

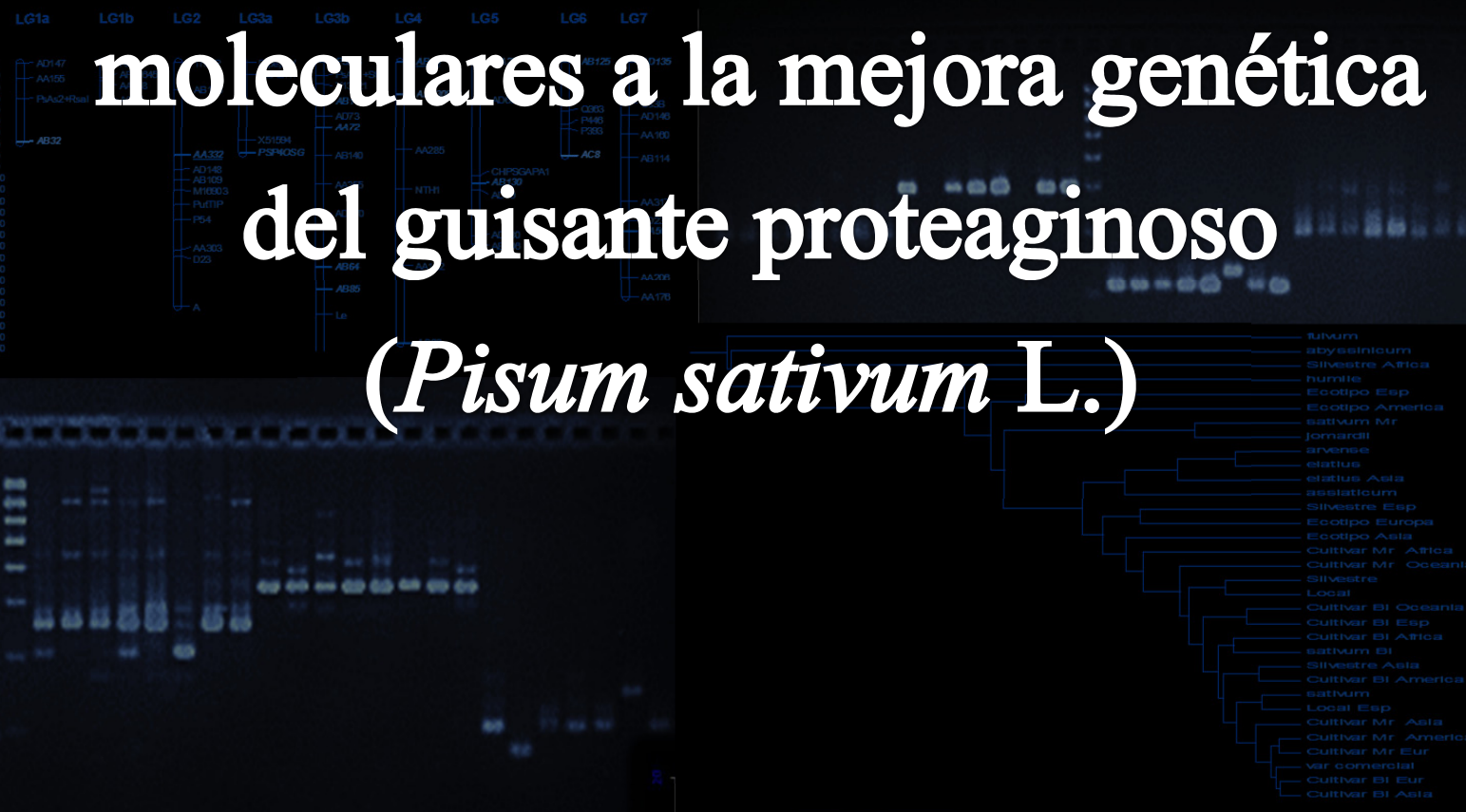
LGI LGII LGIII LGIV LGV LGVI LGVII



DPTO. BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE LEÓN



Aplicación de marcadores moleculares a la mejora genética del guisante proteaginoso (Pisum sativum L.)



SONIA RAMOS GÓMEZ
LEÓN, 2013



DPTO. BIOLOGÍA MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE LEÓN

**APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LA MEJORA
GENÉTICA DEL GUISANTE PROTEAGINOSO (*Pisum sativum* L.)**

Sonia Ramos Gómez

León 2013



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹

El Dr. D. Constantino Caminero Saldaña como Director² de la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de marcadores moleculares en la mejora genética del guisante proteaginoso (*Pisum sativum* L.)” realizada por Dña. Sonia Ramos Gómez en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 02 de septiembre de 2013

¹ Solamente para las tesis depositadas en papel.

² Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



Solicitud “**Mención Internacional**” en el título de Doctor

D/D^a Sonia Ramos Gómez con D.N.I. 71417488-G , habiendo realizado la tesis doctoral titulada “Aplicación de marcadores moleculares en la mejora genética del guisante proteaginoso (*Pisum sativum* L.)” dirigida por el/los Dr./Dres. Constantino Caminero Saldaña y cumpliendo los requisitos establecidos por el art. 15 del R.D. 99/2011, de 28 de enero,

SOLICITA:

Le sea concedida la Mención Internacional en el título de Doctor.

León a 02 de septiembre de 2013

SR. DECANO DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO

*"La ciencia la hacen personas,
donde sea, en una buhardilla,
cuando tienen el genio investigador,
y no los laboratorios, por ricos que
se construyan y se doten."*

Marie Curie

A mi madre

A Víctor

Agradecimientos

Han pasado los años desde que di mis primeros pasos en investigación y durante ese tiempo me ha ido acompañando mucha gente de la que he aprendido, con la que he compartido experiencias y que ha aportado su granito de arena a la persona que soy, tanto en lo personal como en lo profesional, y a los que tengo mucho que agradecer. Espero no olvidarme de nadie y pido disculpas si esto ocurre.

No podría empezar sin agradecer a los que considero responsables directos de que hoy esté aquí, en 3º de Biología me propusieron una experiencia en investigación que nunca olvidaría: Javier Vences me propuso colaborar en el laboratorio y me enseñó que la investigación va más allá del laboratorio y Luis me dio mis primeras clases experimentales fuera de las prácticas de la carrera. Continué en este laboratorio al acabar la licenciatura y Paqui intentó enseñarme a escribir textos científicos (aún sigo en ello) y, entre café de media mañana y conversaciones de pasillo, aprendí y disfruté cada minuto de mi DEA con la compañía de Pedro, Carlos, Juan, Ana y Ana, Marisa, Marcelino y todos los estudiantes que rondaban por aquel entonces el laboratorio, mucho tengo que agradecer al Área de Genética de la Universidad de León.

Gracias a ellos también conseguí entrar en mi segunda fase investigadora, la tesis doctoral, esta vez en el ITACyL, con una beca INIA, por lo que agradezco a ambos organismos que me permitieran continuar investigando. Quedando a caballo entre dos grupos de trabajo aprendí y disfruté de cada uno. En el grupo de “guisante” agradecer a Abel y a Alicia el enseñarme todo lo relacionado con campo e invernadero, a Alberto por los consejos, las charlas y ese aceite de oliva de almazara que me traía, y a Tinín por dirigirme, por corregirme y por darme la libertad que me permitió emprender nuevos experimentos y experiencias. De esa libertad surgieron mis dos estancias, y tengo que agradecer tanto a Sergio Ochatt como a Kevin McPhee su ayuda como tutores tanto durante las estancias como después, nunca han dejado de estar disponibles y se han convertido en un referente para mí.

En el laboratorio de biología molecular agradecer a Marta H., el permitirme ser una más e incluso colaborar en alguna de sus líneas de investigación, sin embargo no me puedo olvidar de mis compañeras y amigas, a todas ellas: Marta F., Mónica, Kata, Diana, Elena, Rachel, Bea y al hombre rodeado de mujeres: Julián, gracias por todo el trabajo en el laboratorio, por las comidas, por los buenos ratos y los no tan buenos, en este último caso le doy las gracias en especial a Noe, que se merece buenos ratos, no sólo malos.

Tengo que hacer mención aparte a una persona especial en el laboratorio de biología molecular, estuvo a mi lado durante la beca, está pendiente de mí, se alegra por mí y me apoya en todo, siempre puedo contar con ella y no se puede pedir más de una amiga, Lore gracias. Tampoco puedo olvidarme de Ricardo y de las Cortas, que siempre me han abierto sus puertas y hasta me han dado cobijo cuando lo he necesitado.

Y en la actualidad no puedo dar más que las gracias al Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos, que me ha acogido, que me apoya y me ayuda, con los que aprendo día a día y a los que les debo ser de nuevo feliz profesionalmente: Manolo, Pilar, David, Conchi, Loli, Lourdes y Silvia. Agradecer en especial a Nati mi vuelta al laboratorio a través de la Tesis de Máster, los ánimos con la tesis doctoral y la fe depositada en mí.

No me quiero olvidar de los que han estado a mi lado en estos años, lejos de los laboratorios pero cerca de mí, Alfonso, que siempre tiene más de cinco minutos para ayudarme con cualquier cuestión tecnológica, Edu, un amigo que mejora mi calidad de vida y con el que siempre se puede contar aunque a mí no me viniera con el pueblo, y Davi y Julio, sin ellos Burgos sería muy distinto.

Últimas palabras para los más importantes, les debo todo y dedicarles esta tesis no es suficiente, han estado a mi lado en todo momento. A mi madre, cómo no, si me ha dedicado su vida y me ha apoyado siempre, hasta en los momentos más difíciles, me escucha y aunque no entienda mis palabras me entiende mejor que nadie. Y a Víctor, que se ha llevado la peor parte de esta tesis, los malos ratos y los peores y que ha luchado porque esté terminada y siempre ha creído en mí.

A todos, gracias de todo corazón, sin vosotros no hubiera podido hacerlo.

Sonia Ramos-Gómez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo I. Introducción	1
1. Mejora Genética Vegetal	1
1. 1. Introducción a la Mejora Genética Vegetal	1
1. 2. Programa de mejora genética vegetal	3
1. 3. Algunas herramientas biotecnológicas de apoyo para la mejora genética vegetal	6
2. El guisante	12
2. 1. Origen	12
2. 2. Taxonomía	12
2. 3. Genética	14
2. 4. Biología y ecología	15
2. 5. Importancia del guisante como cultivo	16
2. 6. Problemática del cultivo del guisante	20
3. La mejora genética del guisante asociada a la dureza invernal	29
3. 1. Los marcadores moleculares en la mejora genética del guisante	29
3. 2. Recogida y clasificación como fase inicial en la mejora del guisante	33
3. 3. Estudio del origen, evolución, diversidad y comportamiento del guisante	33
3. 4. Estudio de la herencia: Mapas genéticos de ligamiento	37
3. 5. Estudio de la problemática del adelanto en la fecha de siembra en guisante	40
3. 6. Otros recursos en la mejora genética del guisante	50
3. 7. Selección de líneas de guisante mejoradas	52
Capítulo II. Objetivos	57
Capítulo III. Materiales y métodos	61
1. Estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones	61
1. 1. Materiales para el estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones	61
1. 2. Metodología aplicada en el estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones	65
1. 3. Análisis estadístico	70
2. Mapeo genético y análisis de QTL de importancia agronómica y asociados a tolerancia a heladas	79
2. 1. Materiales para el mapeo genético y análisis de QTL	79
2. 2. Metodología aplicada en el mapeo genético y análisis de QTL	81
2. 3. Análisis estadístico	88
3. Análisis de la expresión diferencial asociada a la aclimatación en guisante	91
3. 1. Materiales para la expresión diferencial asociada a la aclimatación en guisante	91
3. 2. Metodología aplicada en la expresión diferencial	96
3. 3. Método de cuantificación	100

Capítulo IV. Resultados y Discusión	107
1. Estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones	107
1. 1. Análisis descriptivo de la variabilidad genética	107
1. 2. Estructura de la población a nivel genético	117
1. 3. Aplicación de un método basado en distancias	117
1. 4. Estudio de la estructura. Aplicación de un método basado en modelos paramétricos	125
1. 5. Estudio de la diversidad genética: agrupación y ordenación	144
2. Mapeo genético y análisis de QTL de caracteres agronómicos y asociados a tolerancia a heladas	156
2. 1. Mapas de ligamiento	156
2. 2. Detección y mapeo de QTL	178
2. 3. Detección y mapeo de QTL relacionados con caracteres agronómicos	178
2. 4. Detección y mapeo de QTL a partir del experimento en cámara climática para tolerancia a heladas	196
2. 5. Análisis comparativo de QTL asociados a caracteres de interés en la mejora genética del guisante	221
3. Análisis de la expresión diferencial asociada a la aclimatación en guisante	231
3. 1. Selección sistemas de amplificación	231
3. 2. Implementación de los sistemas de amplificación en la cuantificación relativa de la expresión diferencial ante la aclimatación	240
3. 3. Establecimiento de los criterios de selección y cribado de genes	244
3. 4. Análisis de la expresión diferencial en otros genotipos de guisante	254
3. 5. Análisis conjunto de la expresión diferencial mostrada por las seis líneas evaluadas	276
4. Resultados globales y discusión final	280
 Capítulo V. Conclusiones	 287
 Capítulo VI. Referencias Bibliográficas	 291
 Capítulo VII. ANEXOS	 337
 Capítulo VIII. Abstract	 372

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III.1. Distribución de taxones dentro de la muestra a estudio _____	62
Figura III.2. Distribución geográfica de los distintos tipos de accesiones en la muestra a estudio _____	63
Figura III.3. Condiciones de temperatura y tiempo en los ensayos en cámara climática _____	86
Figura IV.1. Dendrogramas de distancias genéticas entre grupos para cada tipo de marcadores _____	118
Figura IV.2. Análisis ad hoc de ΔK para el global de los marcadores _____	125
Figura IV.3. Gráfico de la estructura en 7 grupos para el global de los marcadores _____	126
Figura IV.4. Análisis ad hoc de ΔK para el global de los marcadores con información (POPINFO) _____	127
Figura IV.5. Gráfico de la estructura en 5 grupos para el global de los marcadores con información previa _____	127
Figura IV.6. Gráfico de la estructura en 7 grupos para el global de los marcadores con información previa _____	128
Figura IV.7. Análisis ad hoc de ΔK para los marcadores RBIP _____	129
Figura IV.8. Gráfico de la estructura en 9 grupos para los marcadores RBIP _____	129
Figura IV.9. Análisis ad hoc de ΔK para los marcadores RBIP con información previa _____	130
Figura IV.10. Gráfico de la estructura en 6 grupos para los marcadores RBIP con información previa _____	130
Figura IV.11. Análisis ad hoc de ΔK para los marcadores SSR _____	132
Figura IV.12. Gráfico de la estructura en 5 grupos para los marcadores SSR _____	132
Figura IV.13. Análisis ad hoc de ΔK para los marcadores SSR con información previa _____	133
Figura IV.14. Gráfico de la estructura en 8 grupos para los marcadores SSR con información previa _____	133
Figura IV.15. Análisis ad hoc de ΔK para los marcadores GTM _____	135
Figura IV.16. Gráfico de la estructura en 10 grupos para los marcadores GTM _____	136
Figura IV.17. Análisis ad hoc de ΔK para los marcadores GTM con información previa _____	136
Figura IV.18. Gráfico de la estructura en 5 grupos para los marcadores GTM con información previa _____	136
Figura IV.19. Gráfico de la estructura en 7 grupos para los marcadores GTM con información previa _____	137
Figura IV.20. Representación gráfica del número de alelos en relación a los loci analizados obtenido para cada uno de los grupos definidos _____	143
Figura IV.21. Representación gráfica de la heterocigosis esperada para cada locus en cada uno de los grupos definidos _____	144
Figura IV.22. Representación gráfica de sedimentación correspondiente al número de componentes obtenida en PCA frente al autovalor propio de cada componente _____	145
Figura IV.23. Representación bidimensional con rotación Varimax de las dos primeras componentes principales del análisis factorial según grupo taxonómico _____	147
Figura IV.24. Representación bidimensional con rotación Varimax de las dos primeras componentes principales del análisis factorial según tipos de cultivo y origen geográfico _____	148
Figura IV.25. Matriz de emparejamiento en base a distancias F_{ST} _____	150
Figura IV.26. Dendrograma basado en distancias F_{ST} para los grupos definidos en la colección _____	151
Figura IV.27. Representación de los grupos en las dos dimensiones obtenidas mediante PCoA en base al índice F_{ST} _____	154
Figura IV.28. Mapa de ligamiento de la población PopESP _____	157
Figura IV.29. Mapa de ligamiento de la población PopFRA _____	160

