aunque *FTa1* y *FTa2* se expresan más en el tejido foliar mientras que *FTc* se expresa únicamente en el ápice del tallo. Los cambios genéticos que conducen a una sobreexpresión de los genes de este clúster parecen ser clave para la floración temprana (Ortega et al., 2019).

En el garbanzo se han identificado y mapeado numerosos loci de caracteres cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés) que afectan a la fecha de floración (Weller & Ortega, 2015). La disponibilidad de la secuencia del genoma del garbanzo desde 2013 (Varshney et al., 2013) y los estudios de sintenia han permitido anotar numerosos genes potencialmente relevantes para el control del tiempo de floración en la especie. Esta información resulta muy útil para la identificación de genes concretos y para la investigación de los procesos moleculares implicados a través de estudios de expresión génica. Sin embargo, el conocimiento sobre estos procesos continúa siendo escaso y, además, muchos de los QTL detectados aún no se han podido asociar a un locus determinado (Ortega Martínez, 2018). Es por ello que el desarrollo de un material vegetal adecuado que permita un mapeo fino de marcadores y la evaluación de variaciones alélicas de un locus objetivo, disminuyendo al máximo las interferencias que puedan provocar las diferencias existentes en el resto del genoma, supone una estrategia muy interesante de investigación (Yan et al., 2017).

1.3. El desarrollo de líneas casi isogénicas.

Las líneas casi isogénicas (NILs, por sus siglas en inglés) se caracterizan por diferir sólo en una pequeña región del genoma relacionada con el carácter para el que fueron seleccionadas. Por tanto, constituyen un material óptimo para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a rasgos de interés agronómico al eliminarse la mayor parte del ruido de fondo genético (Castro et al., 2010).

Se han desarrollado NILs en distintas especies vegetales como, por ejemplo, maíz (Koester et al., 1993; Mideros et al., 2014), tomate (Li et al., 2019; Martin et al., 1991), soja (Lee et al., 2017; Thakare et al., 2010) arroz (Ngu et al., 2014; Shen et al., 2001), lechuga (Paran et al., 1991; Parra et al., 2021) o trigo (Xue et al., 2013). Tradicionalmente, las NILs se han obtenido mediante retrocruzamientos consecutivos

con el padre recurrente hasta obtener líneas con fenotipos contrapuestos para el carácter de interés (Castro et al., 2010; Yan et al., 2017). Sin embargo, estos programas requieren de grandes esfuerzos y varios años, incluso empleando marcadores moleculares en la selección. Existe otra metodología alternativa que consiste en la obtención de NILs a partir de la heterocigosis residual en líneas avanzadas de poblaciones segregantes (Tuinstra et al., 1997) basándose en evaluaciones fenotípicas (Rubio et al., 1998; Zhang et al., 2006) o empleando marcadores moleculares (Castro et al., 2010; Jendoubi et al., 2016; Tuinstra et al., 1997). Estas generaciones avanzadas presentan el mismo fondo genético y, al autopolinizar de forma sucesiva los individuos que presenten heterocigosis, se obtiene descendencia homocigota y contrastante.

Las parejas de NILs desarrolladas para diferentes caracteres de interés se han empleado ampliamente en el mapeo fino de marcadores, en la realización de estudios de expresión génica y en la identificación de posibles genes candidatos (Yan et al., 2017). Este tipo de material vegetal permite evaluar la variación alélica de loci a nivel fenotípico y molecular realizando comparaciones a nivel de secuencia y transcriptómico. En el caso concreto del garbanzo, se han empleado con éxito en la detección y caracterización de genes asociados con el hábito de crecimiento (Ali et al., 2015), con el carácter vaina simple/doble (Ali et al., 2016; Caballo et al., 2022) o con la resistencia a *Fusarium* (Caballo et al., 2019). En relación al tiempo de floración, Basu et al. (2019) desarrollaron una pareja de NILs con el objetivo de llevar a cabo el mapeo fino de una región QTL que habían identificado previamente asociada con floración temprana y con un mayor número de flores.

En definitiva, el desarrollo de parejas de NILs para la fecha de floración en *C. arietinum*, su secuenciación genómica y el posterior análisis de las diferencias encontradas constituye una buena estrategia para la identificación de genes candidatos subyacentes al carácter y para profundizar en el conocimiento a nivel molecular mediante estudios de expresión génica.

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo es la identificación y caracterización de marcadores o genes asociados a la fecha de floración en garbanzo cultivado empleando una pareja de NILs desarrollada a partir de evaluaciones fenotípicas. Para ello, se definen los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar fenotípicamente la pareja de NILs para detectar posibles diferencias entre ellas, más allá de la fecha de floración.
- Utilizar los datos de secuenciación de cada una de las NILs para caracterizarlas genotípicamente, identificando las variaciones que presentan, y conocer la heterocigosis observada y el grado de similitud entre ellas.
- Analizar sus diferencias a nivel genómico con la finalidad de detectar potenciales marcadores o genes candidatos subyacentes al carácter fecha de floración.
- Diseñar secuencias de cebadores para genes candidatos asociados a la fecha de floración y otros genes que participan en la cascada de señalización con el propósito de realizar un análisis de expresión mediante qPCR. De esta forma, se podrán caracterizar a nivel molecular posibles efectos provocados por los distintos alelos presentes en las NILs.
- Seleccionar y recoger material vegetal apropiado para una posterior extracción de ARN que pueda emplearse en el análisis de expresión mediante qPCR.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

En este trabajo se empleó una pareja de NILs de *C. arietinum* para la fecha de floración desarrollada a partir de la heterocigosis residual en una línea $F_{6,7}$ de la población segregante RIP10 (línea RIP10–82), derivada del cruzamiento intraespecífico entre los parentales JG62 (sinónimo ICC4951) e ILC72, obtenida por el grupo de Mejora de Garbanzo – Córdoba compuesto por miembros de la Universidad de Córdoba (UCO) y del IFAPA Centro Alameda del Obispo basándose en evaluaciones fenotípicas (Figura 2). Las principales características de las líneas parentales se recogen en la Tabla 2. La línea parental JG62 es un garbanzo de tipo desi originario de la India y de floración precoz, mientras que ILC72 es de tipo kabuli, originario de la antigua Unión Soviética y mantenido en ICARDA (*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas*), de floración tardía. La caracterización de la descendencia de las diferentes plantas que se emplearon hasta la obtención de las NILs ha permitido concluir que el fenotipo floración tardía es, en este material, dominante frente a la floración precoz, ya que algunas de las plantas de fenotipo tardío presentan segregación para el carácter y las de fenotipo precoz siempre presentan descendencia de floración precoz (Figura 2). La pareja de NILs empleada en este trabajo (conformada por las plantas RIP10–82/P1/P3/P8/P5 y RIP10–82/P1/P3/P12/P13 denominadas como NIL precoz y NIL tardía, respectivamente) se obtuvo tras un total de once generaciones de autofecundación (siete hasta la obtención de la línea RIP10–82 y cuatro más posteriores) y presenta flores de color blanco, semillas de tipo kabuli, porte erecto y una sola vaina por pedúnculo.

Tabla 2. Principales características de las líneas JG62 e ILC72 (Carreras et al., 2016).

Línea	Origen	Tipo	Color de flor	Porte	Floración	Vaina /pedúnculo	Fusariosis	Rabia
JG62	India	Desi	Rosa	Semierecto	Precoz	Doble	Resistente (raza 0)	Susceptible
ILC72	Cáucaso	Kabuli	Blanca	Erecto	Tardía	Simple	Susceptible	Resistente

La pareja de NILs y las líneas parentales que sirven como control se sembraron en cámara bajo condiciones controladas de día corto (8 h día/16 h noche; 25 °C/22 °C), en las instalaciones del Departamento de Genética de la UCO entre abril y julio de 2022. Las condiciones de día se llevaron a cabo mediante luz fluorescente artificial. Todas las líneas se sembraron en macetas de 10 cm x 10 cm x 12 cm que contenían perlita. Las NILs crecieron con una densidad de tres plantas por maceta (30 plantas

por NIL en 20 macetas). Las plantas se regaron periódicamente y se les aportó solución nutritiva² en dilución 1:10 cada dos semanas a partir de un mes y medio desde su siembra.

Paralelamente, se sembraron en campo 15 plantas de cada NIL, en dos surcos independientes con una separación de 15 cm entre plantas, el 28 de marzo de 2022 en el IFAPA Centro Alameda del Obispo (Córdoba, España) (*Figura 3*). El 21 de junio se procedió a la recogida de las plantas de la NIL precoz, mientras que el 30 de junio se procedió a la recogida de la NIL tardía.



Figura 3. Fotografía del 16 de mayo de 2022 de las plantas de la NIL tardía aún sin florecer (**A**) y de la NIL precoz ya florecidas (**B**) sembradas en campo.

² La composición de la solución nutritiva fue $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (11,86 g/L), KNO_3 (5,055 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,93 g/L), KH_2PO_4 (1,361 g/L), Fe (0,188 g/L) y una serie de micronutrientes: KCl (3,72 mg/L), H_3BO_3 (15,4 mg/L), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,38 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5,76 mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (12,6 mg/L) y $(\text{Na}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{20} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4,6 mg/L).

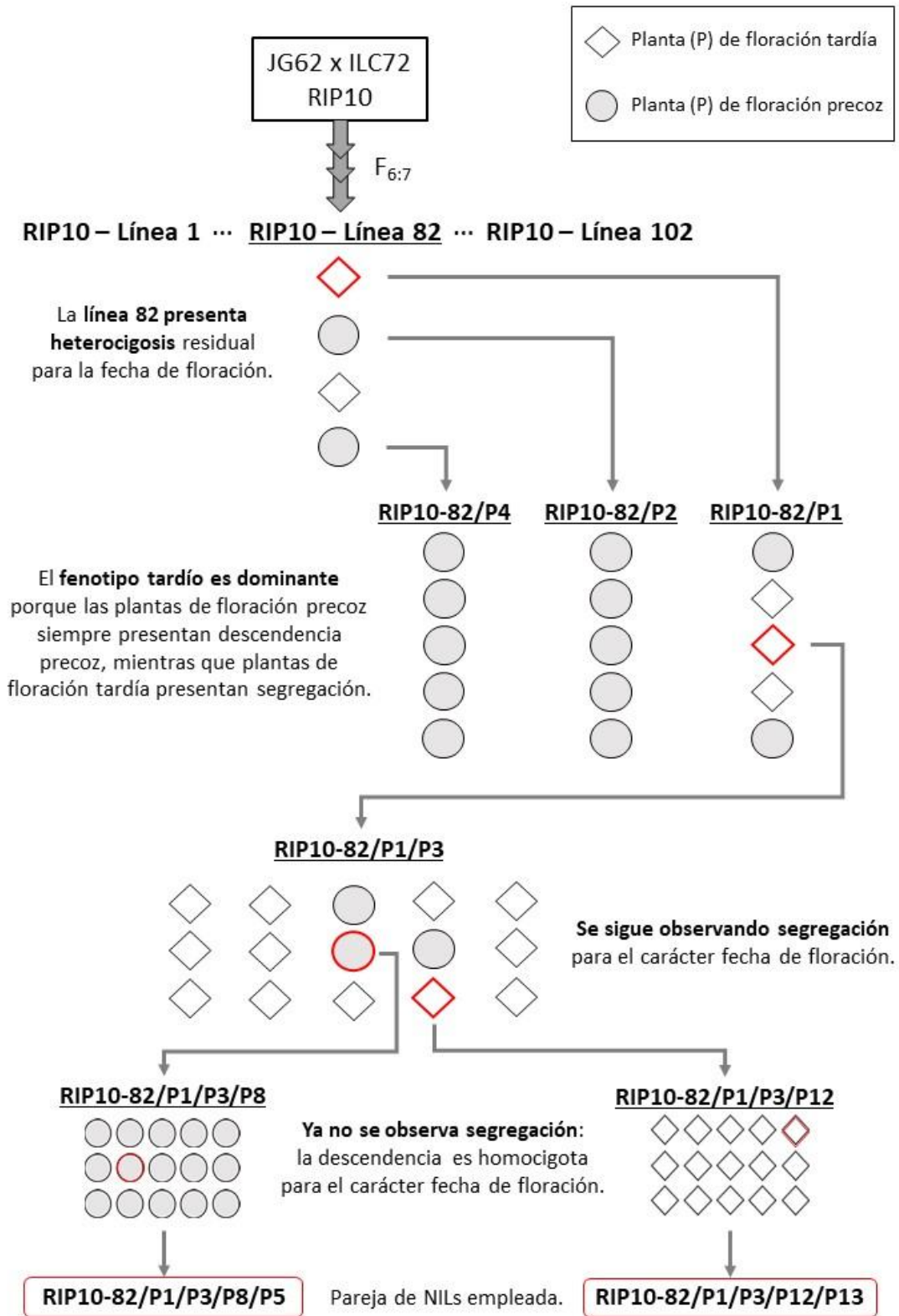


Figura 2. Esquema de obtención de la pareja de NILs para la fecha de floración desarrolladas a partir de la heterocigosis residual en la línea 82 de la población segregante RIP10 (RIP10–82) de *C. arietinum*. Las diferentes plantas (P) empleadas a lo largo del desarrollo son numeradas y se representan con un símbolo según su fenotipo; las seleccionadas para la obtención de las NILs presentan el contorno de color rojo.