Figura IV.30. Mapa de ligamiento de la población PopUSA _____	162
Figura IV.31. Mapa compuesto de las tres poblaciones obtenido a través de marcadores puente _____	165
Figura IV.32. Representación gráfica de los mapas obtenidos frente al mapa consenso _____	170
Figura IV.33. Mapa de QTL sobre la población PopESP _____	193
Figura IV.34. Mapa de QTL sobre la población PopFRA _____	195
Figura IV.35. QTL asociados al daño general evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas _____	199
Figura IV.36. QTL asociados al daño en tallos evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas _____	205
Figura IV.37. QTL asociados al daño en hojas evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas _____	209
Figura IV.38. QTL asociados al porcentaje de supervivencia tras dos semanas de recuperación evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas _____	213
Figura IV.39. QTL asociados al desarrollo de brotes evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas _____	216
Figura IV.40. Mapas de QTL asociados a tolerancia a heladas a partir de los ensayos a -6°C y -9°C _____	219
Figura IV.41. Mapas de QTL asociados a tolerancia a heladas a partir de los ensayos a -12°C y -15°C _____	220
Figura IV.42. Representación ΔR_n vs ciclo de amplificación para el sistema Ps_024 _____	234
Figura IV.44. Curva estándar obtenida a partir de la amplificación de 18S en diluciones seriadas _____	236
Figura IV.44. Representación gráfica del número de veces que se expresan diferencialmente los sistemas de amplificación en las líneas Medora y Melrose tras aclimatación (Md_AC vs MI_AC). _____	241
Figura IV.45. Patrones de variación en los niveles de expresión en función de los ratios $\Delta \Delta C_q$ entre cada uno de los genotipos, control y aclimatado. _____	246
Figura IV.46. Porcentajes de expresión diferencial entre los experimentos control y aclimatación _____	253
Figura IV.47. Metabolismos asociados a los sobreexpresión de genes por acliamatación en genotipos tolerantes a heladas _____	256
Figura IV.48. Distribución de los genes en función de la expresión diferencial mostrada tras aclimatación _____	266

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Clasificación taxonómica del género Pisum por Ambrose y Maxted (2000)	14
Tabla III.1. Listado de marcadores moleculares seleccionados en el estudio de diversidad	64
Tabla III.2. Mezclas de reacción para marcadores moleculares ASP, Size, CAPS, dCAPS y SSR	67
Tabla III.3. Mezclas de reacción para marcadores moleculares RBIP y STS	67
Tabla III.4. Condiciones de amplificación para marcadores ASP, Size, CAPS, dCAPS y SSR	67
Tabla III.5. Condiciones de amplificación para marcadores ASP, Size, CAPS, dCAPS y SSR	68
Tabla III.6. Condiciones de restricción para cada una de las enzimas empleadas	68
Tabla III.7. Características del cálculo de AMOVA en poblaciones	73
Tabla III.8. Listado de marcadores pre-seleccionados para mapeo genético	81
Tabla III.9. Ensayos realizados en campo	84
Tabla III.10. Características diferenciales entre accesiones seleccionadas	92
Tabla III.11. Sistemas de amplificación diseñados a partir de las 132 secuencias seleccionadas	93
Tabla III.12. Tabla de concentración de reacción para amplificación mediante PCR convencional	98
Tabla III.13. Condiciones de amplificación mediante PCR convencional	98
Tabla III.14. Concentraciones de reacción para optimización de PCR en tiempo real	99
Tabla III.15. Concentraciones finales de reacción de amplificación por PCR en tiempo real	100
Tabla III.16. Condiciones finales de amplificación mediante PCR en tiempo real	100
Tabla IV.1. Número de alelos por locus obtenido en la muestra a estudio	108
Tabla IV.2. Parámetros descriptivos de diversidad de los loci a estudio en los distintos grupos	109
Tabla IV.3. Parámetros descriptivos de diversidad para cada tipo de loci a estudio en los distintos grupos	111
Tabla IV.4. Loci fijados en un solo grupo	114
Tabla IV.5. Índices de heterocigosidad y diferenciación inter e intra-grupal	115
Tabla IV.6. Resultados de AMOVA para la colección global	116
Tabla IV.7. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos considerando K=7	126
Tabla IV.8. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=5 y K=7	127
Tabla IV.9. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=9	129
Tabla IV.10. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=6	130
Tabla IV.11. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=5	132
Tabla IV.12. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=8	133
Tabla IV.13. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=10	135
Tabla IV.14. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=5 y K=7	136
Tabla IV.15. Nuevos grupos dentro de la muestra total	141
Tabla IV.16. Referencias de ligamiento de cada uno de los marcadores mapeados en este trabajo	167
Tabla IV.17. QTL asociados al inicio de floración mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA	179
Tabla IV.18. QTL asociados al fin de floración mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA	182
Tabla IV.19. QTL asociados a la fecha de cosecha mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA	184
Tabla IV.20. QTL asociados a la formación de ramificaciones mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA	186
Tabla IV.21. QTL asociados al número de semillas mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA	188
Tabla IV.22. QTL asociados al peso total de semilla mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA	189

Tabla IV.23. QTL asociados al peso de cien semillas mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA	190
Tabla IV.24. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -6°C	196
Tabla IV.25. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -9°C	196
Tabla IV.26. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -12°C	197
Tabla IV.27. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -15°C	198
Tabla IV.28. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -6°C	201
Tabla IV.29. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -9°C	202
Tabla IV.30. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -12°C	203
Tabla IV.31. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -15°C	203
Tabla IV.32. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -6°C	206
Tabla IV.33. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -9°C	206
Tabla IV.34. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -12°C	207
Tabla IV.35. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -15°C	207
Tabla IV.36. QTL asociados a la supervivencia tras dos semanas de recuperación	211
Tabla IV.37. QTL asociados al desarrollo de brotes evaluados en todas las temperaturas	215
Tabla IV.38. Resultados de la amplificación de diluciones seriadas de ADNc mediante 18S	235
Tabla IV.39. Linealidad y eficiencia en la cuantificación de los sistemas diseñados	238
Tabla IV.40. Valores $\Delta\Delta C_q$ obtenidos en la comparación de los niveles de expresión de Medora y Melrose tras aclimatación	243
Tabla IV.41. Resumen de los valores y ratios $\Delta\Delta C_q$ para Medora y Melrose sin aclimatar y aclimatadas con los criterios de selección y cribado de genes establecidos en este trabajo	247
Tabla IV.42. Sistemas de amplificación, genes y posible función con expresión diferencial debida a la aclimatación en los genotipos Medora y Melrose	250
Tabla IV.43. Sistemas de amplificación, genes y posible función con expresión diferencial debida a la diferencia entre genotipos Medora y Melrose	251
Tabla IV.44. Sistemas de amplificación dependientes del proceso de aclimatación	255
Tabla IV.8. Sistemas de amplificación con expresión diferencial dependiente del grado de tolerancia a heladas de la línea de guisante evaluada	265
Tabla IV.46. Sistemas de amplificación con expresión diferencial según nivel de tolerancia	277

Capítulo I. Introducción

1. Mejora Genética Vegetal

1. 1. Introducción a la Mejora Genética Vegetal

En 1935, Vavilov explicó la evolución de la mejora vegetal como un arte, tan antiguo como la especie humana, cuyo objetivo es la producción de plantas cultivadas mejoradas, y cuyo progreso resulta de la aplicación de métodos puramente empíricos, si bien “para asegurar éxito, seguridad y rapidez en los objetivos principales” es necesario reemplazar el empirismo por el método científico. La mejora es pues un arte, pero también una industria y, por supuesto, una ciencia compleja que nace del estudio de la herencia y la evolución. La mejora vegetal comenzó con el inicio de la agricultura y la domesticación de los primeros cultivos. Desde su origen y durante miles de años los agricultores han utilizado la variabilidad genética que surge en las plantas silvestres y cultivadas para mejorar sus cultivos (Ellstrand *et al.*, 1999). De esta forma, los cultivos han evolucionado bajo la influencia del hombre y su capacidad de observación, selección y creatividad desde hace 10.000 años (Allard, 1960; 1999). Es a partir de este momento de la historia cuando el hombre descubre y desarrolla la herramienta básica de la mejora vegetal: la selección (Allard, 1960; Gaser y Fraley, 1989; Harlan, 1992; Losey *et al.*, 1999; Doebley *et al.*, 2006). La selección entendida como la habilidad de discriminar entre la variación biológica en una población para identificar y escoger las variantes deseadas en una región concreta (Allard, 1999; Gepts, 2002; Doebley *et al.*, 2006; Ulukan, 2008). Esta selección realizada por el hombre ha jugado un papel importante en la modelización de muchos de los rasgos de domesticación que caracterizan actualmente a los cultivos y que los distingue, a su vez, de sus ancestros silvestres (Wilcox, 2004).

El desarrollo de especies cultivadas y la mejora de nuevas variedades han dependido siempre de la existencia de diversidad biológica, derivada de la evolución a largo plazo de las especies. Los planes de mejora basados en un rango amplio de adaptación, un alto rendimiento del cultivo y una selección intensiva sobre las especies cultivadas han hecho emerger la pregunta sobre la “cantidad” de variabilidad genética que queda disponible en los bancos de mejora para su aprovechamiento sostenible (Hodkin, 1995). Así, junto con la necesidad de conservar la biodiversidad, emergieron también las necesidades de

determinar la diversidad asociada a los cultivos y de comprender mejor el impacto de la mejora en esa diversidad.

En la evolución de los cultivos, la evolución de la productividad ha sido un factor determinante. Durante las últimas décadas ha habido un gran consenso en el esfuerzo para la mejora del potencial de los genotipos para incrementar el rendimiento de los cultivos a través de la mejora clásica. Sin embargo, el ritmo de ganancia genética ha resultado ser muy lento, traduciéndose en un crecimiento también lento en producción y productividad (Ali *et al.*, 2003; Ali y Kumar, 2005; Kumar y Ali, 2006; Kumar *et al.*, 2011).

Con respecto a la mejora vegetal para el rendimiento, se han realizado grandes avances pero en que en muchos casos se veían frenados por la aparición de factores limitantes, especialmente los estreses bióticos y abióticos, motivando la necesidad de realizar en este campo de la mejora estudios sobre la nueva problemática para encontrar soluciones (Frankel, 1946).

Así, en 1958 Frankel define la mejora genética vegetal como “la ciencia cuyo objetivo principal es cambiar el genotipo, mejorándolo para un determinado medio y según el aprovechamiento para el que se vaya a destinar de acuerdo con las necesidades del hombre”. Otra definición en la misma línea es la realizada por Smith (1986) en la cual se describe a la mejora genética vegetal como “el arte y la ciencia de mejorar el genotipo de las plantas en relación con su utilización económica”. Ambas definiciones ya incluyen el término genotipo remarcando así una acción realizada por el hombre no sólo sobre el fenotipo, sino sobre sobre la planta con efecto estable, matiz clave dentro del concepto de mejora genética vegetal.

Los métodos clásicos de mejora son aplicados actualmente de forma frecuente y son empleados para obtener, por ejemplo, alimentos para el ser humano (Philips, 2006). No obstante, los programas de mejora clásicos pueden estar limitados por razones genéticas, como esterilidad, incompatibilidad o la simple no existencia en los acervos genéticos primario o secundario de variabilidad de interés para un determinado problema. Técnicas más recientes asociadas al concepto de ingeniería genética, han resultado útiles para resolver algunos de estos problemas (Oldach *et al.*, 2001; Doebley *et al.*, 2006).

No es hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando nace la mejora genética vegetal propiamente dicha. Los trabajos de Mendel (1865) originan la Escuela Mendeliana, y de los que nace la genética moderna (Fowleer y Hodgkin, 2004). Los trabajos realizados por Galton y sus colaboradores (Galton, 1886; 1889) sobre los que se desarrolla la Escuela Biométrica (Weldon y Pearson, 1906) crean la controversia sobre la herencia de los caracteres. Asimismo, el trabajo de Darwin sobre el papel de la selección natural publicado en 1859 impulsó la mejora vegetal. En un principio, los rasgos eran analizados en base a la genética mendeliana, independientemente de que muchos de los rasgos mostraran una variación cuantitativa o una segregación fenotípica discreta (Ramsey y Schmeske, 2002; Wilcox, 2004; Ozias-Akins y Van Dijk, 2007).

A principios del siglo XX el interés en la genética como ciencia crece y se postulan hipótesis como la ley de equilibrio de Hardy-Weimberg (1908) o el factor múltiple (East, 1916) que intenta aunar las dos escuelas, Escuela Mendeliana y Escuela Biométrica. Y es a partir de la segunda mitad del siglo XX cuando esta ciencia se desarrolla profundamente favoreciendo un conocimiento más profundo de las bases de la herencia de la información y permitiendo nuevos avances. Dichos avances de la genética son considerados en la actualidad como clásicos (genética mendeliana, cuantitativa y de poblaciones) y han dado origen a los “métodos convencionales de mejora”, cuyos resultados han sido patentes e indiscutibles.

Con las bases científicas de la herencia de los genes en especies vegetales, los mejoradores son capaces de mejorar plantas con características específicas con mayor precisión y eficacia de lo que hasta el momento había sido posible (Ladizinky, 1985). Por tanto, la comprensión de que los caracteres que presentaban los cultivos poseen una base genética fomentó el uso de la genética como ciencia para resolver problemas agronómicos, y por tanto, potenció el desarrollo de la mejora genética vegetal (Ulukan, 2009).

La mejora genética vegetal entendida como una ciencia en desarrollo no solo requiere de los avances de una ciencia pura como la genética para desarrollarse, sino que además, se nutre de los avances en otras ciencias para poder avanzar. Este es el caso del progreso que supone la aplicación métodos estadísticos o bioinformáticos como herramientas dentro de la mejora genética vegetal, permitiendo avances en el estudio de caracteres cuantitativos o de herencia compleja.

Por tanto, la mejora genética vegetal se ha convertido en una disciplina de muy amplio rango que necesita de los avances en otras muchas ciencias como estadística, biología molecular, fisiología, bioquímica, agronomía o genética, y que está en continuo desarrollo buscando permanente nuevas técnicas o herramientas que permitan salvar los nuevos retos que se plantean.

1. 2. Programa de mejora genética vegetal

De igual manera que la mejora clásica vegetal, la mejora genética vegetal se plantea unos objetivos que van ligados a las necesidades básicas del hombre como son su alimentación y la de su cabaña ganadera. Esos objetivos se fijan sobre un mejor rendimiento de los cultivos bien en producción, bien en calidad. Un plan de mejora genética vegetal contempla genéricamente distintas fases previas, ya recogidas por Vavilov (1935) y que se pueden resumir en estos cuatro pasos principales: (1) recogida y clasificación del material, (2) estudio del origen, evolución, diversidad y comportamiento del material, (3) estudio de la variabilidad y la herencia de las diferencias varietales y, (4) estudio de la problemática a mejorar, rangos de tolerancia, herencia y expresión y selección de líneas mejoradas.

Requisitos de un programa de mejora

La primera fase, recogida y clasificación del material, persigue dos claros objetivos: en un primer lugar, la obtención de colecciones ordenadas de plantas cultivadas, que representen el rango existente de variación y, en segundo lugar, descripciones y clasificaciones claras de este material, basadas en observaciones y mediciones morfológicas, fisiológicas, genéticas, citológicas, ecológicas y fitopatológicas (Frankel, 1946).

El primer objetivo nace de la necesidad de preservar el material vegetal irremplazable, lo que impulsó la creación de centros de recursos fitogenéticos, con el fin de conservar una representación lo más completa posible de la variabilidad existente en las plantas cultivadas: la mejora de los cultivos depende de la diversidad existente en el germoplasma de dicho cultivo, siendo esta diversidad el acervo o fondo genético útil y disponible para la mejora de una especie o cultivo.

En 1965 se crea el primer grupo de expertos en “Prospección e Introducción de Plantas” por iniciativa de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO; *Food and Agriculture Organization*). Posteriormente se funda el *Technical Advisory Committee of the Consultative Group on International Agricultural Research* (CGIAR) y el *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) para trabajar en la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos para el beneficio de las presentes y futuras generaciones (Esquinas-Alcázar, 1983; Hodking, 1998). Actualmente existen organizaciones en todo el mundo de índole nacional o internacional que han desarrollado sus propias colecciones incluyendo material local y ampliándolas con material recogido o cedido de otras regiones u organizaciones.

El segundo objetivo perseguido en esta fase inicial de mejora incluía la descripción y clasificación detallada del material conservado. Esto implica que cada entrada debe ir correctamente clasificada y debe ir ampliamente descrita. El número de descriptores presente en cada una de las bases de datos de los bancos de germoplasma es variable. Tanto la clasificación como la descripción son una labor necesaria y de la que dependen todos los trabajos posteriores de mejora por lo que es un paso fundamental en cualquier plan de mejora.

La segunda fase se basa en el estudio del origen, evolución, diversidad y comportamiento del material. Si la descripción detallada y la clasificación de un rango completo de variación constituyen la base principal de la mejora vegetal, el conocimiento de los modos de creación de unidades sistemáticas discretas es el segundo paso (Frankel, 1946). Los procesos genéticos y citológicos de especiación en plantas cultivadas han sido estudiados (Crane, 1940) y se pueden clasificar en cuatro grupos principales: selección de mutaciones, auto-poliploidía, cruzamiento de especies sin duplicación y con duplicación. Las consecuencias de estos cambios son múltiples, ya que estos procesos han permitido la creación de

variabilidad y, dependerá del número y la magnitud de estos procesos el rango de variación presente en un cultivo determinado.

Por tanto, el estudio de esos procesos que conllevan la variación implica conocer el origen y la evolución de un cultivo así como la diversidad presente y el comportamiento diferencial de las diferentes accesiones.

Del estudio de la variabilidad y la herencia de las diferencias varietales, como tercera fase del programa, el mejorador obtiene la información necesaria para cumplir dos objetivos necesarios en la mejora vegetal: (1) información sobre las relaciones genéticas entre caracteres complejos, (2) información sobre el fondo genético de caracteres cuya naturaleza o herencia es compleja. La distinción entre caracteres complejos y caracteres con herencia compleja, aunque resulte elemental, puede facilitar un acercamiento útil, en el cual la separación de un “carácter” en componentes, permita una visualización y un entendimiento más claros acerca de su complejidad (Frankel, 1946). De este modo, el rendimiento en semilla por ejemplo, puede descomponerse en el número de vainas por planta, número de grano por vaina y peso del grano. Tales pasos analíticos pueden simplificar, o incluso hacen posible, un análisis genético.

La descomposición de estos rasgos complejos es uno de los fundamentos de la última fase de estudio en un programa de mejora vegetal; estudio de la problemática a mejorar, rango de tolerancia, herencia y expresión por parte del cultivo y la selección de líneas mejoradas.

Muchos de los caracteres de interés para un mejorador están determinados por el genotipo de la planta y el ambiente que rodea durante su crecimiento. Ambos factores interactúan de forma que “muestran un rango continuo de variabilidad en las poblaciones segregantes” (Smith, 1944). Una forma clásica de abordar este problema es el estudio continuado de esta interacción, sin embargo este estudio se vuelve en muchos casos excesivamente complejo debido a la enorme cantidad de componentes que pueden participar en el proceso global.

Asimismo, a través de un enfoque genético se pueden establecer patrones de herencia en la expresión de caracteres cuantitativos complejos, por ejemplo desde la aproximación mediante el mapeo de caracteres de expresión cuantitativa, lo que unido a enfoques clásicos como el establecimiento de rangos de tolerancia permite relacionar los caracteres de interés para el mejorador con las bases genéticas responsables del fenotipo deseado. Esta relación permite un apoyo a través de aplicaciones biotecnológicas en el objetivo final del mejorador: la selección de líneas mejoradas y la obtención dirigida de genotipos de interés.

1. 3. Algunas herramientas biotecnológicas de apoyo para la mejora genética vegetal

La mejora genética vegetal se basa fundamentalmente en el conocimiento de la genética del cultivo y necesita de otras ciencias, como la biología molecular, para alcanzar más rápido y de forma más precisa ese conocimiento. Del mismo modo, la aplicación de un programa de mejora requiere del manejo de diversas herramientas que le ayuden en la consecución de sus objetivos, como es el caso de los marcadores moleculares. Los marcadores moleculares constituyen una herramienta versátil y potente aplicable a todas las fases de un plan de mejora genética vegetal.

Marcadores Moleculares y su aplicación en la mejora genética vegetal

Los marcadores moleculares son virtualmente ilimitados en número, detectables en todos los estados de desarrollo de la planta, no muestran efectos pleiotrópicos y, en consecuencia, constituyen una herramienta eficaz para: (1) una mayor eficiencia en la selección de parentales permitiendo una combinación controlada y eficaz de genotipos y (2) realizar una selección piramidal de rasgos simples que, a su vez, controlen caracteres más complejos (Wenzel, 2006).

La mejora vegetal puede verse complementada por el empleo de marcadores moleculares de tres formas generales. Primero, estos marcadores permiten una medida fiable de la diversidad genética. Segundo, a través del estudio de ligamiento de alelos de carácter cualitativo y alelos cuantitativos permiten mejorar la visión de muchos rasgos complejos. Tercero, los marcadores moleculares permiten un primer entendimiento de la biología y la arquitectura de muchos rasgos, particularmente de rasgos cuantitativos (Lamkey y Lee, 1993). Por tanto, en base a la versatilidad de los marcadores moleculares, éstos pueden ser aplicados en todas las fases de un plan de mejora genética vegetal.

Las técnicas basadas en marcadores moleculares son empleadas de forma extensa para optimizar la eficiencia y la precisión de los programas de mejora. Los marcadores moleculares son particularmente útiles cuando es necesario seleccionar caracteres de mejora controlados por numerosos genes, cada uno de los cuales contribuye en baja proporción al desarrollo del carácter (Weeden y Muehlbauer, 2004).

Los marcadores genéticos fueron utilizados inicialmente en el mapeo genético para determinar el orden de los genes a lo largo de los cromosomas. La obtención de estos mapas genéticos se relaciona con el estudio de la variabilidad y la herencia de las diferencias varietales. En 1913, Sturtevant creó el primer mapa genético a partir de seis rasgos morfológicos para *Drosophila melanogaster* y, poco después, Sax (1923), ya dentro del mundo vegetal, evidenció el ligamiento genético entre un rasgo cualitativo, el color de la semilla, con un rasgo cuantitativo, el tamaño de la semilla en la judía común, *Phaseolus vulgaris*. Estos estudios fueron los pioneros en la obtención de mapas genéticos de ligamiento y el mapeo de *loci* correspondientes a rasgos cuantitativos (QTL: *Quantitative Trait Loci*).

Los mapas de ligamiento genéticos conteniendo marcadores basados en ADN son potentes herramientas para la investigación genética vegetal y para la mejora vegetal. Los mapas de ligamiento han ayudado a identificar marcadores de ADN ligados a genes de importancia agronómica, tales como resistencia a enfermedades, y han permitido la identificación de secuencias de ADN ligadas a esos genes para su uso como herramientas de diagnóstico en la mejora vegetal. Mediante el empleo de mapas de ligamiento, se ha facilitado la caracterización de rasgos de herencia cuantitativa, incluyendo la identificación de regiones genómicas que contuvieran *loci* implicados, postulando los tipos de acción génica que podrían estar involucrados, y determinando el papel de los efectos epistáticos en un fenotipo específico (Tanksley, 1993). Asimismo, los mapas de ligamiento basados en marcados moleculares contribuyen a un mejor entendimiento del fenotipo basado en genética y a la comprensión de la bioquímica y la fisiología de la planta.

Los mapas genéticos son la localización teórica, basada en datos experimentales, de marcadores a lo largo de un grupo de ligamiento conceptual (Knox y Ellis, 2002). La longitud del mapa y el orden de marcadores están influenciados por muchos factores, incluyendo la frecuencia de dobles recombinantes, errores en la recogida de datos y la matriz de entrada, los efectos ambientales y las diferencias sexuales durante la meiosis, el tipo de marcador (dominante o codominante), la generación, tamaño y tipo de población utilizada (F_2 , líneas recombinantes puras (RILs), retrocruzamientos (BC), dobles haploides (DH)), etc (Haldane, 1919; Kosambi, 1944; Lander *et al.*, 1987; Lincoln y Lander, 1992; Nilsson *et al.*, 1993; Stam y Van Ooijen, 1995; Staub *et al.*, 1996; Sybenga, 1996). Los diferentes programas de mapeo proponen a veces diferente orden en los marcadores a partir de los datos primarios, pero habiendo obtenido un mapa, el orden de marcadores es crítico para el clonaje basado en mapas o la selección asistida por marcadores en programas de mejora. Se han encontrado *clusters*, o grupos, de marcadores ligados con ratios de mapeo sesgados a regiones de mapas de ligamiento correspondientes en F_2 , DH, BC y RILs entre cruzamientos interespecíficos en arroz. Los marcadores de mapeo con ratios sesgados pueden causar una asociación falsa de marcadores a regiones que de otra manera no estarían ligadas (Xu *et al.*, 1997).

Los marcadores morfológicos son fácilmente evaluables aunque pueden verse afectados por el ambiente. Son limitados en número y algunos aparecen en fases avanzadas del desarrollo vegetal, resultando imposible su rápida evaluación. Además, algunos marcadores morfológicos pueden alterar la expresión de otros rasgos morfológicos de interés en programas de mejora debido a efectos pleiotrópicos entre ellos. Los marcadores basados en isoenzimas también comparten limitaciones como el número de marcadores disponibles.

Estas limitaciones han sido superadas con el desarrollo de los marcadores basados en ADN. Se han desarrollado una gran variedad de marcadores moleculares basados en ADN durante los últimos años (Philips y Vasil, 2001; Gupta *et al.*, 2002). Este tipo de marcadores ha sido empleado en muchos estudios

para representar genomas en estudios de diversidad (Sunnucks, 2000). Asimismo han mostrado su utilidad para otros propósitos, siendo uno de los más destacados su utilización directa en la selección asistida por marcadores (MAS, *Marker Assited Selection*) (Landgridge y Chalmers, 1998; Koebner *et al.*, 2001; Koebner y Susmmers, 2002; 2003; Koebner, 2004). Otros usos incluyen la construcción de mapas moleculares, análisis de QTL, etiquetado genético, clonación basada en mapas, etc. (Jain *et al.*, 2002); todos ellos relacionados con la mejora genética vegetal.

La mayoría de estos marcadores, desarrollados y utilizados en el pasado, se han basado en ADN genómico (ADNg), y consecuentemente pueden proceder tanto de regiones transcritas como de regiones no transcritas del genoma (Gupta y Rustgi, 2004). Estos marcadores basados en ADN derivados de cualquier región del genoma han sido descritos también como marcadores de ADN aleatorios (RDMs, *Random DNA Markers*) y pueden ser generados miles de ellos, fenotípicamente neutros y aleatorios para cualquier especie (Andersen y Lübberrstedt, 2003; Shi *et al.*, 2006; Bagge *et al.*, 2007; Varshney *et al.*, 2007). Dentro de este conjunto de marcadores hay diferentes tipos, desde los marcadores aleatorios más básicos como RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNAs*), RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) o AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*; Vos *et al.*, 1995), SSAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*; Waugh *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1998), todos ellos adaptables a diferentes especies y empleados con éxito en muchos estudios de diversidad (Sunnucks, 2000; Cchen *et al.*, 2005; Gul *et al.*, 2007) o en obtención de mapas de ligamiento (Gardiner *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1991; Blas *et al.*, 2009). Sin embargo, el ligamiento genético entre un RDM específico y un alelo diana, establecido mediante estudio de QTL, por ejemplo puede romperse por recombinación genética: este hecho limita el uso de RDMs como herramientas de diagnóstico (Rafalski y Tingey, 1993).

A partir de clones de ADNc se pueden desarrollar sondas RFLP con el objetivo de diseñar marcadores cDNA-AFLP y aplicarlos a diversos estudios (Leymarie *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2010) o analizar librerías de ADNc en busca de inserciones de retrotransposones con el objetivo de diseñar marcadores que detecten la presencia o ausencia de una inserción específica; este es el caso de los RBIPs (*Retrotransposon-Based Insertional Polymorphisms*) que han sido empleados principalmente para estudios de diversidad en diferentes especies como en arroz (Vitte *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2009) o guisante (Flavell *et al.*, 1998; Smykal *et al.*, 2008; Jing *et al.*, 2010) o los IRAP (*Inter-Retrotransposons Amplified Polymorphisms*) (Kalendar y Schulman, 2006; Branoc *et al.*, 2007). De forma análoga, las bases de datos antes mencionadas pueden ser analizadas en busca de motivos microsatélites y sus secuencias flanqueantes para el diseño de SSRs (*Simple Sequence Repeats*) o de variaciones en un solo nucleótido, SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), con el objetivo de diseñar cebadores específicos de *locus*.

Los retrotransposones se encuentran de forma ubicua en los genomas de plantas (Flavell *et al.*, 1992), su número de copias y su localización son variables de forma que poseen un gran potencial como marcadores genéticos para el estudio del genoma vegetal y los análisis de biodiversidad (Pelsy 2007; Petit *et al.*, 2009). Por esta razón la simple inserción de un retrotransposón ha dado lugar a los marcadores denominados RBIP resultando ser altamente informativos en la genética de plantas; tanto para variabilidad genética como en el estudio de filogenias (Flavell *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998; Pearce *et al.*, 2000).