3.2. Caracterización fenotípica.

Todas las plantas, tanto las sembradas en cámara como las sembradas en campo, se fenotiparon para el tiempo de floración, calculado como el número de días que existe entre la fecha de emergencia y la fecha en la que se produjo la apertura del primer botón floral de la planta, en el momento que se comienzan a observar los pétalos (*Figura 4*). El tiempo de floración representativo de cada línea y cada condición se calculó cuando el 50 % de sus plantas estaban en flor.



Figura 4. Planta en el momento de la toma del dato de la fecha de floración (JG62-1).

Por otro lado, las NILs sembradas en campo se fenotiparon para el número de vainas (diferenciando las vainas que contienen dos semillas de las que contienen una única semilla), el número de semillas, el peso de las semillas, el número de entrenudos, la altura de la planta, la longitud del entrenudo y el peso de la planta seca. Todos los datos se obtuvieron una vez las plantas se habían recogido del campo. La altura se midió en la planta seca desde el primer nudo hasta el nudo superior del tallo principal (*Figura 5A*). El valor de la longitud del entrenudo se calculó como el cociente entre la altura de la planta y el número de entrenudos. La ramificación de las plantas también se caracterizó mediante el número de ramas totales y el número de ramas que surgen en los tres primeros nudos (*Figura 5B*). Adicionalmente, para seis plantas escogidas al azar de cada NIL, se obtuvo un índice de ramificación (BI, por sus siglas en inglés) que se calcula como la relación entre la suma de la longitud de todas las ramas y la altura de la planta, de tal forma que el valor obtenido está normalizado para las diferencias de vigor entre plantas permitiendo una mejor comparación. Los datos de BI se sometieron a una simulación Monte Carlo en *RStudio* (v. 4.2.0) que, mediante la ley de números grandes, permite realizar una mejor estimación del índice para toda la línea. La significación estadística de los distintos parámetros cuantificados se probó mediante un *test - t* ($P < 0,05$) en *STATGRAPHICS Centurion 18* (v. 18.1.14).

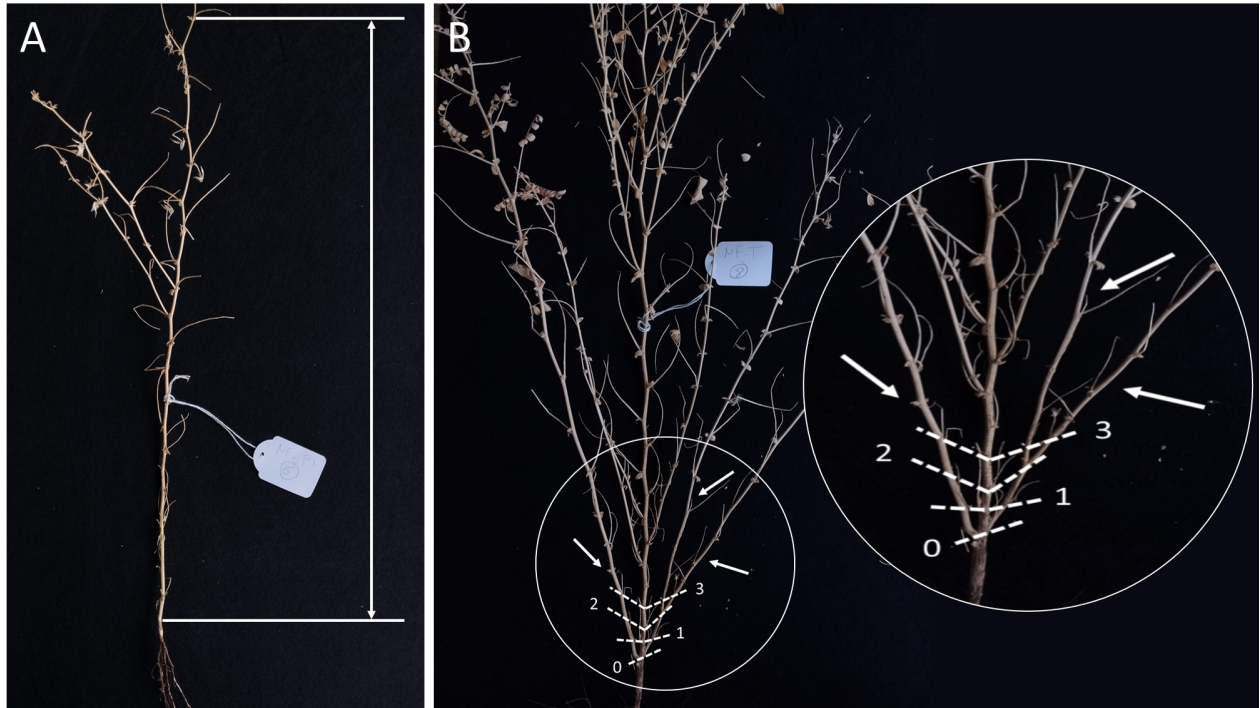


Figura 5. (A) Ejemplo de medición de la altura de la planta desde el primer nudo hasta el último nudo, en este caso, en una planta de la NIL precoz. **(B)** Posición de los tres primeros nudos y ramificaciones que surgen de ellos señalados con una flecha en una planta de la NIL tardía.

3.3. Secuenciación de las NILs, caracterización a nivel de secuencia y selección de genes candidatos para la fecha de floración.

La pareja de NILs se secuenció utilizando un secuenciador *Illumina HiSeq2000* y una cobertura 50x en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG-CRG, Barcelona), identificando las variaciones detectadas con respecto al genoma de referencia (CDC Frontier, secuencia de referencia ASM33114v1, NCBI) que estuvieran desigualmente representadas en cada línea. Los datos obtenidos permitieron conocer el número total de variaciones que presentan, su tipología (SNPs o INDELS), el impacto teórico de estas mutaciones en las funciones de los genes mediante *snpEff* v.4.x (<https://pcingola.github.io/SnpEff/>; *Tabla 3*) y su distribución cromosómica. Asimismo, se comprobó si la distribución de las variaciones en el genoma es proporcional al tamaño de los cromosomas mediante una prueba χ^2 ($P < 0,05$) en *RStudio* (v. 4.2.0).

La secuenciación permitió calcular el grado de similitud entre ambas NILs y el grado de heterocigosis de cada una de ellas. Ambos parámetros son importantes para la caracterización de las NILs desarrolladas ya que, por un lado, deben ser lo suficientemente similares como para minimizar el ruido de fondo génico y, por otro lado, es preferible que presenten la mayor parte de sus posiciones en homocigosis para facilitar el estudio. El grado de similitud (%) se calculó como la diferencia entre el número de

posiciones secuenciadas y el número de variaciones distintamente representadas que se detectaron (equivalente al número de posiciones distintas entre NILs) en relación con el número de posiciones secuenciadas. Por su parte, el grado de heterocigosis de cada NIL (%) se calculó como la relación entre el número de posiciones en heterocigosis detectadas en cada una de ellas y el número de posiciones totales secuenciadas. Este último parámetro se comparó con el valor de heterocigosis esperado teóricamente tras las once generaciones de autofecundación a las que fueron sometidas hasta su obtención. La heterocigosis esperada (%) puede ser calculada de forma sencilla a partir de la expresión $[(\frac{1}{2})^{(n-1)} \times 100]$, siendo n el número de generaciones, que se deduce de la Genética Mendeliana para generaciones de autofecundación.

Tabla 3. Clasificación por impacto teórico de distintos efectos producidos por mutaciones en los genes, ordenados de más a menos deletéreos.

Impacto teórico	Efecto	Impacto teórico	Efecto
Alto	Variación número cromosómico	Moderado	Inserción dentro de un codón, sin provocar cambios en el marco de lectura
Alto	Pérdida de exón	Moderado	Inserción entre codones sin modificarlos
Alto	Cambio marco de lectura	Moderado	Delección de parte de un codón, sin provocar cambios en el marco de lectura
Alto	Ganancia codón terminación	Moderado	Delección de codones completos sin modificar los restantes
Alto	Pérdida codón terminación	Moderado	Truncamiento 5'-UTR
Alto	Pérdida codón inicio	Moderado	Truncamiento 3'-UTR
Alto	Variación aceptor <i>splicing</i>	Moderado	Variación de la región de <i>splicing</i>
Alto	Variación donador <i>splicing</i>	Bajo	Variación de codón parada
Alto	Variación de aminoácido raro	Bajo	Variación de codón iniciador
Moderado	Variante sin sentido	Bajo	Variante sinónima

A partir de las variaciones detectadas mediante la secuenciación de la pareja de NILs, se procedió a la selección de genes candidatos para la fecha de floración siguiendo una serie de criterios. En primer lugar, se descartaron las variaciones que no se pudieron asignar a un cromosoma y, a continuación, se seleccionaron aquellas que producen un alto impacto teórico en la función génica según *snpEff* v.4.x. Estos SNPs e INDELS se ordenaron por posición cromosómica, identificando en qué gen se encuentran y anotando la función génica de este según la información disponible en NCBI. Una vez listados los genes, se seleccionaron como posibles candidatos aquellos que poseen variaciones en homocigosis, descartando los anotados como pseudogenes.

3.4. Diseño de cebadores para genes candidatos y genes relacionados con la fecha de floración.

Se diseñaron secuencias de cebadores para amplificar nueve loci con el objetivo de realizar un análisis de expresión mediante qPCR en futuros estudios (*Tabla 4*). Por un lado, fueron diseñados para tres genes seleccionados siguiendo los criterios planteados en el apartado 3.3. del presente trabajo y, por otro lado, para seis loci implicados en la vía de señalización del fotoperíodo y ritmos circadianos del proceso de floración que no presentaron variaciones en las NILs.

Tabla 4. Identificadores, posición cromosómica, localización en la cadena sentido (+) o antisentido (-) y anotación según NCBI de los genes para los que se diseñaron secuencias de cebadores en este trabajo. Los tres primeros loci se listaron siguiendo el flujo de selección de genes candidatos para la fecha de floración. Los seis últimos loci se seleccionaron por estar implicados en el proceso de floración.