Los microsatélites o SSR están basados en patrones de repetición de dos a cuatro nucleótidos generalmente repartidos por todo el genoma de cualquier ser eucariota, de modo que las regiones flanqueantes a dichas repeticiones suelen ser únicas en el genoma permitiendo el diseño de cebadores específicos para cada especie. Son marcadores codominantes y altamente reproducibles, y generalmente su grado de polimorfismo aumenta con la longitud total del motivo microsatélite (Weber, 1990). Debido a que los microsatélites son muy variables pueden ofrecer información interesante y constituir una herramienta útil en la selección asistida por marcadores (Burstin, *et al.*, 2001; Tyrka *et al.*, 2008). Asimismo han sido empleados en la mejora vegetal a nivel de diversidad genética (Ma *et al.*, 2009), genética de poblaciones (Falahati-anbaran *et al.*, 2007) y en mapeo genético (Garvin *et al.*, 2010).

Sin embargo, más recientemente, se ha desplazado el interés hacia el desarrollo de marcadores moleculares basados en la región transcrita del genoma (GTMs, *Gene Targeted Markers*). La obtención de este tipo de marcadores es dependiente de una fase previa experimental y de una búsqueda *in silico* (Gupta y Rustgi, 2004). Este desarrollo ha sido posible, en primer lugar, gracias a la disponibilidad de un gran número de clones de ADN copia (ADNc) en diversos sistemas vegetales y que están disponibles *on line* en numerosas bases de datos, como es el caso de *Arabidopsis Information Resource* (<http://www.arabidopsis.org>) o la base de datos de *Medicago truncatula* (<http://www.medicago.org>). En segundo lugar, se han obtenido muchos de estos GTMs a partir de la acumulación de un elevado número de ESTs (Expressed Sequence Tags) en bases de datos también públicas como la perteneciente al *J. Craig Venter Institute* (<http://www.http://plantta.jcvi.org>), la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/)) o la disponible en *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk>).

Entre los GTMs destacan los marcadores del tipo STS (*Sequence-Tagged Sites*) empleados por ejemplo en mapeo (Gilpin *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 2003; Becerra *et al.*, 2011), en la localización de QTL asociados a diferentes rasgos (Nandi *et al.*, 1997; Su *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012), e incluso se han aplicado a MAS (Kuraparthi *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2011). Otros tipos de marcadores son los CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) y dCAPs (*Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) empleados principalmente en mapeo de QTL (Frery *et al.*, 2005; Reinprecht *et al.*, 2006; Truong *et al.*, 2012), aunque también hay ASP (*Allele-Specific Primers*), y Size entre otros, con sus

aplicaciones en mejora genética vegetal (Aubert *et al.*, 2006; Hirotsu *et al.*, 2010; Suharyanto y Shiraishi, 2011).

Los CAPS son fragmentos de ADN amplificados mediante PCR en base a cebadores de 20-25 pb, con una digestión posterior de los productos de PCR mediante enzimas de restricción. La variación en la secuencia del producto de amplificación que afecte a la diana de la enzima de restricción empleada genera un polimorfismo de longitud. Una alternativa a estos CAPS, ha sido diseñar un cebador modificado para crear un sitio de restricción a nivel de SNP para uno de los genotipos parentales a estudio (dCAPS). Los ASP se basan en PCR específicas de alelo bi-direccional (De'lye *et al.* (2006); son sistemas de amplificación basados en dos cebadores internos específicos de alelo correspondientes a la región polimórfica y dos cebadores externos a dicha región, obteniendo tres amplicones, dos específicos de genotipo y uno común a ambos parentales. Los marcadores tipos Size se basan en situaciones de inserción / delección (*indels*) presentes en regiones de ADN secuenciadas, los productos de PCR muestran polimorfismo de longitud. Por último, los STS son marcadores basados en ADN caracterizados por su producto de amplificación, debido a que proceden de secuencias clonadas de función conocida o ESTs.

Se han desarrollado numerosos proyectos basados en genómica estructural y funcional que han permitido el desarrollo sistemático de marcadores funcionales (FMs, *Functional Markers*), los cuáles derivan de regiones polimórficas dentro de genes causalmente afectados por la variación de rasgos fenotípicos. Este tipo de marcadores no sólo requiere el conocimiento de una secuencia sino que además se debe conocer su función; bien por estudios de asociación (IFMs: *Indirect Functional Markers*) o bien, por estudios en líneas isogénicas (DFMs: *Direct Functional Markers*). El desarrollo de estos marcadores es costoso, no obstante, poseen una elevada calidad (Andersen y Lübberstedt, 2003) y han sido aplicados en diferentes especies vegetales como *Arabidopsis* (Peng *et al.*, 1999), diferentes cereales (Ellis *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003) como el arroz (Yang *et al.*, 2003) y con aplicación en las diferentes fases de un plan de mejora, en estudios de diversidad (van Tieren *et al.*, 2002), en MAS (Lande y Thompson 1990), detección de QTL (Bost *et al.*, 2001) o para obtención de marcadores basados en genes análogos de resistencia (RGAs: *Resistance Gene Analogues*) (Chen *et al.*, 2002; 2003).

Al contrario que los RDMs, los GTMs y los FMs han sido definidos en base al nivel de caracterización funcional de los polimorfismos controlados por este tipo de marcadores (Andersen y Lübberstedt, 2003). Los RDMs derivan de sitios polimórficos al azar en el genoma, mientras que los GTM derivan de polimorfismos dentro de genes. Ambos, RDMs y GTMs, pueden desarrollarse independientemente de su relación con cualquier carácter fenotípico. Al contrario, los FMs derivan de sitios polimórficos dentro de genes causalmente involucrados en la variación fenotípica.

Entre las diferentes aplicaciones de los marcadores moleculares, ya se ha mencionado su utilidad en la obtención de mapas de ligamiento dentro de la tercera fase de un programa de mejora vegetal. No obstante, los marcadores moleculares han resultado también aplicables en el estudio del origen, la

evolución, la diversidad y el comportamiento de las especies vegetales, y por tanto, permiten desarrollar también la segunda fase de un plan de mejora genética.

La segunda fase de un programa de mejora vegetal tal y como se viene describiendo agrupa muchos conceptos diferentes, y gracias a la gran diversidad de diferentes tipos de marcadores moleculares, las diferentes aproximaciones envueltas en esta fase pueden ser analizadas gracias a estas herramientas. De este modo, los marcadores RBIP han resultado especialmente útiles en el estudio del origen y evolución de los materiales vegetales (Ellis *et al.*, 1998), los marcadores RAPDs, AFLPs, ISSR, etc. han permitido realizar numerosos estudios de diversidad (Nylon, 2004) y, los SSR han permitido discriminar variedades y cultivares (Gupta *et al.*, 2003) junto con diferentes GTMs. No obstante, los diferentes tipos de marcadores moleculares han sido aplicados en todas y cada una de las aproximaciones dentro de esta fase de la mejora, así como se han aplicado de forma conjunta, resultando altamente informativos.

Los marcadores moleculares, RDMs y GTMs, han permitido el estudio de la diversidad a partir de la variación en la secuencias de ADN, lo que ha facilitado (1) el entendimiento de la domesticación de especies cultivadas (White y Doebley, 1998), (2) la revisión de la historia de la mejora vegetal (Dubreil y Charcosset, 1999; Narvel *et al.*, 2000; Russel *et al.*, 2000), (3) la conservación de la diversidad genética mediante germoplasma y/o líneas cultivadas en varias especies (Prasad *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Métais *et al.*, 2002; Steiger *et al.*, 2002) y (4) la identificación de cultivares (Rongwen *et al.*, 1995; Russel *et al.*, 1997). Más recientemente, los marcadores moleculares ha sido utilizados para estudiar el efecto de los planes de mejora modernos sobre la diversidad genética en diferentes especies cultivadas (Russel *et al.* 2000; Lu y Bernardo, 2001; Soleimani *et al.*, 2002).

Por otra parte, los marcadores moleculares han sido empleados con éxito en otras fases de la mejora genética vegetal, mediante las aproximaciones de detección y localización de QTL, o su empleo en MAS, clonación basada en mapas, etiquetado genético, obtención de FM y RGAs, etc.

En resumen, los distintos tipos de marcadores moleculares han sido aplicados con éxito en todas las etapas de cualquier programa de mejora genética vegetal. No obstante, con el avance en el desarrollo de estos marcadores y el grado de éxito alcanzado por cada tipo se han ido seleccionando aquellos que más se ajustan a las necesidades de cada plan de mejora específico. En líneas generales, se pueden destacar los SSRs, los marcadores basados en retrotransposones y todos los marcadores del tipo GTMs.

2. El guisante

2. 1. Origen

El guisante se cultiva en Europa desde la Prehistoria, y su origen ha sido estudiado por diversos autores encontrando indicios cada vez más antiguos del inicio del cultivo de esta especie. Se han datado guisantes hallados en excavaciones en Hungría y Suiza de la Edad de Piedra (Fourmont, 1956), Gibault (1912) fechó en la Edad de Bronce (aproximadamente 2000 a.C.) guisantes encontrados en Francia, Smartt (1990) marcó como aparición del guisante entre 6000 y 7000 a.C. En 1994 Erskine *et al.* mencionan la presencia minoritaria de guisantes en Iraq (6750 a.C.) y su conversión a leguminosa prevalente durante el Neolítico (2800-5400 a.C.) en Erbabá (Turquía). Al resto de Europa se va extendiendo progresivamente comenzando por las regiones más templadas como es el caso de España en la Edad de Bronce (Makasheva, 1983), hasta otras regiones como Reino Unido a las cuales no llega hasta la Edad Media (Davies *et al.*, 1985). Con respecto a otras regiones del mundo, se cree que este cultivo no llega a China hasta el siglo I d.C. (Makasheva, 1983) y a América tras la llegada de europeos al continente.

Estos descubrimientos permiten postular hipótesis sobre el origen y expansión del cultivo del guisante, de manera que la domesticación comenzaría en la Edad de Piedra en Asia siendo el foco de origen discutido por varios autores que sitúan este hecho bien en la región Sureste de Asia, más concretamente en el Noroeste de India, Pakistán o Afganistán extendiéndose posteriormente a zonas templadas de Europa (Godorov, 1937; Kay, 1979; Makasheva, 1983), si bien, basándose en la diversidad genética, podrían existir cuatro centros de origen siendo éstos Asia Central, Oriente Próximo, Etiopía y el Mediterráneo (Gritton, 1980). No obstante, sin concretar el origen geográfico, se reconoce su primera expansión por regiones templadas de Europa y Asia para extenderse más tardíamente por regiones con otra climatología y otros continentes.

2. 2. Taxonomía

El guisante cultivado o *Pisum sativum* L. se sitúa dentro del género *Pisum*, el cual pertenece a la familia *Fabaceae*, y se encuentra dentro de la subfamilia *Papilionoidae* junto con géneros como *Lathyrus*, *Lens*, *Vavilovia* o *Vicia*.

La taxonomía interna del género *Pisum* ha sido muy discutida, tanto en lo referente al número de taxones dentro del género, como su rango dentro del mismo. Ya en la clasificación inicial realizada por Linnaeus (1753) se definen dos especies presentes en las clasificaciones actuales, *P. arvense* y *P. sativum*. Por otro lado, Boissier (1872) diferenció cuatro especies anuales dentro del género, tres de ellas se mantienen como diferentes taxones en la actualidad: *P. elatius*, *P. humile* y *P. fulvum*.

Durante la historia de la taxonomía, la clasificación de taxones se ha basado en la botánica ciñéndose las diferencias a caracteres morfológicos o geográficos. No es hasta 1973, con los trabajos realizados por Ben-Ze'ev y Zohari con cruzamientos entre taxones, cuando las relaciones entre taxones se clarifican, discerniendo entre los taxones especie y subespecie, de forma que tan sólo uno de los cruzamientos no era completamente fértil distinguiendo *P. fulvum* de los demás taxones, quedando el resto englobados dentro de la especie *P. sativum*. Esta clasificación se sitúa en la línea de los trabajos realizados previamente por Berger (1928) y los realizados posteriormente por Polhill y van der Maesen *et al.* (1985). A partir de estos resultados se acepta la clasificación realizada por Davis (1970) en la que se reconocen dos especies dentro del género, *P. fulvum* y *P. sativum*, incluyendo en esta última diversos taxones internos.

Sin embargo, la clasificación de Davis excluye taxones descritos fuera de Oriente Medio, este es el caso de *P. abyssinicum* A. Br., de origen etíope. Este taxón ha sido clasificado de diversas formas a lo largo de la historia (Fourmont, 1956, Kolz, 1971, Parzysz y Przybylska, 1984) siendo la tendencia de este taxón a quedarse como subespecie dentro de *P. sativum*.

Más recientemente, la incorporación de técnicas moleculares a las labores taxonómicas ha permitido estudiar la filogenia y la diversidad con otras herramientas, esta vez basadas en el genotipo, volviéndose a replantear la clasificación taxonómica del género *Pisum*. Sobre estas bases moleculares Ellis *et al.* (1998) y Pearce *et al.* (2000) estudiaron la domesticación de *P. abyssinicum* a partir de *P. sativum* y encontraron el punto de separación de ambos taxones hace más de 4000 años y demostraron que las diferencias entre ambos taxones se encuentran en el rango de las halladas entre *P. sativum* y *P. fulvum*. Estas diferencias entre *P. sativum* y *P. abyssinicum* se repiten en trabajos publicados por otros autores (Burstin *et al.*, 2001; Baranger *et al.*, 2004).

La taxonomía existente de los guisantes silvestres es confusa, lo que resulta de una gran diversificación de poblaciones locales, la cual, a su vez, es facilitada por la auto-polinización como el modo predominante de la reproducción de guisante, así que el intercambio de genes entre poblaciones es pequeño. Junto con un gran número variable de especies *Pisum sativum*, todos los autores reconocen como especie bien definida a *P. fulvum*, la cual está confinada en el Oriente Medio y está aislada a nivel reproductivo casi totalmente de *P. sativum*. Trabajos recientes también aíslan *P. abyssinicum* como *bona species*, representada por formas cultivadas y algunas silvestres de Yemen y Etiopía y difieren de *P. sativum sensu stricto* (s. str.) por reordenaciones cromosómicas al igual que por algunos caracteres morfológicos. Otros taxones considerados como especies en algún momento son en realidad representantes de *P. sativum* en *sensu lato*. Algunas de ellas son actualmente consideradas como subespecies, aunque el concepto de subespecie en el caso del guisante permanece impreciso (Kosterin y Bogdanova 2008).

Ellis *et al.* (1998) propusieron que el género *Pisum* incluyera tres grupos principales: *P. fulvum*, *P. abyssinicum*, como rama domesticada de origen etíope e independiente de *P. sativum*, y el resto de

subespecies de *P. sativum* entre las que se incluían *P. humile* y *P. elatius*, ambas consideradas como base de la domesticación de cultivares, y *P. sativum* subsp. *sativum*, con accesiones silvestres y cultivadas, entre las cuales hay distinciones morfológicas, con diferentes usos y que han sido seleccionadas (Smartt, 1990).

A otro nivel taxonómico, el guisante forrajero, de la anteriormente considerada subsp. *arvense*, muestra un crecimiento de aspecto arbustivo e indeterminado, y su cultivo está destinado a pienso animal fundamentalmente. El guisante verde, de la anteriormente considerada subsp. *hortense*, incluye varios tipos de guisantes empleados principalmente para consumo humano. El guisante para pienso, cosechado en forma de semilla seca para alimentación animal, fue seleccionado a partir del guisante verde en los años 70.

Tabla I.1. Clasificación taxonómica del género *Pisum* por Ambrose y Maxted (2000)

Especies	Subespecies	Variedades
<i>P. sativum</i> L.	<i>sativum</i>	<i>sativum</i>
		<i>arvense</i> (L.) Poiret
	<i>elatius</i> Bieb.Aschers. & Graebn.	<i>elatius</i>
		<i>brevipedunculatum</i> Davis & Meikle
		<i>pumilio</i> Meikle (<i>P. humile</i> Boissier & Noe)
<i>P. fulvum</i> . Sibth. & Sm.		
<i>P. abyssinicum</i> A. Br.		

En este trabajo se adoptará como clasificación taxonómica de referencia aquella publicada por Ambrose y Maxted en 2000 y que refleja la separación en tres especies dentro del género *Pisum* (Tabla I.1).

2. 3. Genética

La genética del guisante ha sido objeto de estudio durante mucho tiempo (Knight, 1799; Mendel, 1866), pero sorprendentemente tan sólo en la etapa más reciente se ha obtenido una idea coherente de la estructura general de su genoma (Ellis, 2001), tanto en términos de cariotipo como en la organización de los grupos de ligamiento genéticos (Ellis y Poyser, 2002).

Pisum sp posee un genoma, estable entre especies, de aproximadamente 4.172 Mbp (Greilhuber *et al.* 1994, Baranyi *et al.*, 1996) repartidos en siete pares de cromosomas (2n=14). Todos los infrataxones de la especie *P. sativum* son totalmente interfértiles y además son posibles los cruzamientos entre *P. sativum* y *P. abyssinicum*, y *P. sativum* y *P. fulvum*, sobre todo si en este último caso *P. sativum* es el parental femenino (BenZe'ev y Zohary, 1973).

El cariotipo de guisante se compone de 7 cromosomas. Cinco son acrocéntricos, 3, 4, 5, 6 y 7, de los cuales los cromosomas 4 y 7 muestran además constricciones secundarias correspondiendo al *cluster* de genes 45S ARNr. Hay 2 cromosomas submetacéntricos (1 y 2). Los cromosomas acrocéntricos son distinguibles en base a la longitud del brazo, el centrómero y la posición del organizador nuclear (Hall *et al.*, 1997a). Los dos cromosomas pequeños submetacéntricos han sido separados por algunos autores (Blixt 1958, Fuchs *et al.*, 1998) en base a su morfología única.

El tamaño del genoma nuclear de guisante, aproximadamente 4×10^9 bp, se estima que posee una variación por copia (c) del 20%. Parte de esta variación ha sido atribuida a variación inter (sub) específica (Baranyi *et al.*, 1996). El porcentaje de GC es del 37,7%, pero en común con otros eucariotas este contenido GC varía y parece distribuirse en regiones relativamente grandes de composición base similar (Salinas *et al.*, 1988). El genoma de guisante está compuesto principalmente de secuencias repetidas dispersas de elevado número de copias. Los estudios de desnaturalización por temperatura han mostrado que estas repeticiones pertenecen a clases de secuencias muy diversas (Murray y Thompson, 1982).

2. 4. Biología y ecología

El guisante es una especie herbácea, anual y muestra un elevado nivel de autogamia, no obstante *Xylocopa* sp y *Megachile* sp pueden posarse sobre las flores y favorecer la formación de híbridos naturales. Las plantas de guisante muestran un crecimiento indeterminado. Los primeros nudos, los cuales pueden tener ramificaciones, son vegetativos, mientras que los siguientes nudos son reproductivos. La formación de nudos es regular durante todo su ciclo de crecimiento. Durante la etapa de floración se forman flores de modo secuencial en los nudos reproductivos obteniendo como media, y siempre dependiente de caracteres ambientales y genéticos, 10 o 12 pisos florales.

Las hojas del guisante son compuestas. Desde la unión con el tallo se distinguen dos estípulas, un peciolo con un par de folíolos como mínimo y rematado en un zarcillo simple o compuesto. El sistema radicular suele estar compuesto por una raíz principal de hasta 1,2 metros y raíces laterales de primer y segundo orden que se extienden regularmente a lo largo de la raíz principal. Las inflorescencias son axilares y los pedúnculos están compuestos por una o dos flores, aunque en las colecciones de germoplasma existe gran variabilidad, llegando hasta once flores por pedúnculo descritas (Makasheva, 1983). Las flores son hermafroditas, presentan cinco sépalos unidos, cinco pétalos y diez estambres soldados en dos grupos: androceo diadelfo, el carpelo puede contener hasta 12 óvulos. El fruto es una vaina con un número de semillas variable.

Hay que tener en cuenta que existe gran variabilidad dentro de cada uno de los caracteres morfológicos del guisante existiendo líneas áfilas, con tallos profusamente ramificados, diferente longitud de tallo, flores blancas o moradas, vainas dehiscentes y diversos variantes en tamaño, forma y color de la semilla.

El cultivo del guisante conlleva unos condicionantes en lo referente a las características del suelo prefiriendo suelos de textura media o ligera, bien drenados y frescos, con un pH situado entre 5,5 y 8 (Martin, 1990), y con bajo contenido en caliza activa para evitar problemas de clorosis (Guerrero, 1999).

Con respecto a condiciones climáticas el guisante requiere temperaturas frías, un clima relativamente húmedo y se desarrollan óptimamente a elevada altitud en zonas tropicales con temperaturas entre 7 y 30°C (Duke, 1981; Davies, 1985). Si se considera como cultivo anual de invierno, el guisante tolera de forma general heladas de hasta -2°C en estado de semilla, y en estado de desarrollo vegetativo puede soportar hasta -6°C. Las variedades de guisante consideradas resistentes al frío soportan hasta -10°C, y si están protegidas por una capa de nieve su tolerancia puede incrementarse hasta -40°C (Slinkard *et al.*, 1994). La temperatura óptima para las etapas vegetativa y reproductiva del guisante sería entre 16°C y 21°C durante el día y entre 10°C y 16°C durante la noche (Slinkard *et al.*, 1994).

En función de los diferentes condicionantes climáticos de cada región se disponen en la actualidad un número elevado de variedades adaptadas a diferentes necesidades (productividad, calidad, tolerancia o resistencia a diferentes estreses bióticos o abióticos, etc.) lo que permite la extensión del cultivo a nuevas regiones o mejorar su rendimiento. Con respecto a la tolerancia al frío se distinguen variedades de primavera y variedades de invierno, siendo estas últimas más flexibles permitiendo su siembra también en primavera y con una mayor producción (Ramos 1996; Laguna *et al.*, 1997; Caminero, 2002).

2. 5. Importancia del guisante como cultivo

Principales usos

Según la clasificación tradicional de las leguminosas (Nadal *et al.*, 2004), existen seis grandes grupos de leguminosas grano en función de su destino final: (1) consumo humano o alimentación animal, (2) oleaginosas, (3) forrajeras, (4) hortícolas, (5) destinadas a abono verde o cubierta vegetal y, (6) ornamentales. En base a esta clasificación el guisante es una leguminosa grano con varios usos siendo los principales el consumo animal y como planta forrajera. No obstante, el guisante posee otros usos que, aunque minoritarios, no se encuentran englobados en esta clasificación; es el caso de su uso actual en la fabricación de plásticos biodegradables, adhesivos o en la industria del papel a través del almidón obtenido de esta planta (Slinkard, 1997). Otra aplicación no mencionada en la clasificación y que ha sido utilizada tradicionalmente hasta la actualidad es el uso del guisante con fines medicinales (Duke, 1981).

Dentro de la clasificación antes mencionada se encuentra el uso menos conocido y difundido del guisante; como planta ornamental, en este sentido cabe reseñar un tipo de guisante ornamental y perenne designado por Makasheva (1983) como *P. formosum* que crece en zonas alpinas y subalpinas del Cáucaso, Irán y regiones de Asia Menor y que actualmente está clasificada como *Vavilovia formosa* (Mikic *et al.*, 2009).

La paja del guisante, refiriéndose a tallos y hojas restantes tras la cosecha, es destinada a la cabaña ovina y vacuna en países europeos como Francia. El valor nutritivo de la paja del guisante es cercano al del heno tardío de otras leguminosas y netamente superior al de la paja del trigo aunque esto es variable (Carroëe y Lesouder, 1992). En cualquier caso, la paja de este guisante forrajero posee un buen valor nutritivo y podría ser consumida por ovino y vacuno, rumiantes con bajas necesidades, a condición de que sea recogida y conservada en buenas condiciones (Carroëe y Lesouder, 1992).

Dentro del género *Pisum*, la especie *P. sativum* es la más cultivada y extendida, ya que *P. fulvum* y *P. abyssinicum* son silvestres, aunque esta última también se ha cultivado en determinadas regiones de Etiopía. Asimismo, *P. sativum* subsp. *elatius* engloba tres variedades todas ellas consideradas silvestres (Maxted y Ambrose, 2000).

Según el Catálogo Europeo de Variedades Vegetales, la especie *P. sativum* se subdivide en dos tipos de guisante: (1) guisante verde o “*garden pea*” haciendo referencia a aquellos guisantes cultivados fundamentalmente para el consumo humano y, (2) guisante seco o “*field pea*” incluyéndose en este grupo los destinados al ganado y que tradicionalmente han sido usados también como abono verde.

La semilla de los guisantes constituye un importante componente de la dieta humana en muchas partes del mundo como en regiones templadas de Norteamérica, Rusia, Europa, India y regiones menos extendidas con clima subtropical (Roy Davies, 1995). En algunas partes de Asia y África también se consumen las hojas verdes de los guisantes (Kay, 1979).

Otros usos del guisante vinculados a la alimentación humana pero menos conocidos son por ejemplo su uso en seco, por su alto contenido en almidón, para la elaboración de productos dietéticos, la fabricación de pastas o, incluso como aperitivos. También la testa es incluida en la fabricación de pan con alto contenido en fibra (Slinkard, 1997).

No obstante la producción de guisante verde es minoritaria y no es comparable a la producción de guisante seco cuyo destino final es el consumo animal.

El consumo animal es el principal uso del guisante como cultivo. En este sentido existen muchos trabajos que exponen los beneficios de incorporar el guisante proteaginoso en la alimentación de aves de granja como gallinas, pollos o pavos (Hickling, 1997), de ganado porcino (Racz y Bell; 1997; Martins, 2004; Stein, 2007), de ganado vacuno (Corbett, 1997; Lardy *et al.*, 2009) o incluso en acuicultura (MaCallum *et al.*, 2000; Booth *et al.*, 2001), estando ya establecida su incorporación a piensos para animales monogástricos en varios países, como es el caso de Francia.

El guisante, como cultivo de leguminosa de invierno importante, constituye una fuente de proteína en la alimentación animal y humana y resulta beneficioso en el sistema de cultivos (Hauggard-Nielsen y Andersen, 2000; Nemecek *et al.*, 2008). Por estas razones, el guisante está destinado a jugar un papel

central en la agricultura sostenible. El desarrollo de este cultivo requiere de variedades con rendimientos más elevados y estables (Deuvot *et al.*, 2010).

Necesidad de proteína. Ventajas del guisante

Existen varios motivos por los cuáles el cultivo del guisante es importante a nivel mundial, europeo y más concretamente español; en primer lugar posee interés dentro del contexto de agricultura sostenible y más acorde con la conservación del medio ambiente, y además tiene un reconocido efecto beneficioso sobre el cereal posterior en los cultivos rotacionales que lo incluyen. En segundo lugar el incremento en la necesidades de proteína vegetal en la formulación de piensos para alimentación animal disminuyendo en éstos la proteína de origen animal. Este último motivo crea a su vez un déficit en producción de proteína vegetal de la Unión Europea y de España en particular teniendo que recurrir a su importación.

El cultivo de guisante seco tiene como principales ventajas un sistema de agricultura sostenible debido a sus bajo requerimientos en agua, elementos químicos y energía fósil; habilidad para fijar a través de simbiosis el nitrógeno atmosférico el cual evita el empleo de fertilizantes nitrogenados; y emisiones reducidas de N₂O, NO_x y CH₄, lo cual en edición al ahorro en CO₂, reduce significativamente el efecto invernadero de las actividades agrícolas (Munier-Jolain y Carroue, 2003; Bozoglu *et al.*, 2007).

Varios autores (Lafarga *et al.*, 2005; Casta *et al.*, 2005) demuestran que la inclusión de leguminosas en la rotación cerealista mantiene o, incluso incrementa el beneficio económico. No obstante, se debe añadir que no sólo puede existir beneficio económico bruto sino además hay que resaltar que la inclusión de una leguminosa en este tipo de rotaciones tiene otros beneficios como son la reducción en el uso de fitosanitarios en el cultivo cereal posterior, la parada en el ciclo de algunas plagas o el impedimento en el desarrollo de algunas enfermedades de cuello y raíz de los cereales, sin contar la reducción en el tiempo invertido para el trabajo de campo. En concreto, el guisante permite el uso de aperos más económicos sin disminuir los rendimientos de los cultivos posteriores debido a la mejora de la estructura del suelo debida a su sistema radicular. Disminuye la necesidad de fertilizante nitrogenado y además, al ejercer un mejor control de mocotiledóneas adventicias, permite la utilización de herbicidas menos específicos o reducir su uso, lo que implica también un menor coste.

El guisante es valorado fundamentalmente por la calidad nutricional de su semilla – la proteína del guisante es baja en aminoácidos sulfurados, cisteína y metionina, pero rica en lisina, a diferencia de los cereales, y otros aminoácidos esenciales (Christou, 1994). Además el contenido en proteína en el guisante seco es relativamente elevado (20-26% de la materia seca), lo cual hace del guisante un buen candidato para favorecer el auto-abastecimiento europeo de pienso animal (Bourion *et al.*, 2002).

Las semillas de guisante constituyen una alternativa a la soja como pienso rico en proteínas, siendo su destino principal (Fondevilla *et al.*, 2011b). Asimismo, como leguminosa, proporciona numerosos

beneficios ambientales que pueden contribuir a una agricultura sostenible al ser capaces de fija nitrógeno atmosférico de forma simbiótica, proporcionar fertilidad al suelo y reducir la necesidad de fertilizantes nitrogenados (Köpje y Nemecek, 2010; Dumont *et al.*, 2011). Europa posee un déficit de proteína vegetal que históricamente solventaba con la importación de ésta principalmente en forma de soja, el porcentaje de importación era aproximadamente del 30% como media pero había países, como España, que dependían de hasta un 90% de la importación de soja para cubrir las necesidades de su cabaña ganadera. En 1994, la Unión Europea creó un plan estratégico de ayudas para disminuir las necesidades de importación y favorecer el auto-abastecimiento de proteína vegetal, este plan incluía la ayuda para el cultivo de leguminosas grano, entre ellas el guisante. En la actualidad, el guisante es la leguminosa más frecuente en España y Europa, y la cuarta a nivel mundial (FAOSTAT, 2011) y aunque Europa continúa importando la mayoría de la proteína requerida para el pienso animal, la producción de guisante ha aumentado. Este hecho provoca, no sólo, un aumento en la superficie cultivada, sino un creciente interés por este cultivo y sus propiedades. Esta creciente demanda de materia prima rica en proteína para la alimentación animal o productos intermediarios para la nutrición humana ha conducido al interés cada vez mayor por el cultivo del guisante como fuente de proteína (Santalla *et al.*, 2001; Tar'an *et al.*, 2005; Rubiales *et al.*, 2011).