ID <i>C. arietinum</i> NCBI	Posición cromosómica	Cadena	Anotación
LOC101501328	Ca2: 5 512 563 – 5 520 616	+	Proteína similar a extensina
<i>ELF3A</i>	Ca5: 36 011 384 – 36 016 600	-	Proteína EARLY FLOWERING 3a
LOC101504314	Ca7: 9 129 670 – 9 132 295	-	Regulador de respuesta de dos componentes tipo ARR5
<i>FT-B</i> (LOC101505276)	Ca2: 776 634 – 779 566	+	Proteína FLOWERING LOCUS T
<i>FT-A1</i> (LOC101497376)	Ca3: 26 393 772 – 26 400 669	+	Proteína FLOWERING LOCUS T
<i>GI</i> (LOC101511540)	Ca4: 11 270 955 – 11 280 389	+	Proteína GIGANTEA
<i>CAELF3</i> (LOC101488316)	Ca4: 45 323 713 – 45 328 974	-	Proteína EARLY FLOWERING 3b
LOC101498412	Ca5: 28 013 082 – 28 014 004	+	Proteína EARLY FLOWERING 4
<i>LUX</i> (LOC101515043)	Ca6: 54 242 622 – 54 245 220	-	Probable factor de transcripción LUX

Todos los cebadores se diseñaron mediante el *software Geneious Prime 2022.2.1* (<https://www.geneious.com>). Los criterios empleados en su diseño fueron: temperatura de *melting* o fusión (*T_m*) de 60 ± 2 °C, tamaño del amplicón de PCR de 90 – 110 pb y tamaño de cebadores de 17 – 23 nucleótidos con un contenido GC 40 – 60 %. Se comprobó para cada pareja de cebadores la posibilidad de formación de horquillas (*hairpins*) y dímeros en el propio *software*, así como su especificidad empleando la herramienta *BLAST* de NCBI (Altschul et al., 1990). Además, también se tuvo en cuenta que los cebadores no hubieran sido diseñados en la zona del gen en la que se encuentran las variaciones detectadas, ya que podrían afectar a la unión con la secuencia diana. Por otro lado, se comprobó la formación de estructuras secundarias en los amplicones mediante el *software MFOLD v.3.4* (Zuker, 2003) utilizando los parámetros predeterminados con una temperatura de anillamiento de 60 °C, así como una concentración de sales de 50 mM Na⁺ y 3 mM Mg²⁺, para el cálculo de la energía libre de Gibbs (ΔG) y la *T_m* teórica. La ΔG es calculada mediante el *Método del Vecino más Próximo* que supone que la estabilidad de un par de bases dado depende también de los pares de bases vecinos (SantaLucia, 1998).

Cuanto más negativa sea la ΔG , más favorable será la formación de la estructura secundaria y, cuanto más estable, mayor será su T_m . Si la ΔG es positiva se considera que la estructura no se llegará a formar en las condiciones de PCR. En caso contrario, si los cebadores no anillan en la zona en la que se forma la estructura secundaria, se considera que no afecta significativamente a la eficiencia de la amplificación. De esta forma, se seleccionaron aquellas parejas de cebadores que cumplieron con todos los criterios establecidos y que minimizan la posibilidad de formación de estructuras secundarias (en el amplicón o en la pareja de cebadores) en las condiciones de anillamiento de qPCR, ya sea porque no se hubiera predicho ninguna o porque las estructuras predichas presentan una T_m baja (mucho menor de 60 °C).

3.5. Recogida de tejido vegetal para extracción de ARN y análisis de expresión.

El material vegetal seleccionado para una posterior extracción de ARN consistió en dos *pool* diarios e independientes de tejido de hojas jóvenes, uno representativo de cada NIL sembrada en cámara (Figura 6). La recogida de muestras se inició a partir de las ocho semanas tras la emergencia y se prolongó durante cuatro semanas, momento en el que estuvieron en flor un tercio de las plantas de la NIL precoz. En todos los casos, las hojas se recogieron a las 6 h de fotoperiodo. Una vez obtenido el tejido, este fue congelado de forma inmediata en nitrógeno líquido y almacenado a – 80 °C. El tejido vegetal será empleado para la extracción de ARN y el posterior análisis de expresión mediante qPCR de los genes candidatos para la fecha de floración y de los otros genes seleccionados que participan en la cascada de señalización. La comparación de los diferentes perfiles temporales de transcripción entre ambas NILs permitirá caracterizar el efecto que provocan las distintas variaciones presentes y diseñar marcadores para el carácter fecha de floración a partir de las secuencias de los genes expresados diferencialmente.

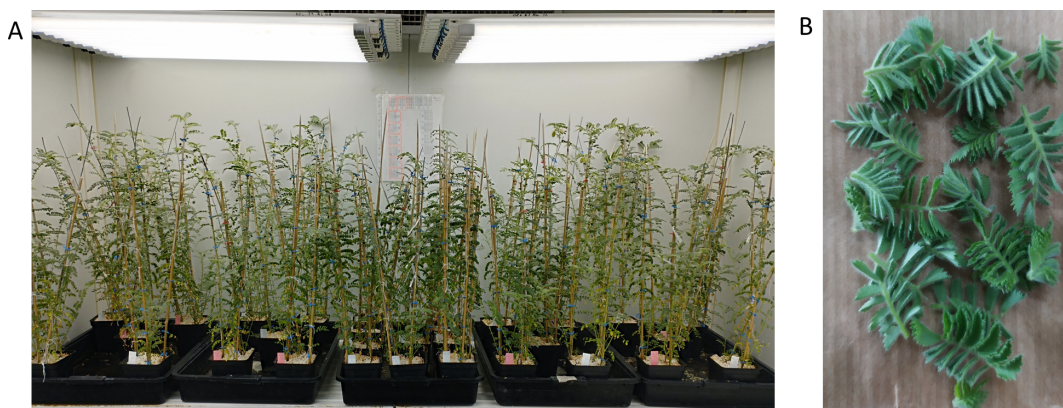


Figura 6. (A) Plantas sembradas en macetas con perlita en cámara. En el centro se encuentran las plantas correspondientes a las líneas parentales JG62 e ILC72. A ambos lados se encuentran las NILs precoces y tardías colocadas de forma aleatorizada. **(B)** Imagen de un *pool* de tejido de hojas jóvenes recogido, en este caso, de plantas de la NIL precoz en cámara.

4. RESULTADOS.

4.1. Caracterización fenotípica de las NILs.

El tiempo de floración para las diferentes líneas de *C. arietinum* y condiciones estudiadas se representa en la *Figura 7*. Las plantas de la NIL tardía y de la línea parental tardía ILC72 no han llegado a florecer en las condiciones de la cámara al final del experimento (día 22/07/2022) y, por ello, se les ha asignado un tiempo de floración arbitrario de 200 días. La línea parental precoz JG62 y la NIL precoz sí han florecido en cámara con un tiempo de $68,8 \pm 6,2$ días y $82,1 \pm 9,6$ días, respectivamente. En campo, donde se dan unas condiciones más favorables para la especie que las que se establecieron en cámara (*e. g.* más espacio para crecer y días más largos de ≈ 13 h frente 8 h de condición de día en cámara), la NIL tardía ha presentado un tiempo de floración de $57,4 \pm 1,0$ días frente a los $43,0 \pm 1,3$ días registrados para la NIL precoz, una diferencia de dos semanas entre ellas. La NIL precoz, que ha florecido en las dos condiciones, ha presentado un desfase de ≈ 39 días en el tiempo de floración en la cámara con respecto al campo.

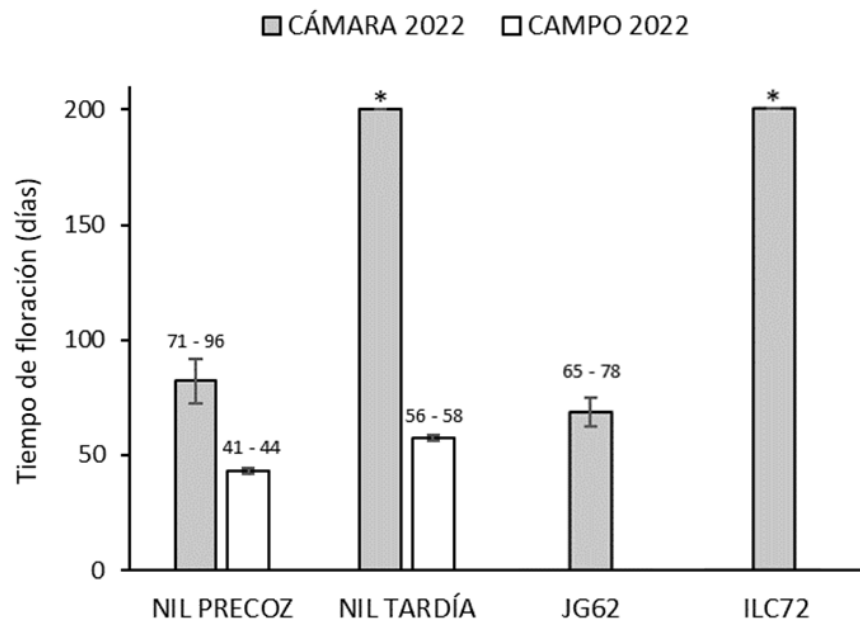


Figura 7. Tiempo de floración representativo de cada línea en las distintas condiciones donde se sembraron. Los números sobre las barras representan el rango. El asterisco (*) sobre los datos en cámara para la NIL tardía e ILC72 indica que esas plantas no florecieron en el final del experimento (día 22/07/2022) y les fue asignado un tiempo de 200 días.

Los datos obtenidos para las diferentes características fenotípicas estudiadas en las plantas de la NIL precoz y la NIL tardía sembradas en campo se recogen en la *Tabla 5*. Las plantas correspondientes a la NIL tardía han presentado un mayor porte que la NIL precoz: mayor altura, peso seco, número total de ramas y, además, mayor número de ramas en los primeros nudos. Cabe destacar que su mayor altura no

se debe a un incremento de la longitud del entrenudo, sino a un aumento de la cantidad de estos. De hecho, la longitud del entrenudo en la NIL tardía es, de media, menor que en la NIL precoz (*Figura 8*). En cuanto a la producción de fruto, la NIL tardía genera mayor número de vainas y semillas, aunque el peso de cada semilla es menor que en la NIL precoz. No se observan diferencias significativas en el porcentaje de vainas con dos semillas.

Tabla 5. Media y desviación estándar de los caracteres fenotípicos cuantificados en las plantas de la NIL precoz y de la NIL tardía sembradas en campo en 2022. El asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa entre NIL precoz y NIL tardía mediante *test - t* ($P < 0,05$); ns, no significativa.

	Número vainas	% vainas con dos semillas	Número semillas	Peso por semilla (g)	Peso seco planta (g)
NIL Precoz	18,1 ± 9,3	18,5 ± 10,1	22,0 ± 11,8	0,301 ± 0,035	3,8 ± 1,9
NIL Tardía	28,5 ± 7,3	11,8 ± 7,3	31,9 ± 8,8	0,255 ± 0,015	9,1 ± 2,6
Probabilidad (test - t)	< 0,005 *	0,068 ns	0,024 *	< 0,005 *	< 0,005 *
	Altura planta (cm)	Número entrenudos	Longitud entrenudo (cm)	Número total de ramas	Número de ramas en tres primeros nudos
NIL Precoz	52,5 ± 6,1	22,3 ± 2,6	2,4 ± 0,1	3,9 ± 2,3	0,7 ± 0,6
NIL Tardía	66,6 ± 3,8	30,9 ± 2,4	2,2 ± 0,1	21,5 ± 6,6	2,6 ± 1,0
Probabilidad (test - t)	< 0,005 *	< 0,005 *	< 0,005 *	< 0,005 *	< 0,005 *

El índice de ramificación (BI) se ha calculado para seis plantas de cada NIL escogidas al azar y los datos obtenidos fueron empleados en la simulación Monte Carlo para una mejor estimación (*Figura 9A*). La media calculada con las seis plantas es BI = 1,2 ± 0,7 en el caso de la NIL precoz y BI = 6,0 ± 1,7 en la NIL tardía, valores medios que se corresponden con los obtenidos mediante la simulación Monte Carlo debido a la baja variabilidad que presenta el BI. El resultado claramente indica que existe una gran diferencia en el grado de ramificación de las plantas dependiendo de a qué línea pertenezcan, observándose ya en los primeros nudos de la planta (*Figura 9B*). Este hecho parece indicar que una mayor ramificación en la NIL tardía no depende simplemente de que disponga de más tiempo para crecer antes de la floración, ya que entonces tendrían un BI más próximo (en su cálculo se tiene en cuenta la altura de la planta) y, además, no existiría una diferencia tan clara en el número de ramas surgidas en los tres primeros nudos.