Los mejoradores están interesados en un incremento del rendimiento a través de un incremento en la producción de biomasa y/o una extensión del área de producción. Ambos de estos objetivos pueden ser alcanzados mediante la disponibilidad de guisantes resistentes a los rigores invernales. El aumento de la biomasa, al igual que un mayor número de semillas, puede ser logrado de forma natural mediante la siembra en otoño y con el resultante periodo de crecimiento mayor hasta el estado de floración. Pero para lograr este objetivo, los guisantes deben resistir los diferentes estrese invernales entre los cuales la congelación es particularmente importante (Bozoglu *et al.*, 2007).

Producción y rendimiento

El guisante seco es uno de los cultivos más extendidos en el mundo, dentro de las leguminosas, se sitúa en producción mundial en cuarto lugar con más de 6.000.000 Ha cultivadas en 2011, es la tercera leguminosa con mayor producción mundial, aproximadamente 10.000.000 toneladas y el cultivo con un rendimiento a nivel mundial, de 1,6 toneladas por hectárea en 2011, según datos de la FAO (FAOSTAT, 2011). La mayor parte del área de siembra y la producción están concentradas en países desarrollados.

En Europa es la leguminosa más importante en área cultivada y producción, y en rendimiento sólo fue superado por la soja en 2011 (3,0 t/Ha de la soja frente a 2,1 t/Ha del guisante, FAOSTAT, 2011).

En relación al cultivo de leguminosas en España, el guisante está a la cabeza en extensión cultivada (200.000 Ha) y en producción (194.200 t). Sin embargo, su rendimiento, 1,0 t/Ha en 2010, es superado por el obtenido por la soja (2,4 t/Ha).

En relación a otros cultivos destinados a pienso animal como fuente de proteína, es superado en todos los parámetros mencionados (área de cultivo, producción y rendimiento) por la soja. Al comparar los rendimientos de ambos cultivos a lo largo del tiempo, se comprueba que la soja ha aumentado considerablemente su rendimiento en los últimos 50 años, desde 1,1 t/Ha en 1961 a 2,6 t/Ha en 2010 a nivel mundial. A nivel europeo, el incremento en el rendimiento de la soja ha sido más acentuado, pasando de obtener 0,5 t/Ha en 1961 a 1,7 t/Ha en 2010, lo que implica haber triplicado el rendimiento de este cultivo en Europa.

El guisante, también ha visto mejorado su rendimiento a lo largo de estos 50 años según datos de la FAO (FAOSTAT, 2011), pasando de obtener a nivel mundial casi 1 t/Ha en 1961, a 1,6 t/Ha en 2011, lo que implica una mejora considerable en el rendimiento del guisante, aunque no tan marcada como en el caso de la soja. En Europa, se ha conseguido duplicar el rendimiento desde 1,1 t/Ha a 2,1 t/Ha. Sin embargo, en España el rendimiento del guisante apenas ha aumentado en este medio siglo (desde 0,8 t/Ha a 1 t/Ha), esta falta de incremento del rendimiento en el cultivo del guisante, a pesar de haber mencionado su importancia en España, es aún más crítico al comparar los rendimientos en soja dentro de España, ya que sólo se cultiva desde hace 40 años y se ha pasado de 1,5 t/Ha a 2,4 t/Ha.

La diferencia en el aumento del rendimiento de ambos cultivos puede analizarse desde el punto de vista del interés recabado por ambos cultivos. Desde el punto de vista agronómico la soja ha obtenido un creciente interés en los últimos años, de forma que se ha integrado en diferentes programas de mejora, ha sido estudiada e investigada con mucho más detalle por la comunidad científica e incluso se han hecho avances significativos en su mejora, siendo el ejemplo más destacado, las primeras plantas de tomate y tabaco resistentes a virus obtenidas mediante ingeniería genética en 1986. De forma comparativa, una búsqueda básica en la base de datos PubMed del NCBI refleja las diferencias en los esfuerzos realizados por la comunidad investigadores sobre ambos cultivos a lo largo del tiempo, de forma que el término *soybean* como título obtiene un total de 8337 entradas, mientras que el término *pea* dentro del título obtiene menos de la mitad, 3668 entradas. Desde este punto de vista, se puede postular que los esfuerzos realizados por los mejoradores han tenido su repercusión a nivel de rendimientos de ambos cultivos, y que un mayor esfuerzo en los programas de mejora permite obtener mejores rendimientos.

2. 6. Problemática del cultivo del guisante

Problemática del rendimiento

Existe una gran diversidad genética en cuanto al número de ramificaciones, vainas, semillas por vaina, peso de mil semillas, área foliar o altura de la planta que unida al crecimiento indeterminado de la planta del guisante hacen de este cultivo muy variable en cuanto a rendimiento. Esta variabilidad además se ve afectada por factores ambientales que aún complican más la mejora del rendimiento de este cultivo. Por

estas razones parece claro que a la hora de seleccionar las líneas a utilizar se debe tener claro el destino final y, fundamentalmente, las condiciones ambientales de la región de cultivo.

Cousin *et al.* (1985) ya encontraron correlaciones positivas, pero con bajos coeficientes de correlación, entre el rendimiento y caracteres como el vigor de la semilla y el índice de cosecha, mientras que factores como la altura, el área foliar, el número de semillas por vaina, el número de vainas o el número de semillas parecían correlacionarse negativamente con el rendimiento. A partir de estos resultados parece ser favorable un menor crecimiento vegetativo y un mayor número de ramificaciones con menor área foliar. En resumen, para incrementar el rendimiento hay que reducir la biomasa (Cousin, 1997).

Hasta el momento sólo se ha hablado de rendimiento en cuanto a un fin claro, la productividad final en semilla, sin embargo hay otros factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar una variedad u otra; por ejemplo su resistencia a factores bióticos o su tolerancia a estreses abióticos. Este tipo de factores podrán llegar a ser más decisivos en zonas afectadas por dichos estreses en las que líneas altamente productivas puedan verse perjudicadas por estos factores provocando una disminución en su rendimiento final.

Adelanto de fecha para mejorar el rendimiento

Estudios realizados en varias leguminosas han demostrado que la siembra otoño-invernal favorece el rendimiento, como por ejemplo en la lenteja, que puede ver incrementado su rendimiento por encima del 50% (Sakar *et al.*, 1988), o el garbanzo en que el aumento en el rendimiento variaba dependiendo de la primavera posterior, de forma que ante una primavera seca se incrementaba el rendimiento en un 26% o, tras una primavera seca aumentaba hasta un 330% (Iliadis, 1998). Al mismo tiempo que se han ido seleccionando líneas tolerantes al frío se ha ido estudiando el control de esa tolerancia, de forma que en lenteja se observó que es controlado por varios genes (Kahraman *et al.*, 2003), o en garbanzo hay como mínimo cinco genes de tolerancia como forma dominante sobre susceptibilidad (Malhotra y Singh, 1990). La tolerancia al frío en guisante ha sido estudiada por diversos autores, desde hace más de 30 años, encontrando un control ejercido por genes dominantes (Cousin *et al.*, 1985) y por genes aditivos (Auld *et al.*, 1983).

Sin embargo, la mayoría de las variedades de guisante son sembradas en primavera y sus rendimientos son muy variables, siendo altamente dependientes de la temperatura y el agua disponible al final de su ciclo de crecimiento. Al igual que en otros cultivos clave como el trigo, la cebada o la colza, la siembra realizada en otoños o invierno puede permitir obtener mejores resultados. Las variedades de guisante de siembra otoño-invernal pueden alcanzar rendimientos mayores y más estables que las variedades de primavera: poseen un ciclo de crecimiento más largo el cual puede permitirles producir mayor biomasa y mayor rendimiento de semillas; además pueden entrar en el período de floración antes y así evitar estreses debidos a altas temperaturas y baja disponibilidad de agua, estreses que suelen aparecer en la primavera tardía.

En Francia, Cousin (1976) ya expuso la posibilidad de sembrar en otoño variedades de guisante tolerantes al frío y cuyo rendimiento superaba hasta en un 40% al obtenido por las variedades sembradas en primavera. Singh *et al.* (1996) encontraron mejores rendimientos, 23-272%, al adelantar la siembra al otoño en ensayos realizados en India. En Reino Unido, a partir de 1996, se empieza a incorporar la siembra otoño-invernal del guisante en las rotaciones cerealistas pero en muy baja proporción. En España, Portugal e Italia se observó un gran potencial con el adelanto en la fecha de siembra (Dordio, 1997; Abbate *et al.*, 1997; Ramos, 1996). En concreto, en España se ha detectaron máximos rendimientos, alcanzando capacidad competitiva frente a la cebada, en condiciones de adelanto de fecha de siembra (Caminero, 2002).

A pesar de todo, la siembra otoño-invernal es sólo posible si las variedades son resistentes al frío, es decir, variedades que puedan pasar el invierno sin daño o con daños leves. Aunque la dureza invernal ha sido seleccionada en la mejora del guisante durante 30 años, las variedades de invierno de guisante aún suelen sufrir daños por heladas y/o enfermedades foliares que limitan su aprovechamiento. La siembra otoño-invernal favorece la productividad de gran número de cultivos, entre ellos el guisante, pero este aumento en la productividad puede verse afectado negativamente debido al sometimiento de las plantas a bajas temperaturas y otros estreses asociados con las condiciones climáticas invernales. En nuestra región este efecto negativo puede llegar a traducirse no sólo en la disminución de la productividad antes mencionada sino llegando a perderse la cosecha totalmente, esto puede deberse al efecto de las bajas temperaturas sobre la germinación, la floración o incluso sobre la integridad física de la planta lo cual puede favorecer una mayor afeción por bacteriosis y otros estreses de carácter biótico; todas estas consecuencias derivan principalmente del efecto principal de las bajas temperaturas sobre la planta; la formación de hielo intra o extracelular.

Asimismo, se han detectado problemas asociados a la siembra invernal como el encamado (Dordio, 1997), la aparición de plantas parásitas como *Orobanche crenata* (Rubiales *et al.*, 1998; Abbate *et al.*, 1997) o bacteriosis (*Pseudomonas syringae*) (Biddle, 2001; Lawyer y Chun, 2001; Fondevilla *et al.*, 2011b; Martín-Sanz *et al.*, 2013) que si bien pueden aparecer con la siembra de primavera se ven potenciados con el adelanto en la fecha de siembra.

La dureza invernal como estrés abiótico

La siembra en otoño permite potenciar la productividad en un número importante de especies cultivadas. Sin embargo, están limitadas por bajas temperaturas junto con otros estreses asociados con las condiciones climáticas invernales. El estrés por frío es un factor importante en la agricultura debido a que el rendimiento y la biomasa varían ampliamente y con frecuencia con las condiciones térmicas. Las plantas que soportan el invierno han desarrollado respuestas adaptativas a los cambios estacionales. Primero, “sienten” la llegada del invierno a través de la percepción de señales ambientales, las cuales son

principalmente temperatura y longitud del día. Entonces, se adaptan a nivel de desarrollo y fisiológico, utilizando estrategias complementarias: escapar a la congelación y/o tolerancia a heladas alcanzada a través de una aclimatación al frío previa. En algunas plantas, como algunos cereales, la vernalización corresponde con una estrategia de escape a la congelación, debido a que retrasa la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva, siendo esta última fase la más sensible a congelación (Fowler *et al.*, 2001). Depende de cambios metabólicos que derivan en la adaptación vegetal. Asociado con este retraso en el inicio de la floración se adquiere bajo temperaturas bajas una tolerancia a la congelación y una refrigeración progresiva. Esta respuesta de aclimatación al frío también conduce a mejorar la tolerancia a otros estrés del invierno como encamado por congelación, ciclos de congelación/descongelación, encharcamiento, deshidratación por viento, fotoinhibición y enfermedades como *Mycosphaarella pinodes* uno de los patógenos más dañinos en condiciones frías y húmedas (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008), destacando la bacteriosis como principal problema en nuestra región (Fondevilla *et al.*, 2011b; Martín-Sanz *et al.*, 2013). La dureza invernal integra las respuestas interactivas a todo el conjunto de estreses invernales y puede ser evaluada en condiciones de campo solamente. La individualización de respuestas a estreses particulares, como puede ser la tolerancia a heladas, puede ser realizada en condiciones controladas.

El desarrollo de herramientas moleculares ha permitido progresar significativamente hacia el entendimiento de la dureza invernal, el escape a congelación y la tolerancia a heladas. La identificación de regiones que controlan la dureza invernal ha sido completada para las principales especies cultivadas a través del establecimiento de poblaciones de mapeo en condiciones de campo y mapeo de QTL (en cereales: Pan *et al.*, 1994; Böner *et al.*, 2002; Francia *et al.*, 2004, colza: Teutonico *et al.*, 1995; y leguminosas: Kahraman *et al.*, 2004). En paralelo, las bases moleculares de la tolerancia a la congelación han sido extensamente estudiadas, particularmente en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, permitiendo un progreso continuo en el entendimiento de las rutas de señales para aclimatación al frío y la identificación de numerosos genes de respuesta al frío. El mapeo de QTL también ha permitido comprobar la relación genética entre la fenología de la planta controlada por genes de desarrollo y la expresión de dureza invernal o tolerancia a la congelación. En cebada, se ha detectado la coincidencia entre un QTL asociado a la dureza invernal y el gen de vernalización VRN1 (Francia *et al.*, 2004). En trigo, se ha encontrado un ligamiento genético entre el *locus* Vnr1 y un gen principal (Galiba *et al.*, 1995) o un QTL (Toth *et al.*, 2003) gobernando la tolerancia a la congelación. Más allá de estos resultados de mapeo, también se ha mostrado, en cereales, que el requisito de vernalización y los genes de respuesta al fotoperiodo regulan la duración de la expresión de genes de respuesta al frío mediante el control de la fecha de cambio de la fase vegetativa a la reproductiva (Fowler *et al.*, 1996; 2001; Mahfoozi *et al.*, 2001).

Tolerancia a las heladas y la aclimatación al frío en guisante

La tolerancia a heladas constituye la principal estrategia por la cual las plantas resisten a las heladas. Esta tolerancia conlleva mecanismos los cuales primeramente evitan la formación de hielo en las células induciendo la congelación extracelular (Levitt, 1980), lo que permite a la célula (1) sobrevivir al estrés hídrico resultante de la congelación extracelular (Levitt, 1980) y (2) resistir los estreses mecánicos sobre la membrana plasmática durante el proceso alternante de congelación/descongelación (Steponkus, 1978). Entre los mecanismos asociados a esta estrategia se hallan el impedimento, cuyo fundamento es la reducción o evasión de la formación de hielo intracelular (Wery *et al.*, 1993), y la tolerancia definida como la capacidad de la planta de soportar la formación de hielo tanto extra como intracelular mediante mecanismos de estabilización de membrana. Estos mecanismos de tolerancia a heladas en plantas solo pueden desarrollarse si la helada viene precedida por un período de temperaturas relativamente bajas pero no hasta el punto de congelación. La temperatura limitante exacta por encima de la cual no se produce la aclimatación es difícil de determinar y varía dependiendo de la especie y probablemente de la variedad (Levitt, 1980). Algunas especies pueden tolerar temperaturas negativas si han sido previamente expuestas durante unos pocos días a temperaturas bajas pero con valores positivos. Esta habilidad es conocida como aclimatación al frío (Levitt, 1980). Para muchas plantas (menta, berza, álamo, colza, etc.) se ha hallado endurecimiento tras crecer a temperaturas inferiores a 12°C (Levitt 1980; Dereuddre y Gazeau 1990). No obstante, una temperatura de entre 0 y 5°C induce un mayor endurecimiento que 12°C (Levitt, 1980) y se ha observado aclimatación al frío tras un par de días a 2°C en guisante (Weiser *et al* 1990).