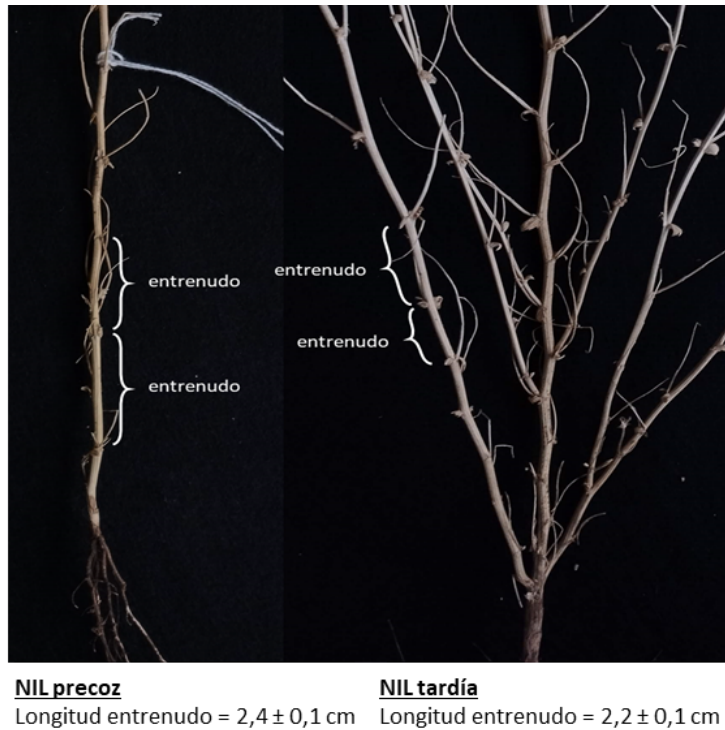


Figura 8. Imagen en la que se señalan los entrenudos en una planta de la NIL precoz (izquierda) y en una planta de la NIL tardía (derecha) donde se pueden apreciar las diferencias en la longitud del entrenudo.

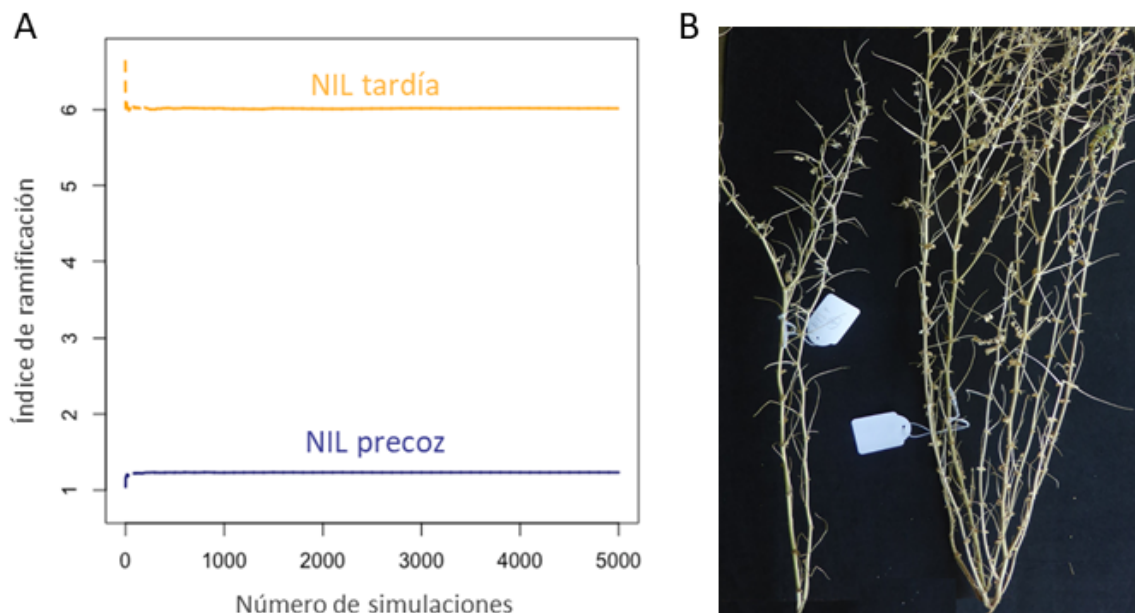


Figura 9. (A) Índice de ramificación estimado mediante 5000 simulaciones Monte Carlo introduciendo los datos de seis plantas de cada NIL. **(B)** Fotografía de plantas de la NIL precoz (izquierda) y NIL tardía (derecha) en la que se observan las diferencias en el grado de ramificación. En este caso, la planta de la NIL precoz presenta, además del tallo principal, una única rama en los primeros tres nudos, mientras que la planta de la NIL tardía presenta cinco.

4.2. Caracterización a nivel de secuencia de las NILs.

La secuenciación de la pareja de NILs ha permitido detectar un total de 107 227 variaciones de las cuales 92 383 se corresponden con SNPs y 14 844 con INDELS, siendo 44 de ellas variantes multialélicas. Atendiendo al impacto teórico que presentan estas variaciones, han sido registradas 1956 de impacto moderado (1,82 %) y 247 de alto impacto (0,23 %). Del total de variantes, 65 262 (60,8 %) se han podido asignar a un cromosoma, observándose una distribución que no es proporcional al tamaño de estos ($P = 2,2 \cdot 10^{-16}$). Destaca la gran cantidad de variaciones que se han encontrado en el cromosoma 1, a pesar de ser el cuarto cromosoma de mayor tamaño tras los cromosomas 6, 4 y 7 (*Figura 10A*). Por su parte, de las 247 variantes con alto impacto teórico, 235 (95,1 %) han podido ser asignadas a cromosomas, mostrando una distribución que tampoco es proporcional al tamaño de estos (*Figura 10B*; $P = 1,75 \cdot 10^{-15}$) similar a la observada con la totalidad de variaciones.

Las 107 227 variaciones detectadas se corresponden con las posiciones del genoma que son diferentes entre las NILs. Por tanto, teniendo en cuenta el número de posiciones totales secuenciadas, la pareja de NILs presenta un grado de similaridad del 99,98 %. Por otro lado, los datos de secuenciación han permitido obtener datos sobre la heterocigosis residual que presentan las NILs. Se han detectado 209 276 posiciones heterocigotas en la NIL tardía y 200 084 en la NIL precoz, lo que se corresponde con una heterocigosis observada de 0,037 % y 0,035 %, respectivamente. Ambas líneas han sido sometidas hasta su obtención a once generaciones de autofecundación (*Apdo. 3.1., Figura 2*), de modo que la heterocigosis residual esperada es 0,098 %. Los valores observados menores que los esperados son razonables debido a que la población segregante a partir de la que se han obtenido estas líneas pudo ser sometida a procesos de refresco previos para mantener la viabilidad de las semillas, es decir, pudo ser sometida a generaciones de autofecundación adicionales con el objetivo de mantener un número de semillas viables adecuado anteriormente al propio proceso de obtención de las NILs.

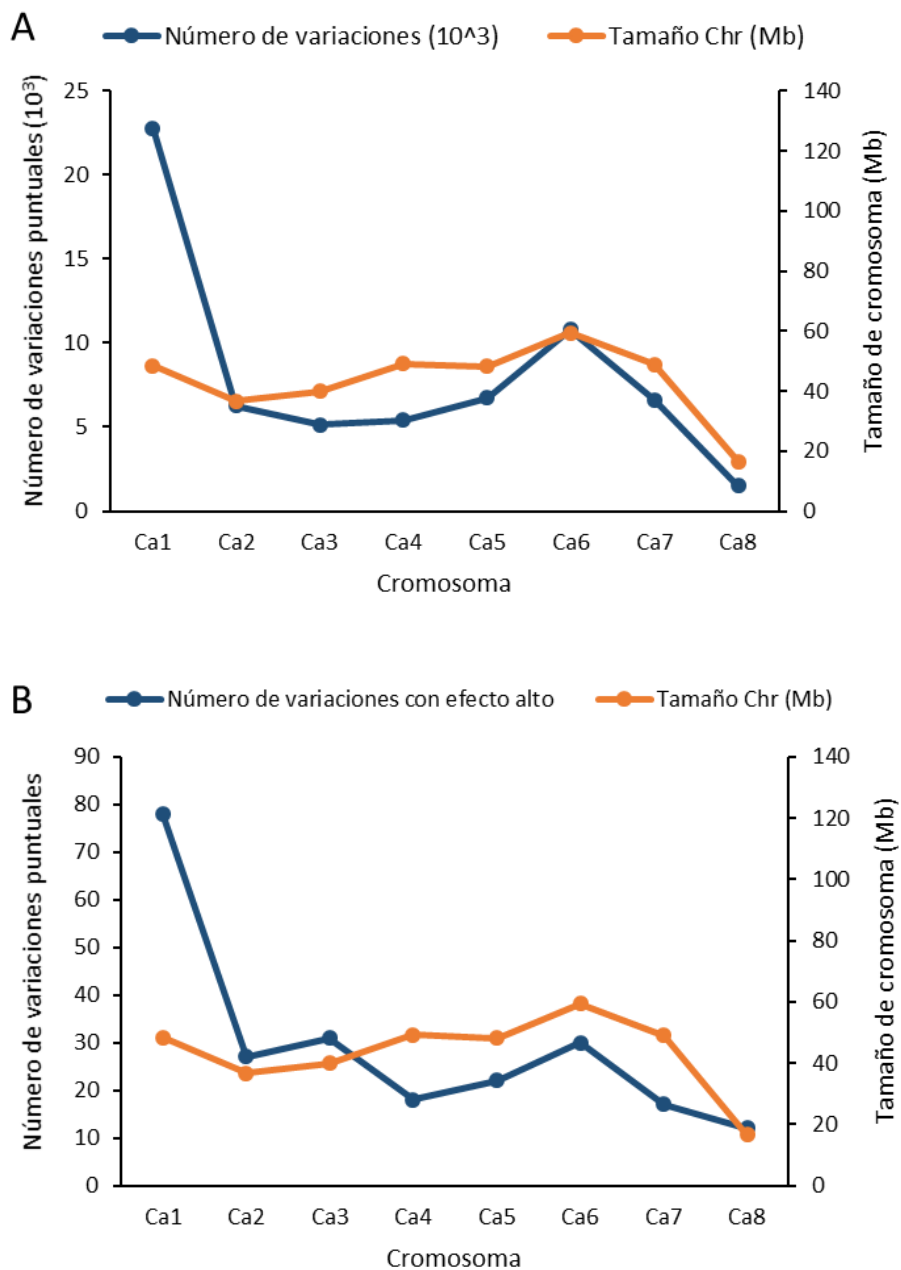


Figura 10. (A) Distribución en el genoma de las 65 262 variantes asignadas a un cromosoma. **(B)** Distribución en el genoma de las 235 variantes de alto impacto teórico asignadas a un cromosoma. La distribución no es proporcional al tamaño de cada cromosoma en ninguno de los dos casos.

4.2.1. Genes candidatos para la fecha de floración en la pareja de NILs.

El flujo de selección seguido en el presente trabajo ha permitido listar 23 genes como potenciales candidatos para la fecha de floración en las NILs (Figura 11). En la Tabla 6 se recoge la posición y la anotación de cada uno de estos loci según la información disponible en NCBI. Entre ellos se han detectado cinco que no están caracterizados y un total de ocho genes relacionados con funciones de resistencia (seis de los cuales codifican para una probable proteína de resistencia At3g1446). Asimismo,

se ha encontrado un locus que está estrechamente relacionado con el proceso de floración: el gen *ELF3A* (Ca5: 36 011 384 – 36 016 600), uno de los dos homólogos presentes en leguminosas del gen *ELF3* de *A. thaliana* (Weller & Macknight, 2019). Además, se han detectado otros dos genes que podrían tener influencia sobre el desarrollo de la planta: LOC101501328 (Ca2: 5 512 563 – 5 520 616) que codifica para una proteína similar a extensina (Otte & Barz, 2000; Sadava & Chrispeels, 1973) y LOC101504314 (Ca7: 9 129 670 – 9 132 295) que codifica para un regulador de respuesta de dos componentes tipo ARR5 implicado en la señalización por la fitohormona citoquinina (To et al., 2007). Por tanto, puede resultar de interés estudiar en mayor profundidad estos tres genes. Adicionalmente, se ha comprobado que entre los demás genes que solo presentaban variaciones de alto impacto en heterocigosis no se encontraba ninguno que tuviese una anotación relacionada estrechamente con la floración.

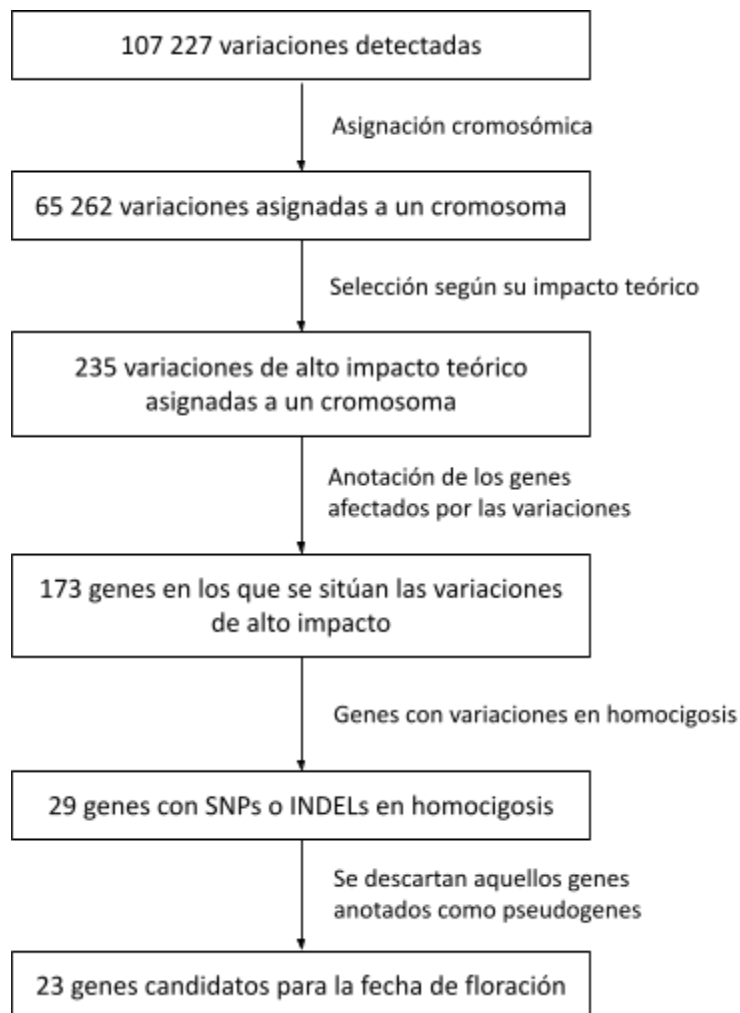


Figura 11. Diagrama de flujo resumen con los criterios de selección realizados hasta determinar los 23 genes candidatos para la fecha de floración.

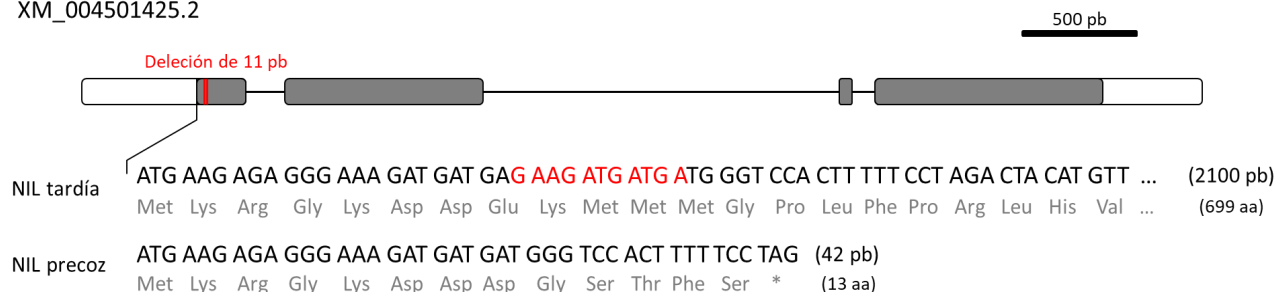
Tabla 6. Identificadores, posición cromosómica, localización en la cadena sentido (+) o antisentido (-) y anotación según NCBI de los 23 genes candidatos para la fecha de floración en la pareja de NILs de *C. arietinum* estudiada.

ID <i>C. arietinum</i> NCBI	Posición cromosómica	Cadena	Anotación
LOC101496129	Ca1: 1 856 558 – 1 862 113	-	Probable fosfatasa PAP-específica, mitocondrial
LOC101500879	Ca1: 1 971 782 – 1 977 352	+	Factor de <i>splicing</i> pre-mRNA SYF1
LOC101504943	Ca1: 2 040 792 – 2 054 992	+	Probable proteína de resistencia a enfermedades At3g14460
LOC101510509	Ca1: 2 059 205 – 2 060 842	-	No caracterizado
LOC101505696	Ca1: 2 071 303 – 2 075 501	+	Probable proteína de resistencia a enfermedades At3g14460
LOC101511464	Ca1: 2 214 862 – 2 218 631	+	Proteína tipo At4g04980 no caracterizada
LOC101489772	Ca1: 2 320 458 – 2 323 974	+	Probable antocianidina reductasa
LOC101511156	Ca1: 2 462 666 – 2 463 586	+	Factor de transcripción similar a bHLH162
LOC101511364	Ca1: 2 754 115 – 2 759 051	-	Probable proteína de resistencia a enfermedades At3g14460
LOC101513197	Ca1: 2 806 641 – 2 809 915	+	Probable proteína de resistencia a enfermedades At3g14460
LOC113783936	Ca1: 2 855 433 – 2 859 651	-	Probable proteína de resistencia a enfermedades tipo RPP-13 1
LOC101512754	Ca1: 2 877 886 – 2 886 457	+	Probable proteína de resistencia a enfermedades At3g14460
LOC101515361	Ca1: 2 868 030 – 2 873 972	+	No caracterizado
LOC101512754	Ca1: 2 877 886 – 2 886 457	+	Probable proteína de resistencia a enfermedades At3g14460
LOC101490960	Ca1: 2 947 892 – 2 948 832	+	Activador transcripcional de genes relacionados con reconocimiento de patógenos tipo PTI5
LOC101497222	Ca1: 4 736 494 – 4 739 521	-	Proteína <i>F-box/kelch-repeat</i> tipo At3g23880
LOC101489333	Ca1: 8 133 017 – 8 136 063	-	No caracterizado
LOC101501328	Ca2: 5 512 563 – 5 520 616	+	Proteína similar a extensina
LOC101488866	Ca4: 19 666 061 – 19 669 022	+	Proteína que contiene repetición pentatricopéptido At3g09650, cloroplastos
LOC101488756	Ca4: 47 913 808 – 47 915 551	-	No caracterizado
<i>ELF3A</i> (LOC101489432)	Ca5: 36 011 384 – 36 016 600	-	Proteína EARLY FLOWERING 3a
LOC101491386	Ca6: 57 974 389 – 57 978 456	+	Probable 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa 5
LOC101504314	Ca7: 9 129 670 – 9 132 295	-	Regulador de respuesta de dos componentes tipo ARR5

Las variaciones en homocigosis que afectan a los 23 genes se muestran en la *Tabla A1 (ANEXO)* donde se indica el cromosoma, gen y posición en el que se sitúan, así como los alelos detectados en las NILs (indicando el alelo de referencia y, por otro lado, los alelos alternativos que se corresponden con SNPs o INDELS), el impacto que provoca la variación a nivel gen y el genotipo de cada NIL. Cabe destacar la existencia de genes que presentan más de una variación de alto impacto en homocigosis. El gen *ELF3A* (Ca5: 36 011 384 – 36 016 600) presenta una deleción de 11 pb en el primer exón en la NIL precoz que se espera que provoque una modificación de la pauta de lectura y la aparición de un codón de terminación de forma prematura, de tal forma que la proteína codificada se vea reducida a 13 aa (*Figura 12A*). En cuanto al gen LOC101501328 (Ca2: 5 512 563 – 5 520 616), codificante para una proteína similar a extensina, presenta una deleción de 4 pb en la NIL precoz que originaría un cambio en el marco de lectura y, al igual que en el caso anterior, la aparición de un codón de terminación prematuramente, reduciendo el tamaño de la proteína codificada a 25 aa (*Figura 12B*). En el caso de estos dos genes, la NIL tardía presenta los alelos de referencia, es decir, ausencia de variaciones. Por otro lado, el gen LOC101504314 (Ca7: 9 129 670 – 9 132 295) presenta en ambas NILs una inserción en el cuarto exón, aunque de tamaño diferente (25 pb en la NIL tardía y de 19 pb en la NIL precoz), que presumiblemente provoca una modificación de la pauta de lectura con respecto a CDC Frontier (*Figura 12C*). Sin embargo, en este caso, las inserciones encontradas son muy similares entre ellas ya que comparten las 19 pb detectadas en la NIL precoz. Además, se predice que las 6 pb adicionales en la NIL tardía no provocan un cambio en el marco de lectura con respecto a la NIL precoz, sino que únicamente introducen dos aminoácidos nuevos, compartiendo todos los demás. Por ello, es probable que las diferencias funcionales entre las proteínas codificadas por el gen LOC101504314 en ambas NILs sea muy reducido, ya que su estructura primaria es prácticamente idéntica, aunque las diferencias con respecto al genotipo de referencia son notables: un tamaño predicho de 339 aa y 333 aa en la NIL tardía y NIL precoz, respectivamente, frente un tamaño de 648 aa en CDC Frontier.