Esta aclimatación al frío llevada a cabo por las plantas tolerantes a heladas conlleva en general el mantenimiento de temperaturas entre 4°C y 10°C durante un período de tiempo mínimo, siendo habitualmente de carácter reversible, que provoca una serie de reacciones en la planta que facilitan su tolerancia no sólo a las bajas temperaturas sino también a otros estreses invernales como los ciclos de congelación - descongelación, anegamiento, deshidratación por viento, fotoinhibición o incluso bacteriosis (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que las plantas que sobreviven al invierno han desarrollado respuestas adaptativas a los cambios climáticos estacionales, en este sentido las plantas ante factores como el descenso de la temperatura y el cambio del fotoperíodo se preparan para soportar el estrés invernal. El modo en que las plantas pueden llegar a sobrellevar este tipo de estrés se produce a nivel fisiológico y del desarrollo, y las estrategias llevadas a cabo por la planta resultan complementarias; la escapada a la helada y la aclimatación al frío. La escapada a la helada conlleva el retraso en la transición del estado vegetativo al reproductivo, ya que durante la fase reproductiva la planta es más sensible a cualquier estrés y tiene efecto directo sobre la productividad del cultivo.

Debido a la existencia de estas estrategias que engloban a su vez diferentes procesos que confluyen en la tolerancia a frío entendida como un estrés complejo, es fácilmente comprensible que la primera característica que defina esta tolerancia sea la de ser un carácter cuantitativo cuyo rango de variabilidad es amplio; esto implica a la vez la acción de genes cuantitativos así como la acción sinérgica de varios genes o incluso familias génicas lo cual complica su estudio y la selección de líneas tolerantes a heladas que sean agrónomicamente competitivas y adaptadas a cada región. La suma de todos estos factores resulta en una falta de conocimiento de los genes directamente implicados en la tolerancia a frío y su efecto real.

En leguminosas, la naturaleza de la relación entre la dureza invernal, la tolerancia a heladas y los genes de desarrollo han debe ser elucidada. El guisante está particularmente adaptado a este objetivo. La variación genética para la dureza invernal en guisante ha sido determinada (Auld *et al.*, 1983; Cousin *et al.*, 1985; Liesenfeld *et al.*, 1986).

La presencia de un mapa de ligamiento suficientemente saturado ha ayudado a profundizar en este conocimiento favoreciendo la presencia de diversos QTL y el anclaje de genes implicados aunque todo ello en fases iniciales o con escaso conocimiento de su función real. Para llegar a comprender mejor este proceso de tolerancia se necesitan incluir nuevas metodologías y técnicas que permitan determinar los genes relacionados y su implicación a lo largo de los procesos que conllevan las estrategias de tolerancia. El desarrollo de nuevas herramientas moleculares permite un progreso significativo en el entendimiento de la dureza invernal, la aclimatación al frío o la tolerancia a heladas. Estas técnicas y metodologías son, entre otras, las que conllevan el estudio de ARNm como paso intermedio entre el DNA, de información constante, y la traducción a proteínas como último paso en la cascada de expresión tras un estímulo como es el sometimiento a bajas temperaturas. El estudio del ARNm bajo condiciones estresantes permite conocer los genes que realmente se están expresando bajo ese estímulo eliminando gran parte del genoma de la planta. Los primeros pasos, realizados en el estudio de la respuesta a bajas temperaturas por el guisante, son los realizados mediante técnicas Northern Blot (Weiser *et al.*, 1990; Cheng-Che *et al.*, 1998). Mediante estudios de transcriptómica, reducción de la información para que sea más manejable no se limita a los genes que se están expresando en un momento determinado sino que además, mediante un correcto diseño experimental y un análisis discriminatorio preciso, permite eliminar aquellos genes que se expresen de forma constitutiva en la planta. Por tanto esta técnica ayuda a focalizar los esfuerzos sobre los genes realmente relacionados con el estrés estudiado y abre las puertas a un nuevo campo de trabajo que engloba tanto el conocimiento de los genes implicados en la tolerancia a frío como su situación en el mapa consenso e incluso su patrón de expresión a lo largo del tiempo y de diferentes condiciones de temperatura.

Este nuevo enfoque necesita de metodologías ya asentadas como en la saturación del mapa de ligamiento mediante nuevos marcadores como los definidos por Aubert *et al.* (2006) ya que en base a este mapa se anclarán eQTL o en el diseño de marcadores polimórficos en base a la secuencia de los genes

obtenidos. Pero también necesita de metodologías un poco más actuales como la realización de ensayos de cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR) que permitan el estudio de los patrones de expresión de cada gen en plantas sometidas a diferentes niveles de estrés y tiempo lo que conlleve a un mejor entendimiento de lo que favorece a la planta para alcanzar los diferentes niveles de tolerancia a las heladas.

En el caso de un estrés abiótico como el de las heladas, de herencia tan compleja como ya se ha comentado, este camino necesita ser recorrido en ambos sentidos; la saturación del mapa y la localización de QTL. El objetivo de detectar marcadores ligados a tolerancia a heladas, susceptibles de ser utilizados en mejora, es factible, puesto que existen antecedentes suficientes en otros cultivos en los que se ha o se está consiguiendo. Un ejemplo, en un cultivo también de leguminosa, Muehlbauer *et al.* (2004) reportan 10 marcadores con uso potencial en mejora asociados a dos QTL que confieren tolerancia a la dureza invernal en lenteja.

Para el trigo de invierno, Baga *et al.*, (2007) han descrito un QTL para la tolerancia a bajas temperaturas, localizado próximo al *locus vrn-A1* (vernalización) y a dos genes CBF (factores de transcripción *C-repeat binding*) dentro de intervalos de confianza. Estos genes son expresados durante la aclimatación al frío (Thomasshow, 1999). Algunos de los caracteres citados frecuentemente por su reacción con el proceso de aclimatación al frío, son la acumulación de azúcares (Castonguay *et al.*, 1995), la modificación de la composición de la membrana plasmática (Uemura *et al.*, 1995) en prevención de la salida de electrolitos (Dexter *et al.*, 1932), y un incremento en la actividad RuBisCO (Holaday *et al.*, 1992).

Todas estas herramientas moleculares tienen como objetivo final el entendimiento de los procesos que llevan a determinadas variedades de guisante a ser tolerantes a las heladas, y como aplicación final la posible selección de líneas tolerantes a heladas lo cual permitiría una mejora en el cultivo de guisante actual.

En resumen, a pesar de los esfuerzos realizados sobre este tema las metodologías utilizadas hasta el momento no han sido resolutivas a la hora de esclarecer los procesos y los genes implicados en la tolerancia al frío en guisante y por tanto no se han podido desarrollar sistemas óptimos de cribado y selección de líneas de guisante totalmente adaptadas al ambiente de nuestra región. Sin embargo, la biología molecular avanza rápidamente y las nuevas tecnologías en este campo pueden ser de gran utilidad dentro de cualquier plan de mejora ya que ahorran espacio, son herramientas ideadas para obtener resultados en un menor plazo de tiempo y en muchos casos conllevan menos recursos. En este punto nuestro grupo, dentro del plan de mejora del guisante, está incorporando técnicas y metodologías ya aplicadas en otros cultivos y plantas modelo en los cuales han demostrado tener una mayor efectividad a la hora de encontrar dichos genes y ayudar en el proceso de mejora de los cultivos.

Evaluación de la dureza invernal y la tolerancia a heladas

Las prácticas de cultivo ejercen su impacto en el microambiente en el cual el guisante se aclimata y sobrelleva el invierno. Por tanto, la fecha de siembra, la fertilidad del suelo, el control mediante pesticidas, el laboreo, y la gestión de residuos pueden afectar tanto a la habilidad del guisante para aclimatarse y a la severidad de los estreses a tolerar. Por tanto, la dureza invernal del guisante representa la tolerancia a los rigores invernales los cuales son complejos y altamente variables (Murray y Swensen, 1991) y debe ser evaluada bajo condiciones de campo. Mientras que la tolerancia al frío o a heladas puede ser medida con precisión bajo condiciones controladas.

La evaluación de la dureza invernal se ha realizado históricamente en ensayos de campo. La supervivencia en campo es el último análisis de la dureza invernal, pero con frecuencia resulta inconcluyente debido a la variabilidad anual en factores que influyen la tasa de mortalidad por el invierno, como la temperatura, la cobertura de nieve o la composición del suelo (Fowler, 1979). Se requieren ensayos repetidos en campo para estimar la dureza invernal de un cultivar en un área de siembra definida.

La evaluación de la tolerancia a heladas ha sido propuesta de diversas formas en la bibliografía. En este punto, experiencias con otros cultivos, como por ejemplo en trigo (Fowler, 1979), indican que la supervivencia en campo puede ser un buen método de selección, pero los resultados son muy variables dependiendo de diversos factores ambientales (cobertura de nieve, fertilidad del suelo, etc.). En guisante, Dowker (1969), en ensayos llevados a cabo en Inglaterra, detectó dicha variabilidad en el porcentaje de supervivencia en campo dependiendo de la dureza del invierno: en inviernos severos las diferencias genotípicas eran claramente puestas en evidencia, mientras que en inviernos moderados los porcentajes de supervivencia eran muy similares, resultando difícil una correcta clasificación. Este problema no es tan fuerte en otras áreas: así por ejemplo Auld (1982), en ensayos llevados a cabo en Idaho (EEUU) encontró correlaciones significativas y relativamente altas (0,55 y 0,59) entre la supervivencia en campo y la supervivencia en cámara de ambiente controlado con temperaturas de -3°C y -6°C respectivamente. Liesenfeld *et al.* (1986), en ensayos también en Idaho (EEUU), detectaron correlaciones similares cuando la temperatura de helada a la que se sometían las plantas en condiciones controladas era de -7°C , mientras que a -4°C y -10°C las correlaciones con la supervivencia en campo bajaron a 0,27 y 0,30 respectivamente.

Como alternativa al problema de la excesiva dependencia al rigor invernal para poder evaluar la tolerancia al frío en zonas de inviernos variables, Dowker (1969) propuso la evaluación de daños por frío en plantas supervivientes, obteniendo clasificaciones similares en las tres campañas de cultivo en que llevó a cabo sus ensayos. Dichas clasificaciones resultaron acordes con las efectuadas sobre el porcentaje de supervivencia en campañas caracterizadas por inviernos severos. Sin embargo, dicho autor advierte de la subjetividad en el método de evaluación de daños, resultando a veces impreciso, aunque útil para la evaluación de un número elevado de líneas. En este sentido, Liesenfeld *et al.* (1986) detectaron

correlaciones del orden de 0,80 entre porcentaje de supervivencia en campo y daños sobre plantas supervivientes en dos cruzamientos distintos de guisante. Dowker (1969) también propone el realizar varias fechas de siembra para facilitar la expresión del carácter supervivencia. Este método también ha sido utilizado por Auld *et al.* (1983).

En cuanto a la evaluación de la tolerancia al frío; en regiones donde la baja temperatura es el principal factor limitante en la supervivencia al invierno, la tolerancia al frío puede ser un buen indicador de la dureza invernal, y puede ser medida directamente (Murray y Swensen, 1991). Los ensayos de congelación controlados son simples, rápidos, permiten precisar el control sobre las condiciones experimentales y facilitan la replicación de experimentos en el tiempo (Liesenfeld *et al.*, 1986). El diseño de este tipo de ensayos ha sido descrito con detalle en el empleo de cámaras de ambiente controlado para evaluar diferentes niveles de tolerancia a heladas en el caso del guisante (Caminero, 2002).

Prieur y Cousin (1978) definen para guisante un método de evaluación para tolerancia a heladas en el cual las plantas deben pasar, previo a la exposición a la helada en sí, por un proceso de aclimatación de 2-3 semanas, y que tras la helada la temperatura debe subir gradualmente. Swensen (1980) encontraron que tras la helada debe pasar al menos un periodo de 3 semanas para garantizar una buena expresión de los daños.

Para predecir la supervivencia en campo, el estrés controlado por baja temperatura debe ser semejante a lo que ocurre en campo, asimismo los estreses artificiales como una elevada intensidad de heladas o la desecación por helada deben evitarse (Olien, 1967). Para evitar el sobreenfriamiento, las plantas deben estar nucleadas con cristales de hielo cuando la temperatura de los tejidos está levemente por debajo de su punto de congelación. Según Eteve (1985), se debe evitar un descenso demasiado brusco de las temperaturas durante el proceso de heladas, pues se puede provocar la nucleación o congelación intracelular. Define como un buen índice de descenso de temperatura el de 2°C/hora, y una hora como el tiempo de sometimiento a la temperatura de helada requerida.

Las temperaturas entre -8°C y -12°C permiten la separación de tipos de guisante con dureza invernal de las variedades de primavera (Acikgoz, 1982; Auld *et al.*, 1983; Swensen y Murray, 1983). Cuando se evalúan conjuntamente cultivares con dureza invernal y sin ella, la supervivencia en campo se ha correlacionado significativamente con el porcentaje de supervivencia a -3°C, -6°C o -9°C de experimentos de congelación en condiciones controladas (Auld *et al.*, 1983).

Sin embargo, los métodos de evaluación en cámaras de ambiente controlado anteriormente descritos son costosos y necesitan de mucho tiempo, y en general no estando definidos correctamente para diferenciar entre rangos estrechos de niveles de tolerancia ni para poblaciones segregantes. En este aspecto, parece evidente que la obtención de marcadores moleculares ligados a genes de tolerancia a las heladas, susceptibles de ser utilizados en selección asistida por marcadores, jugarán un papel importante en la definición de los planes de

mejora genética para siembra invernal, estando abiertas líneas de trabajo en este sentido, en otras especies relacionadas, como lenteja (Eujayl *et al.*, 1998; Muehlbauer *et al.*, 2004).

3. La mejora genética del guisante asociada a la dureza invernal

El guisante ha sido uno de los primeros cultivos con el cual un trabajo de mejora controlado ha sido emprendido para la producción de líneas mejoradas, y es el trabajo sobre este cultivo que realizó Mendel el que fijó las bases de la ciencia moderna de la genética. La especie *Pisum sativum* ha sido utilizada durante mucho tiempo como planta modelo para la investigación en fisiología y bioquímica (Higgins *et al.*, 1988).

Las herramientas de mejora molecular en guisante resultan escasas en la actualidad, a pesar de su adopción como una especie modelo en genética desde Mendel (Bhattacharyya *et al.*, 1990; Amstead *et al.*, 2007; Hofer *et al.*, 2001). En la actualidad el guisante es un modelo “impopular” para el análisis genético debido a que las plantas son grandes y el genoma es complejo. Sin embargo, su gran genoma ofrece la oportunidad de estudiar la arquitectura genómica, y el gran tamaño de las plantas y su idoneidad para análisis bioquímico y fisiológico podrían resultar una ventaja en algunos contextos.

A pesar de los problemas asociados al genoma de guisante, por su gran tamaño y complejidad, estas mismas características proporcionan la oportunidad de estudiar la arquitectura genómica.