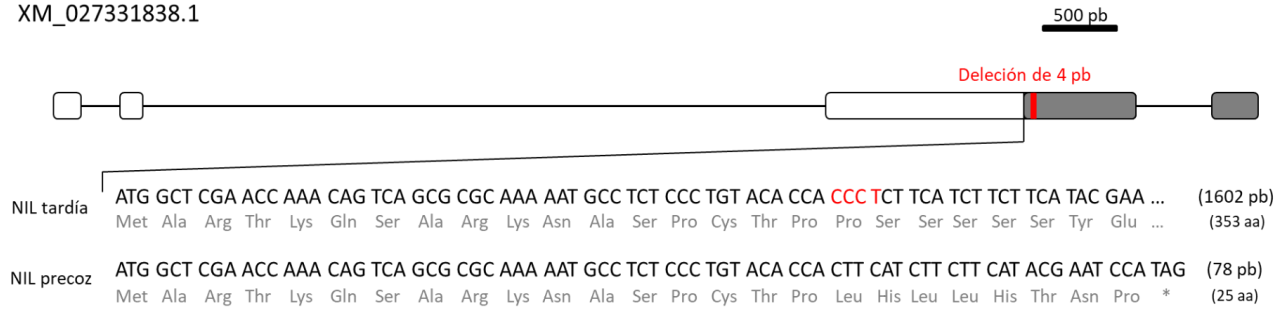
A

ELF3A (Ca5: 36 011 384 – 36 016 600)
XM_004501425.2



B

LOC101501328 (Ca2: 5 512 563 – 5 520 616)
XM_027331838.1



C

LOC101504314 (Ca7: 9 129 670 – 9 132 295)
XM_004508759.3

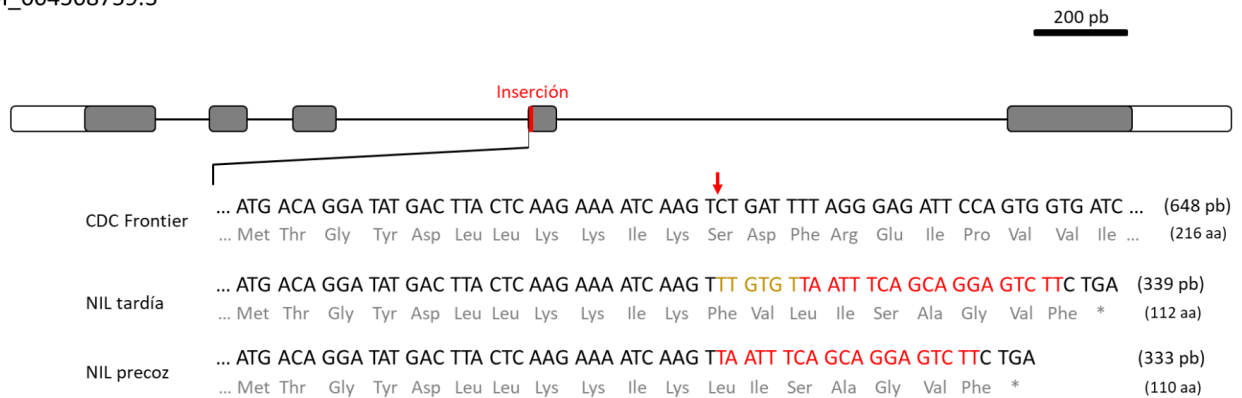


Figura 12. Diagramas que muestran la localización de diferentes variaciones mediante una línea roja en el ARNm de los tres genes que son objeto de interés para un estudio de expresión posterior. Los exones se muestran como cajas con la secuencia codificante en gris y las regiones que no se traducen en blanco. Se indican los nucleótidos y los aminoácidos para los que codifican que se corresponden con la parte de la secuencia flanqueante al lugar donde se produce la variación. El codón de terminación se señala con un asterisco (*). Se indica la longitud de la secuencia codificante y la proteína de las diferentes variantes detectadas en cada NIL. **(A)** Representación del ARNm del gen *ELF3A* en el que se señala la posición de la delección de 11 pb (en rojo) en el primer exón en la NIL precoz. **(B)** Representación del ARNm del gen LOC101501328 en el que se señala la posición de la delección de 4 pb (en rojo) en el primer exón en la NIL precoz. **(C)** Representación del ARNm del gen LOC101504314 en el que se señala la posición de las inserciones que afectan a la NIL tardía (25 pb) y la NIL precoz (19 pb) con una flecha roja en la secuencia de referencia CDC Frontier. En rojo se señalan los nucleótidos que comparten las inserciones que afectan a ambas NILs y en naranja los seis nucleótidos exclusivos de la inserción en la NIL tardía.

4.3. Secuencia de los cebadores diseñados para los genes candidatos y otros genes relacionados con la fecha de floración.

En la *Tabla 7* se recogen las secuencias de los cebadores que se han diseñado, por un lado, para amplificar los tres genes listados en la pareja de NILs que resultan de interés para un posterior estudio de expresión y, por otro lado, para amplificar seis loci implicados en la vía de señalización del fotoperiodo y ritmos circadianos de la floración. Existen cuatro casos en los que se ha predicho que las secuencias de cebadores diseñadas pueden originar estructuras secundarias diméricas (entre cebadores o un cebador

consigo mismo), pero estas presentan una T_m tan baja que no se llegarán a formar a la temperatura de anillamiento de la qPCR (60 °C).

Tabla 7. Identificadores de los genes de *C. arietinum* y secuencias de los cebadores diseñados para qPCR. Se recoge información acerca de la T_m de estructuras secundarias formadas por parte del cebador (horquillas y dímeros) en caso de que puedan existir y el tamaño del amplicón de PCR.

ID <i>C. arietinum</i> NCBI	Secuencia de la pareja de cebadores (5'-3')	T_m horquillas (°C)	T_m dímero consigo mismo (°C)	T_m dímero entre cebadores (°C)	Tamaño amplicón (pb)
LOC101501328	F-TGCCCCCAACAAAACCTAAAA	-	-	-	107
	R-ATGATGTGGAAGGAGAAGATGAC	-	-		
<i>ELF3A</i> (LOC101489432)	F-TGGAGCAACGTCACATGTCA	-	-	4,5	90
	R-TGTGCCATTTGCTAGGACT	-	-		
LOC101504314	F-TGAAGCCAGTCAAGTTGTCA	-	3,0	-	109
	R-TCATCTGTTGATCGCCTTCT	-	-		
<i>FT-B</i> (LOC101505276)	F-GTGACCAACATTCCAGCGAC	-	-	-	96
	R-AACCACACGATGAATCCCTGA	-	-		
<i>FT-A1</i> (LOC101497376)	F-TTGCCAATCAACCCAGAGC	-	-	-	90
	R-TTGGGCTAGGTGAATCAGGA	-	-		
<i>GI</i> (LOC101511540)	F-ACATGTCCGCACTCTGAGC	-	4,2	-	107
	R-AAGAGGGGTTGTGGTTGCC	-	-		
<i>CAELF3b</i> (LOC101488316)	F-GCAGGAATCTAATGACAGCGA	-	-	-	102
	R-GTCGAATGAGAGCAGCTTCTT	-	-		
LOC101498412	F-TGGGCGACTGAACAAG	-	-	-	90
	R-TTGTGATTCTCGTTCACCTG	-	-		
<i>LUX</i> (LOC101515043)	F-CTGCTGCTTCTTATCGGT	-	0,2	-	98
	R-GAGATGAGGGTGAGAGTGAGA	-	-		

En todos los casos se ha procedido a la comprobación de la formación de estructuras secundarias en los amplicones resultantes mediante el cálculo de la energía libre de Gibbs (ΔG) y la T_m teóricas (Figura 13). Consecuentemente, se ha podido verificar que las estructuras secundarias de los amplicones no se llegan a formar en la mayoría de los casos ($\Delta G > 0$) y, en el único caso en el que sí se podría formar (LOC101498412, $\Delta G = -0,42$ °C) se ha comprobado que esta no se encuentra en la zona de unión de los cebadores. Por tanto, la eficiencia de la amplificación no estará comprometida por este factor.



Figura 13. Representación gráfica de las estructuras secundarias esperadas en los amplicones de este trabajo. Se señalan la estabilidad termodinámica (ΔG) y la T_m ($^{\circ}C$) de las estructuras. Los cebadores se indican con flechas negras. Si $\Delta G > 0$ o los cebadores no se unen en la zona de formación de la estructura secundaria, esta no debería influir en la eficiencia de amplificación.

5. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se ha caracterizado una pareja de NILs de *C. arietinum* desarrollada para la fecha de floración con el objetivo de identificar marcadores o genes implicados en este complejo proceso. El fenotipado de ambas NILs ha permitido reconocer la existencia de diferencias significativas en la mayoría de los caracteres morfológicos estudiados, además de en la propia fecha de floración. Por tanto, las divergencias genéticas existentes entre ambas NILs parecen tener implicaciones fenotípicas más allá del inicio del control de la floración. Mediante la información obtenida a partir de la secuenciación de la NIL tardía y de la NIL precoz se ha comprobado que comparten un 99,98 % de las posiciones del genoma, diferenciándose solo en una pequeña parte, tal y como se espera de una pareja de NILs (Yan et al., 2017). Por ejemplo, Basu et al. (2019) emplearon una serie de SNP distribuidos por todo el genoma para comprobar que las NILs que ellos seleccionaron presentaban el mismo alelo en el 99 % de los casos. La secuenciación también ha permitido calcular una heterocigosis residual de 0,037 % y de 0,035 % en la NIL tardía y en la NIL precoz, respectivamente, valores más bajos que el 0,098 % esperado. En consecuencia, tanto el grado de similaridad como el de heterocigosis apuntan a que las NILs desarrolladas son un material apropiado para llevar a cabo el estudio.

Por otro lado, la secuenciación de las NILs ha permitido detectar 65 262 variaciones que pudieron ser asignadas a un cromosoma (un 60,8 % del total), de las cuales 235 han presentado un alto impacto teórico. En ninguno de los dos casos se ha visto una distribución proporcional al tamaño de los cromosomas. El posicionamiento en el genoma de las 235 variaciones de alto impacto teórico y la identificación de aquellas que aparecen en homocigosis ha permitido la asociación de 23 genes con la fecha de floración. Entre ellos se ha encontrado un gen que está estrechamente relacionado con el proceso de floración: el locus *ELF3A* (Ca5: 36 011 384 – 36 016 600), uno de los dos homólogos presentes en leguminosas del gen *ELF3* de *A. thaliana* (Weller & Macknight, 2019) que está implicado en el denominado *Evening Complex* de la vía de señalización del fotoperiodo y ritmos circadianos de la floración (Shim et al., 2017; Zhao et al., 2021). En el presente estudio se ha detectado una delección de 11 pb en el primer exón de *ELF3A* en la NIL precoz que, teóricamente, provoca una modificación de la pauta de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro que reduce el tamaño de la proteína codificada de 699 aa hasta 13 aa (Figura 12.A). Esta misma delección fue identificada por Ridge et al. (2017) en la línea ICCV96029, autores que confirmaron que confiere floración temprana en *C. arietinum*, pero únicamente en homocigosis, apuntando que se trata de un alelo recesivo. Esto concuerda con el hecho de que el fenotipo floración tardía fue el dominante en el proceso de desarrollo de la pareja de NILs empleada en este trabajo. Por lo tanto, el alelo correspondiente con la delección de 11 pb en *ELF3A* y

que está asociado a la floración precoz parece ser recesivo. Por otra parte, Ridge et al. (2017) realizaron un análisis de 236 líneas del germoplasma de garbanzo, encontrando 13 líneas que portan la mutación de 11 pb. La línea parental precoz JG62 (empleada en el desarrollo de las NILs en el presente trabajo) no fue analizada por ellos, pero sí la línea parental tardía ILC72 confirmando que no presenta la delección. Por consiguiente, la línea JG62 debe ser la portadora del alelo recesivo asociado a floración precoz en la pareja de NILs.

Actualmente no se tiene constancia de que se hayan descrito efectos pleiotrópicos del gen *ELF3A* en *C. arietinum*. Sin embargo, sí se describieron en otras leguminosas del clado *galegoide* como el guisante o la lenteja. Weller et al. (2012) detectaron que una mutación en el gen homólogo a *ELF3A* en guisante provoca, además de floración precoz, una menor ramificación. En lenteja, Rajandran (2016) observó efectos similares, asociando la mutación del gen homólogo a *ELF3A* a una floración precoz, menor ramificación y entrenudos de mayor longitud. En ambos casos, el alelo correspondiente con la mutación es recesivo. Asimismo, hace años que se propuso que el *Evening Complex* está relacionado también con el crecimiento del hipocotilo en *A. thaliana*, vinculándolo a los ritmos circadianos (Nusinow et al., 2011). En consecuencia, las diferencias significativas observadas en el presente trabajo en otros caracteres fenotípicos distintos a la fecha de floración en la pareja de NILs podrían ser debidas a *ELF3A* y el mismo alelo que se asocia a floración precoz, estar ligado a una menor ramificación y mayor longitud del entrenudo.

Por otro lado, aunque entre los otros 22 genes candidatos no se ha detectado uno que presente una relación tan estrecha con el proceso de floración como *ELF3A*, existen dos loci que merecen atención porque podrían estar asociados con los caracteres estudiados en la pareja de NILs: LOC101501328 (Ca2: 5 512 563 – 5 520 616) y LOC101504314 (Ca7: 9 129 670 – 9 132 295). LOC101501328 codifica para una proteína similar a extensina, un tipo de proteínas estructurales de la pared vegetal que pueden tener efectos en la extensión celular y el cese del crecimiento (Otte & Barz, 2000; Sadava & Chrispeels, 1973). En este gen se ha detectado una delección de 4 pb en la NIL precoz cuyo efecto predicho es el acortamiento de la proteína codificada con respecto a la NIL tardía (*Figura 12.B*). Por su parte, el gen LOC101504314 codifica para un regulador de respuesta de dos componentes tipo ARR5 implicado en la señalización por citoquininas, una clase de fitohormonas que regulan una amplia variedad de procesos fisiológicos entre los que se incluye el desarrollo del tallo o la ramificación (Müller & Leyser, 2011; Perilli et al., 2010). Este gen presenta una inserción de 25 pb en la NIL tardía y una de 19 pb en la NIL precoz, muy similares entre ellas, cuyo efecto predicho en ambos casos es la aparición de un codón de

terminación que provoca un acortamiento de la proteína con respecto al tamaño esperado en CDC Frontier (Figura 12.C). Para intentar dilucidar la contribución de *ELF3A*, LOC101501328 y LOC101504314 a las diferencias fenotípicas observadas en la pareja de NILs, se ha propuesto su inclusión en un análisis de expresión mediante qPCR diseñando los cebadores correspondientes en el presente trabajo.

El mecanismo molecular subyacente por el que *ELF3A* regula la floración en *C. arietinum* y otras leguminosas del clado *galegoide* continúa sin conocerse totalmente, aunque existen numerosas evidencias de que participa junto *LUX* y *ELF4* en el *Evening Complex* del reloj circadiano inhibiendo la floración en condiciones de día corto no inductivas (Weller & Macknight, 2019). Los conocimientos actuales apuntan a que las mutaciones en genes homólogos de *ELF3A* en diferentes leguminosas provocan el aumento de la expresión de *FT*, lo que en última instancia promueve la floración, pero sin eliminar por completo la respuesta al fotoperiodo, ya que parece no verse afectado el ritmo de la expresión de otros genes del reloj (Ridge et al., 2017). Este hecho puede ser debido a la presencia de otro ortólogo de *ELF3*, denominado *ELF3b*. En guisante se ha visto que el locus homólogo de *ELF3b* no afecta al tiempo de floración en presencia del homólogo de *ELF3A* funcional, pero puede compensar parcialmente la mutación de *ELF3A* manteniendo cierta respuesta al fotoperiodo (Rubenach et al., 2017). En *A. thaliana* existen evidencias de que *ELF3* participa en la regulación de la floración afectando a la actividad del locus *GI* en diferentes niveles (Zhao et al., 2021). Ridge et al. (2017) observaron que la mutación de *ELF3a* en garbanzo no afecta a la expresión circadiana de *GI*, pero su expresión a más largo plazo no fue analizada. La proteína codificada por *GI* parece promover, en *Arabidopsis*, la expresión del factor de transcripción *CO* que es un activador de *FT* y, por lo tanto, de la floración. Sin embargo, en guisante se detectó una mutación del gen homólogo a *GI* que provoca fuertes efectos en la expresión de *FT* y la floración, pero que no afecta a los niveles de transcripción de *CO* ni de otros genes similares a *CO* (Weller & Macknight, 2019). Además, Wong et al. (2014) demostraron que la inactivación de genes *CO* no afecta al tiempo de floración en *M. truncatula*. Por lo tanto, deben existir mecanismos alternativos por los que los genes homólogos a *GI* promueven la expresión de *FT* y la floración, sin la mediación de *CO*.

En definitiva, la hipótesis que parece más plausible es que *ELF3A* afecte a la función biológica de *GI* y, en consecuencia, a los niveles de expresión de *FT*. Con el propósito de intentar aumentar el conocimiento actual sobre esta vía de señalización, en este trabajo se han diseñado secuencias de cebadores para seis genes de *C. arietinum* implicados en esa ruta (*FT-B*, *FT-A1*, *GI*, *CAELF3b*, *LOC101498412* y *LUX*) e incluirlos, junto con los otros tres genes seleccionados que han presentado diferencias entre las NILs, en

un futuro estudio de expresión génica mediante qPCR (*Tabla 7*). En el presente trabajo se ha procedido a la recogida de dos *pool* diarios de hojas jóvenes durante cuatro semanas, uno correspondiente a cada NIL, a partir de los cuales se extraerá el ARN. Este tipo de tejido ofrece la ventaja de que se renueva constantemente, pudiendo recogerse durante periodos de tiempo relativamente largos, sin afectar al desarrollo normal de la planta. Además, se ha visto que los genes seleccionados implicados en la vía de señalización del fotoperiodo se expresan en este tejido (Ortega Martínez, 2018; Ridge et al., 2017). La comparación en futuros trabajos de los perfiles temporales de expresión génica entre ambas NILs permitirá comprobar si existe expresión diferencial en los genes seleccionados y caracterizar el efecto de los distintos alelos presentes en las NILs en la cascada de señalización del proceso de floración.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

En base a los resultados y discusión expuestos en este trabajo, se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

- El fenotipado de las NILs ha permitido detectar caracteres, además de la fecha de floración, que presentan diferencias significativas (*e.g.* longitud del entrenudo o grado de ramificación).
- El análisis de la secuenciación sugiere al locus *ELF3A* como principal responsable implicado en las diferencias en la fecha de floración observadas en la pareja de NILs empleada en este trabajo. El alelo recesivo correspondiente con una deleción de 11 pb, que provoca la aparición de un codón de terminación de forma prematura, está asociado con la floración precoz en *C. arietinum*. Aunque también se han identificado otros locus que podrían influir, las diferencias fenotípicas observadas en la pareja de NILs, además de la floración, podrían deberse a efectos pleiotrópicos del locus *ELF3A*. Esta observación merece ser objeto de mayores investigaciones.
- La línea parental precoz JG62 (sinónimo ICC4951) debe presentar el alelo recesivo de *ELF3A* en homocigosis.

Por otro lado, la secuenciación ha confirmado que la pareja de NILs empleada en este trabajo comparte la mayor parte del genoma y presenta un grado muy bajo de heterocigosis, por lo que constituyen un material muy valioso para profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a la fecha de floración en futuros trabajos. Por ello, ya se ha realizado la recolección de tejido a partir del cual se puede extraer ARN y se han diseñado secuencias de cebadores para los genes de interés. Los resultados del análisis de expresión permitirán diseñar marcadores moleculares para el carácter floración temprana/tardía a partir de las secuencias de genes que presenten perfiles transcripcionales diferenciales.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abbo, S., Berger, J., & Turner, N. C. (2003). Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*, 30(10), 1081. <https://doi.org/10.1071/FP03084>
- Ahn, J. H., Miller, D., Winter, V. J., Banfield, M. J., Lee, J. H., Yoo, S. Y., Henz, S. R., Brady, R. L., & Weigel, D. (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *The EMBO Journal*, 25(3), 605–614. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600950>
- Ali, L., Azam, S., Rubio, J., Kudapa, H., Madrid, E., Varshney, R. K., Castro, P., Chen, W., Gil, J., & Millan, T. (2015). Detection of a new QTL/gene for growth habit in chickpea CaLG1 using wide and narrow crosses. *Euphytica*, 204(2), 473–485. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1369-4>
- Ali, L., Deokar, A., Caballo, C., Tar'an, B., Gil, J., Chen, W., Millan, T., & Rubio, J. (2016). Fine mapping for double podding gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(1), 77–86. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2610-1>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arriagada, O., Cacciuttolo, F., Cabeza, R. A., Carrasco, B., & Schwember, A. R. (2022). A Comprehensive Review on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Breeding for Abiotic Stress Tolerance and Climate Change Resilience. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6794. <https://doi.org/10.3390/ijms23126794>
- Basu, U., Narnoliya, L., Srivastava, R., Sharma, A., Bajaj, D., Daware, A., Thakro, V., Malik, N., Upadhyaya, H. D., Tripathi, S., Hegde, V. S., Tyagi, A. K., & Parida, S. K. (2019). CLAVATA signaling pathway genes modulating flowering time and flower number in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(7), 2017–2038. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03335-y>

- Caballo, C., Berbel, A., Ortega, R., Gil, J., Millan, T., Rubio, J., & Madueño, F. (2022). The *SINGLE FLOWER (SFL)* gene encodes a MYB transcription factor that regulates the number of flowers produced by the inflorescence of chickpea. *The New Phytologist*, *234*(3), 827–836. <https://doi.org/10.1111/nph.18019>
- Caballo, C., Castro, P., Gil, J., Millan, T., Rubio, J., & Die, J. V. (2019). Candidate genes expression profiling during wilting in chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5. *Plos One*, *14*(10), e0224212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224212>
- Carreras, J., Allende, M., Rojas, E., & Bologna, S. (2016). Mejora genética del garbanzo. Sección 2. Programa de mejoramiento del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Labor interinstitucional e interdisciplinaria. Periodo 1988-2015. En J. Carreras, V. Mazzuferi, & M. Karlin (Eds.), *El cultivo de garbanzo (Cicer arietinum L.) en Argentina*. (pp. 179–214).
- Castro, P., Pistón, F., Madrid, E., Millan, T., Gil, J., & Rubio, J. (2010). Development of chickpea near-isogenic lines for fusarium wilt. *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(8), 1519–1526. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1407-5>
- FAOSTAT, F. A. O. (2013). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
- FAOSTAT, F. A. O. (2020). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Frailey, D. C., Zhang, Q., Wood, D. J., & Davis, T. M. (2022). Defining the mutation sites in chickpea nodulation mutants PM233 and PM405. *BMC Plant Biology*, *22*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03446-7>
- Hecht, V., Foucher, F., Ferrándiz, C., Macknight, R., Navarro, C., Morin, J., Vardy, M. E., Ellis, N., Beltrán, J. P., Rameau, C., & Weller, J. L. (2005). Conservation of arabidopsis flowering genes in model legumes. *Plant Physiology*, *137*(4), 1420–1434. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057018>

- Hecht, V., Knowles, C. L., Vander Schoor, J. K., Liew, L. C., Jones, S. E., Lambert, M. J. M., & Weller, J. L. (2007). Pea *LATE BLOOMER1* is a *GIGANTEA* ortholog with roles in photoperiodic flowering, deetiolation, and transcriptional regulation of circadian clock gene homologs. *Plant Physiology*, *144*(2), 648–661. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096818>
- Huijser, P., & Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, *138*(19), 4117–4129. <https://doi.org/10.1242/dev.063511>
- Jacob, C., Carrasco, B., & Schwember, A. R. (2016). Advances in breeding and biotechnology of legume crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *127*(3), 561–584. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1106-2>
- Jendoubi, W., Bouhadida, M., Millan, T., Kharrat, M., Gil, J., Rubio, J., & Madrid, E. (2016). Identification of the target region including the *FocO₁ /focO₁* gene and development of near isogenic lines for resistance to Fusarium Wilt race 0 in chickpea. *Euphytica*, *210*(1), 119–133. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1712-4>
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *The British Journal of Nutrition*, *108*(S1), S11–S26. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>
- Koester, R. P., Sisco, P. H., & Stuber, C. W. (1993). Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in two near isogenic lines of maize. *Crop Science*, *33*(6), 1209. <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300060020x>
- Kumar, J., & Abbo, S. (2001). Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments. *Advance in Agronomy*, *72*, 107–138. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(01\)72012-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(01)72012-3)
- Ladizinsky, G., & Adler, A. (1976). The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica*, *25*(1), 211–217. <https://doi.org/10.1007/BF00041547>

- Lee, S., Cassone, B. J., Wijeratne, A., Jun, T.-H., Michel, A. P., & Mian, M. A. R. (2017). Transcriptomic dynamics in soybean near-isogenic lines differing in alleles for an aphid resistance gene, following infestation by soybean aphid biotype 2. *BMC Genomics*, *18*(1), 472. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3829-9>
- Li, N., Zhang, X., & Yang, W. (2019). Marker-assisted development and characterization of near-isogenic lines carrying the Rx4 gene for hypersensitive resistance to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3 in tomato. *Molecular Breeding*, *39*(12), 172. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-1084-2>
- Martin, G. B., Williams, J. G., & Tanksley, S. D. (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(6), 2336–2340. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2336>
- Mideros, S. X., Warburton, M. L., Jamann, T. M., Windham, G. L., Williams, W. P., & Nelson, R. J. (2014). Quantitative Trait Loci Influencing Mycotoxin Contamination of Maize: Analysis by Linkage Mapping, Characterization of Near-Isogenic Lines, and Meta-Analysis. *Crop Science*, *54*(1), 127–142. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.04.0249>
- Millan, T., Clarke, H. J., Siddique, K. H. M., Buhariwalla, H. K., Gaur, P. M., Kumar, J., Gil, J., Kahl, G., & Winter, P. (2006). Chickpea molecular breeding: New tools and concepts. *Euphytica*, *147*(1), 81–103. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-4261-4>
- Müller, D., & Leyser, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, *107*(7), 1203–1212. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr069>

- Ngu, M. S., Thomson, M. J., Bhuiyan, M. A. R., Ho, C., & Wickneswari, R. (2014). Fine mapping of a grain weight quantitative trait locus, *qGW6*, using near isogenic lines derived from *Oryza rufipogon* IRGC105491 and *Oryza sativa* cultivar MR219. *Genetics and Molecular Research*, *13*(4), 9477–9488. <https://doi.org/10.4238/2014.November.11.13>
- Nusinow, D. A., Helfer, A., Hamilton, E. E., King, J. J., Imaizumi, T., Schultz, T. F., Farré, E. M., & Kay, S. A. (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, *475*(7356), 398–402. <https://doi.org/10.1038/nature10182>
- Ortega Martínez, R. (2018). *The role of the FT genes in the control of flowering in chickpea* [Doctoral dissertation, University of Tasmania]. <https://eprints.utas.edu.au/28596/>
- Ortega, R., Hecht, V. F. G., Freeman, J. S., Rubio, J., Carrasquilla-Garcia, N., Mir, R. R., Penmetsa, R. V., Cook, D. R., Millan, T., & Weller, J. L. (2019). Altered Expression of an FT Cluster Underlies a Major Locus Controlling Domestication-Related Changes to Chickpea Phenology and Growth Habit. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 824. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00824>
- Otte, O., & Barz, W. (2000). Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry*, *53*(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00463-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00463-X)
- Paran, I., Kesseli, R., & Michelmore, R. (1991). Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome*, *34*(6), 1021–1027. <https://doi.org/10.1139/g91-157>
- Parra, L., Nortman, K., Sah, A., Truco, M. J., Ochoa, O., & Michelmore, R. (2021). Identification and mapping of new genes for resistance to downy mildew in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, *134*(2), 519–528. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03711-z>
- Perilli, S., Moubayidin, L., & Sabatini, S. (2010). The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.018>

- Platten, J. D., Foo, E., Foucher, F., Hecht, V., Reid, J. B., & Weller, J. L. (2005). The cryptochrome gene family in pea includes two differentially expressed CRY2 genes. *Plant Molecular Biology*, *59*(4), 683–696. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0828-z>
- Rachwa-Rosiak, D., Nebesny, E., & Budryn, G. (2015). Chickpeas—composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(8), 1137–1145. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.687418>
- Rajandran, V. (2016). *Genetic control of flowering time in lentil* [Doctoral dissertation, University of Tasmania.]. <https://eprints.utas.edu.au/23513/>
- Ridge, S., Deokar, A., Lee, R., Daba, K., Macknight, R. C., Weller, J. L., & Tar'an, B. (2017). The Chickpea *Early Flowering 1 (efl1)* Locus Is an Ortholog of Arabidopsis *ELF3*. *Plant Physiology*, *175*(2), 802–815. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00082>
- Rubenach, A. J. S., Hecht, V., Vander Schoor, J. K., Liew, L. C., Aubert, G., Burstin, J., & Weller, J. L. (2017). *EARLY FLOWERING3* Redundancy Fine-Tunes Photoperiod Sensitivity. *Plant Physiology*, *173*(4), 2253–2264. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01738>
- Rubio, J., Moreno, M. T., Cubero, J. I., & Gil, J. (1998). Effect of the gene for double pod in chickpea on yield, yield components and stability of yield. *Plant Breeding*, *117*(6), 585–587. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1998.tb02214.x>
- Sadava, D., & Chrispeels, M. J. (1973). Hydroxyproline-rich cell wall protein (extensin): role in the cessation of elongation in excised pea epicotyls. *Developmental Biology*, *30*(1), 49–55. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(73\)90047-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(73)90047-x)
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(4), 1460–1465. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>

- Sawa, M., & Kay, S. A. (2011). GIGANTEA directly activates *Flowering Locus T* in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(28), 11698–11703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106771108>
- Shen, L., Courtois, B., McNally, K. L., Robin, S., & Li, Z. (2001). Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*(1), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s001220100538>
- Shim, J. S., Kubota, A., & Imaizumi, T. (2017). Circadian clock and photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS is a hub for signal integration. *Plant Physiology*, *173*(1), 5–15. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01327>
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., Qiu, L. I., Redden, R. J., Varshney, R. K. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*(1–3), 43–104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>
- Thakare, D., Kumudini, S., & Dinkins, R. D. (2010). Expression of flowering-time genes in soybean E1 near-isogenic lines under short and long day conditions. *Planta*, *231*(4), 951–963. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1100-6>
- To, J. P. C., Deruère, J., Maxwell, B. B., Morris, V. F., Hutchison, C. E., Ferreira, F. J., Schaller, G. E., & Kieber, J. J. (2007). Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant Cell*, *19*(12), 3901–3914. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052662>
- Tuinstra, M. R., Ejeta, G., & Goldsbrough, P. B. (1997). Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics*, *95*(5–6), 1005–1011. <https://doi.org/10.1007/s001220050654>

- van der Maesen, L. J. G., Maxted, N., Javabi, F., Coles, S., & Davies, A. M. R. (2007). Taxonomy of the Genus *Cicer* Revisited. En S. S. Yadav, R. J. Redden, W. Chen & B. Sharma (Eds.), *Chickpea Breeding and Management* (pp. 14–46). CABI Publishing.
- van der Maesen, L. J. G. (1972). *Cicer* L., a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. *Mededlingen Landbouwhogeschool (Communication Agricultural University)*.
- Varshney, R. K., Song, C., Saxena, R. K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A. G., Cannon, S., Baek, J., Rosen, B. D., Tar'an, B., Millan, T., Zhang, X., Ramsay, L. D., Iwata, A., Wang, Y., Nelson, W., Farmer, A. D., Gaur, P. M., Soderlund, C., ... Cook, D. R. (2013). Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology*, 31(3), 240–246. <https://doi.org/10.1038/nbt.2491>
- Weller, J. L., Liew, L. C., Hecht, V. F. G., Rajandran, V., Laurie, R. E., Ridge, S., Wenden, B., Vander Schoor, J. K., Jaminon, O., Blassiau, C., Dalmais, M., Rameau, C., Bendahmane, A., Macknight, R. C., & Lejeune-Hénaut, I. (2012). A conserved molecular basis for photoperiod adaptation in two temperate legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(51), 21158–21163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207943110>
- Weller, J. L., & Macknight, R. C. (2019). Genetic control of flowering time in legumes. En F. de Bruijn (Ed.), *The Model Legume Medicago truncatula* (1st ed., pp. 182–188).
- Weller, J. L., & Ortega, R. (2015). Genetic control of flowering time in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 207. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00207>
- Wong, A. C. S., Hecht, V. F. G., Picard, K., Diwadkar, P., Laurie, R. E., Wen, J., Mysore, K., Macknight, R. C., & Weller, J. L. (2014). Isolation and functional analysis of *CONSTANS-LIKE* genes suggests that a central role for *CONSTANS* in flowering time control is not evolutionarily conserved in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 486. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00486>

- Wood, J. A., & Grusak, M. A. (2007). Nutritional Value of Chickpea. En S. S. Yadav, R. J. Redden, W. Chen, & B. Sharma (Eds.), *Chickpea Breeding and Management* (pp. 101–142). CABI Publishing.
- Xue, S., Xu, F., Li, G., Zhou, Y., Lin, M., Gao, Z., Su, X., Xu, X., Jiang, G., Zhang, S., Jia, H., Kong, Z., Zhang, L., & Ma, Z. (2013). Fine mapping TaFLW1, a major QTL controlling flag leaf width in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *126*(8), 1941–1949. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2108-7>
- Xu, D., Zhu, D., & Deng, X. W. (2016). The role of COP1 in repression of photoperiodic flowering. *F1000Research*, *5*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7346.1>
- Yan, G., Liu, H., Wang, H., Lu, Z., Wang, Y., Mullan, D., Hamblin, J., & Liu, C. (2017). Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1786. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786>
- Yu, J.-W., Rubio, V., Lee, N.-Y., Bai, S., Lee, S.-Y., Kim, S.-S., Liu, L., Zhang, Y., Irigoyen, M. L., Sullivan, J. A., Zhang, Y., Lee, I., Xie, Q., Paek, N.-C., & Deng, X. W. (2008). COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Molecular Cell*, *32*(5), 617–630. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.026>
- Zhang, Y., Luo, L., Xu, C., Zhang, Q., & Xing, Y. (2006). Quantitative trait loci for panicle size, heading date and plant height co-segregating in trait-performance derived near-isogenic lines of rice (*Oryza sativa*). *Theoretical and Applied Genetics*, *113*(2), 361–368. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0305-3>
- Zhao, H., Xu, D., Tian, T., Kong, F., Lin, K., Gan, S., Zhang, H., & Li, G. (2021). Molecular and functional dissection of EARLY-FLOWERING 3 (ELF3) and ELF4 in *Arabidopsis*. *Plant Science*, *303*, 110786. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110786>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

ANEXOS.

Tabla A1. Cromosoma, gen y posición de las variaciones en homocigosis de alto impacto, con información de los alelos (referencia y alternativos), su efecto y genotipo de cada NIL. Los alelos siempre se refieren a la cadena positiva, independientemente de la cadena en la que se encuentre el gen.

Cromosoma: ID <i>C. arietinum</i> NCBI	Posición de la variación	Alelo de referencia (0)	Alelo alternativo (1)	Efecto de la variación	Genotipo NIL Tardía	Genotipo NIL Precoz
Ca1: LOC101496129	1 856 724	C	G	Pérdida codón parada	1/1	0/0
	1 861 926	C	A	Pérdida codón inicio	1/1	0/0
Ca1: LOC101500879	1 976 474	G	GTTACT	Variación donador <i>splicing</i>	1/1	0/0
Ca1: LOC101504943	2 040 951	A	T	Ganancia codón parada	1/1	0/0
	2 044 065	T	G	Ganancia codón parada	1/1	0/0
Ca1: LOC101510509	2 060 804	C	T	Ganancia codón parada	1/1	0/0
Ca1: LOC101505696	2 074 749	TAC	T	Modificación pauta lectura	1/1	0/0
	2 074 752	C	CGA	Modificación pauta lectura	1/1	0/0
Ca1: LOC101511464	2 216 940	CG	C	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca1: LOC101489772	2 321 303	GTAAC	G	Variación donador <i>splicing</i>	0/0	1/1
Ca1: LOC101511156	2 463 035	AAC	A	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
	2 463 456	AGTTTATG	A	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca1: LOC101511364	2 755 679	T	TCA	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
	2 755 680	GTT	G	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca1: LOC101513197	2 807 534	C	G (alelo 1), CTG (alelo 2)	Modificación pauta lectura y ganancia codón parada	0/0	1/2
	2 807 741	CGA	C	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
	2 807 755	CCAAT	CGACAAT (alelo 1), C (alelo 2)	Modificación pauta lectura	0/0	1/2
Ca1: LOC113783936	2 856 149	A	C	Ganancia codón parada	0/0	1/1
	2 856 228	A	AGG	Modificación pauta lectura	0/0	1/1

Ca1: LOC101512754	2 877 886	A	G	Pérdida codón inicio	0/0	1/1
Ca1: LOC101515361	2 868 089	C	CTCTT	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca1: LOC101512754	2 877 886	A	G	Pérdida codón inicio	0/0	1/1
Ca1: LOC101490960	2 948 462	A	ATTCC	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
	2 948 463	A	AAT	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca1: LOC101497222	4 738 116	T	A	Variación aceptor <i>splicing</i>	0/0	1/1
Ca1: LOC101489333	8 135 976	AAATTTTCT GTTTTTCCTT TTT	A	Pérdida de codón parada y fusión de dos ARNm	0/0	1/1
Ca2: LOC101501328	5 519 109	ACCCT	A	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca4: LOC101488866	19 666 391	T	TACTACTCTTTC CACACACCTC CCTAACCCC (alelo 1), TACTACTCTTTC CACACACCTC CCTA (alelo 2)	Modificación pauta lectura	2/2	1/1
Ca4: LOC101488756	47 913 881	TTCATTGCA ATAATGTTTC CACAAATTA CTTGCTGG	T	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca5: LOC101489432	36 016 064	ATCATCATCT TC	A	Modificación pauta lectura	0/0	1/1
Ca6: LOC101491386	57 976 518	G	A	Ganancia codón parada	1/1	0/0
Ca7: LOC101504314	9 131 180	G	GAAGACTCCT GCTGAAATTA (alelo 1), GAAGACTCCT GCTGAAATTA ACACAA (alelo 2)	Modificación pauta lectura	2/2	1/1