3. 1. Los marcadores moleculares en la mejora genética del guisante

Las tres principales ventajas del empleo de marcadores moleculares en los programas de mejora son: el número de marcadores casi ilimitado, la sencillez de su observación y discriminación; y que, por regla general, están libres de las interacciones genotipo x ambiente (Lombard *et al.*, 2001). Por último, la velocidad de análisis y la independencia de su evaluación con otros factores como el estado de crecimiento, la estación del año, la localización, y las prácticas agronómicas, hacen de ellos un recurso de alto valor (Smykal *et al.*, 2008).

Se ha desarrollado un amplio rango de marcadores basados en ADN en *Pisum* incluyendo microsatélites (Burstin *et al.*, 2001; Loridon *et al.*, 2005), marcadores basados en retrotransposones (Flavell *et al.*, 1998), y marcadores anclados a genes (Gilpin *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006; Prioul-Gervais *et al.*, 2007). Todos ellos marcadores han sido empleados para diversos propósitos: construir mapas genéticos consenso (Loridon *et al.*, 2005, Aubert *et al.*, 2006; Weeden *et al.*, 1998), análisis de diversidad (Baranger *et al.*, 2004; Tar'an *et al.*, 2005; Jing *et al.*, 2005, Smykal *et al.*, 2008), y detectar QTL (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2004; Burstin *et al.*, 2007; Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008). Cada

uno de estos tipos de marcadores presenta ventajas e inconvenientes. Con todo, se ha determinado que la correlación entre caracteres morfológicos y marcadores de ADN es más cuantitativa que cualitativa (Burstin y Charcosset, 1997; Tommasini *et al.*, 2003; Smykal *et al.*, 2008).

Los marcadores basados en genes utilizados hasta hace poco con tecnologías de bajo rendimiento en genotipado permitían detectar un *locus* único al tiempo pero no permitían establecer sintenia con otras especies de leguminosas (Hecht *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006; Gualtieri *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004). La integración de varios sistemas de marcadores disponibles en la evaluación del germoplasma de guisante ha sido realizada por Baranger *et al.* (2004), Tar'an *et al.* (2005) y Smykal (2006).

Los marcadores múltiples basados en secuencias repetidas poseen el potencial necesario para los análisis genéticos de alto rendimiento (Flavell *et al.*, 1998; Fuchs *et al.*, 1998), y las secuencias flanqueantes con bajo número de copias pueden ser utilizadas para transferir la información entre especies de leguminosas. En guisante se han desarrollado numerosos SSR (Burstin *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2002; Lorigon *et al.*, 2005) y se han publicados trabajos basados en estos marcadores (Burstin *et al.*, 2001; Baranger *et al.*, 2004; Tar'an *et al.*, 2005). Los microsatélites han sido los marcadores más empleados en los últimos años, debido al elevado número de alelos por *locus* y su fácil aplicación mediante PCR convencional. Sin embargo, en genotipado de grandes poblaciones el uso de esta técnica es aún cara y requiere mucho tiempo.

La gran ventaja del análisis mediante SSR es la precisión, el elevado polimorfismo, la cobertura genómica multialélica y la co-dominancia (Becher *et al.*, 2000). Son usados comúnmente en mapeo, estimación de la diversidad genética, etiquetado de genes, y MAS (McCough *et al.*, 1997). Su mayor desventaja es el desarrollo de los mismos en nuevos cultivos ya que se requiere información específica de secuencias microsatélites y flanqueantes, por tanto requiere tiempo y dinero (Smykal, 2006).

Los microsatélites han sido desarrollados y empleados en plantas para mapeo genético, estudios de diversidad genética, genética de poblaciones y selección asistida por marcadores (Marker-Assisted Selection, MAS) (revisiones Vienne, 1998; Gupta y Varshney, 2000). En guisante, la mayor contribución en el diseño de SSR ha sido realizada por Burstin *et al.* (2001) con un total de 171 SSR empleados en análisis de la diversidad genética, y un total de 276 SSR descritos en Lorigon *et al.* (2005) y utilizados en la construcción de un mapa genético.

Los elementos transponibles (TEs) son un componente predominante en el genoma de plantas en el cual pueden alcanzar más del 50% del ADN nuclear (Kunze *et al.*, 1997; SanMiguel y Bennetzen, 1998; Bennetzen, 2000a) y contribuyen a la diversidad a través del polimorfismo por inserción y por reordenaciones estructurales pequeñas (Bennetzen, 2000a). Los TEs se pueden clasificar atendiendo a su mecanismo de transposición y el modo de propagación (Finnegan, 1992): retrotransposones o transposones. La ubicuidad (Kubis *et al.*, 1998; Flavell *et al.*, 1992; 1998) y distribución de estos TEs

sugiere que pueden ser potencialmente útiles como herramientas de diagnóstico (Vershinin *et al.*, 2003). Los TEs pueden estar involucrados en la reordenación del genoma de guisante pudiendo generar diversidad genética por su propia transposición o por otras actividades que induzcan.

Los retrotransposones son activados por estreses bióticos como el ataque de patógenos (Gransbastien *et al.*, 1997) y estreses bióticos como sequía (Kalendar *et al.*, 2000), al igual que en cultivo celular (Hirochika *et al.*, 1996) y en estado de metilación del genoma (Kaepplet *et al.*, 2000; Liu y Wendel, 2000; Kubis *et al.*, 2003). La actividad transcripcional de los retrotransposones puede conducir a un incremento en el número de copias y en el tamaño del genoma si las nuevas inserciones sobreviven a la selección (Kalendar *et al.*, 2010).

Entre los retrotransposones, el grupo Ty1-copia, y dentro de este grupo PDR1 está presente en aproximadamente 200 copias por genoma haploide en el género *Pisum* (Lee *et al.*, 1990). Cada copia es altamente polimórfica entre las accesiones de *P. sativum*, con aproximadamente el 30% de inserciones compartidas entre dos accesiones cualquiera (Ellis *et al.*, 1998). Los marcadores RBIP se basan en este tipo de retrotransposones PDR1 LTR (Flavell *et al.*, 1998) en base al diseño de cebadores que detecten la inserción de PDR1 en una región específica del genoma del guisante. Los sistemas de detección mediante RBIP se basan en el empleo de tres cebadores, dos de ellos flanqueantes a la región de inserción, y un tercero complementario a la secuencia LTR, obteniendo un polimorfismo de tamaño en función de la presencia del inserto en la secuencia o su ausencia (Flavell *et al.*, 1998).

En estudios de diversidad, similitud genética y relaciones cladistas dentro del género *Pisum* (Pearce *et al.*, 2000; Smykal, 2006), el método de RBIP *locus*-específico ha sido utilizado para analizar la historia evolutiva de *Pisum* (Flavell *et al.*, 1998; Vershinin *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2005; 2010; 2012; Martín-Sanz *et al.*, 2011). Asimismo se han usado métodos basados en retrotransposones (SSAP, IRAP y REMAP) para determinar la huella genética o *fingerprinting* de variedades, y desarrollar mapas genéticos en guisante (Ellis *et al.*, 1998).

Las principales ventajas de este tipo de marcadores son la obtención de los mismos mediante técnicas SSAP, sin necesidad de disponer de librerías genómicas, como en el caso de SSR, la presencia de inserciones de retrotransposones es mayor que el número de SSR en los genomas vegetales (Pearce *et al.*, 1996; SanMiguel *et al.* 1996; Ellis *et al.*, 1998) y la co-dominancia. La principal desventaja con respecto a los SSR es que el propio retrotransposón debe ser caracterizado previo al diseño de los marcadores (Flavell *et al.*, 1998). Otra desventaja de los RBIP frente a los SSR es que son menos informativos en base al número de alelos obtenido, dos frente a múltiples. Sin embargo, las inserciones de retrotransposones son potencialmente informativas desde el punto de vista del estado ancestral e irreversible de cada *locus*, lo que permitiría resolver la complejidad de las relaciones filogenéticas más ancestrales (Flavell *et al.*, 1998).

La mayoría de los marcadores moleculares, desarrollados y empleados en los años 90, se han basado en el ADNg dando lugar a los RDMs (Andersen y Lübberstedt, 2003), como es el caso de RAPDs, AFLPs o ISSRs (Gupta y Rustgi, 2004). Estos marcadores poseen una utilidad limitada en los estudios de mapeo comparativo. Aunque los diversos mapas de guisante puedan ser comparados entre sí a través *loci* comunes, la mayoría de los marcadores empleados en diferentes cruzamientos siguen siendo RAPDs o AFLPs, lo que dificulta la transferencia de información entre cruzamientos en guisante (Brauner *et al.*, 2002). Además, tales marcadores raramente pueden ser transferidos para detectar ortología en cruces de leguminosas relacionadas como lenteja o garbanzo. Para tales aplicaciones comparativas en el mapeo las secuencias conservadas de ADN tales como las encontradas en los exones de muchos genes, parecen ser la clave.

Por otra parte, se ha acentuado el desarrollo de marcadores moleculares a partir de regiones transcritas del genoma, gracias a la creciente disponibilidad de EST y librerías de ADNc. En base a la disponibilidad de secuencias de ADN en GenBank y otras bases de datos, los cebadores de ADN pueden ser diseñados para amplificar específicamente una región de un gen previamente secuenciado mediante PCR, produciendo un sitio etiquetado por secuencia (STS: *Sequence Tagged Site*) (Olsen *et al.*, 1989). Esta metodología puede ser más eficiente para el desarrollo e identificación de marcadores anclados. Un método conveniente para detectar el polimorfismo de secuencia en un marcador STS es a través del empleo de endonucleasas de restricción, para producir secuencias polimórficas amplificadas y digeridas (CAPS: *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) (Jarvis *et al.*, 1994).

Los datos disponibles de secuencias genómicas en guisante aún son reducidos (103435 secuencias genómicas en GenBank, año 2013), y el número de EST también es limitado (18546 en GenBank), si se compara con los 2 millones y 1,5 millones de ESTs disponibles respectivamente en las bases de datos de maíz y soja. Además, las secuencias están rara vez presentes para genotipos distintos. Consecuentemente, el número de SNP que han sido identificados es muy limitado. (Deuvot *et al.*, 2010)

En base a estos marcadores basados en secuencias transcritas, se ha dado un paso más hacia el desarrollo de marcadores GTMs, en guisante se han desarrollado STS (Gilpin *et al.*, 1997; Weeden *et al.*, 1999), CAPS, dCAPS, ASP (Aubert *et al.*, 2006) y han sido empleados en la obtención de mapas de ligamiento y han sido empleados en el análisis de sintenia con *Medicago sativa*. Incluso, en un último paso, se han desarrollado FMs. En guisante un ejemplo de FMs son los ASAPs (*Allele-Specific Associated Primers*) para el gen de resistencia al oídio, *er-1* (Timmerman *et al.*, 1994). El empleo de CAPS ha permitido localizar genes en guisante y en otros cultivos, Gilpin *et al.* (1997) diseñaron cebadores sobre ADNc secuenciados obtenidos de plántulas de guisante etioladas y mapearon un número de *loci* CAPS en el mapa consenso o en mapas de ligamiento en otros cruzamientos.

3. 2. Recogida y clasificación como fase inicial en la mejora del guisante

En el caso del guisante hay varios centros de recursos fitogenéticos que incluyen este cultivo dentro de sus colecciones de germoplasma llegando a ser un total de 16 bancos de germoplasma los que contienen un número considerable de entradas (Muehlbauer y Kaiser, 1994); siendo altamente representativos por el elevado número de entradas que poseen: *Vavilov Research Institute of Plant Industry* (Rusia), *Nordic Gene Bank* (Suecia) o *John Innes Centre* (Reino Unido). En España también existen bancos de germoplasma con colecciones de vinculadas al guisante, como el del Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF), la Misión Biológica de Galicia (MB-CSIC) o el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

En el guisante, al igual que otros cultivos, la falta de consenso claro en la taxonomía o la ausencia de un consenso en los descriptores más informativos complican la labor de interpretación de la variabilidad presente en un banco o en una región geográfica. Además, en muchos casos la información existente en los bancos de germoplasma pasa de a ser incompleta y parece ser cada vez más necesaria la incorporación de descriptores en referencia a adaptaciones a determinados ambientes o condicionantes, de forma que se ha sugerido la inclusión de los rasgos de interés disponibles en las colecciones de germoplasma, en fondos adaptados para poder recurrir a los métodos de mejora apropiados en cada caso (Muehlbauer, 1991). Por ejemplo, en referencia a centros de diversidad de Oriente Próximo, mediterráneos o africanos se ha descrito presencia de tolerancia a compuestos como aluminio o fluoruro de hidrógeno, enfermedades bacterianas, fúngicas y víricas, temperaturas extremas y pH elevado, entre otras (Duke, 1981). Esta información se ha ido incorporando a las bases de datos de diferentes bancos de germoplasma como el del ITACyL, en el cual se recopila información referente por ejemplo a resistencia a bacteriosis. Además las dificultades en el proceso de registro van en aumento, tanto por la dificultad para discriminar las nuevas variedades de otras más antiguas, como para obtener avances significativos en la productividad.

3. 3. Estudio del origen, evolución, diversidad y comportamiento del guisante

La mejora del guisante está afrontando nuevos retos para incrementar su superficie cultivada y para desarrollar una mayor diversidad de líneas: encontrar resistencia a enfermedades y bajas temperaturas, y enriquecer la calidad de la semilla. Con este objetivo, las fuentes explotables dentro del género *Pisum* deben ser identificadas (Blixt, 1972).

El desarrollo de especies cultivadas y la mejora de nuevas variedades se han fundamentado en la disponibilidad de diversidad biológica, procedente de la evolución a largo plazo de las especies. Los métodos de la mejora vegetal moderna enfocados hacia la adaptación de amplio rango y un alto rendimiento del cultivo así como la selección intensiva de las especies cultivadas han puesto en relieve la cuestión sobre la cantidad de variabilidad genética disponible en los bancos de germoplasma para la

mejora sostenible (Hodgkin, 1995). Junto con la necesidad de conservar la biodiversidad, ha surgido la necesidad de determinar la diversidad en los cultivos y un mejor entendimiento del impacto de la mejora en su diversidad (Baranger *et al.*, 2004).

Análisis filogenético del género *Pisum*

La taxonomía de *Pisum* ha sido muy discutida a lo largo del tiempo (Gogorov 1937; Blixt 1972; Ben-Ze'ev y Zohary, 1973; Zohary, 1996). Convencionalmente se ha reconocido una especie cultivada *P. sativum* y tres taxones silvestres, *P. elatius*, *P. humile*, y *P. fulvum*. No obstante, Ben-Ze'ev y Zohary (1973) concluyeron que *P. fulvum* es una especie completamente divergente, mientras que *P. humile*, *P. elatius* y *P. sativum* conforman un complejo de especies independientes que engloba dos razas principales, formas semi-silvestres (*elatius* y *humile*), y derivados cultivados (*sativum*); *P. fulvum* junto con *P. elatius* se reconocieron con los linajes ancestrales (Gogorov, 1937; Blixt, 1972; Ben-Ze'ev y Zohary, 1973; Zohary 1996).

Uno de los problemas más discutidos sobre la taxonomía de *Pisum* es la posición y el estado de *P. abyssinicum*, es decir si este linaje muestra suficiente divergencia de otros taxones como para ser considerada una especie separada o si debería ser incluida dentro de *P. sativum* como un subgrupo o ecotipo. Entre las diferentes referencias, Gogorov (1937) considero ambas especies diferenciadas, al igual que trabajos posteriores (Vershinin *et al.*, 2003), mientras que Makasheva (1984) consideró a *P. abyssinicum* como un ecotipo o subgrupo de *P. sativum*.

La distribución de polimorfismos de regiones de inserción de retrotransposones dentro del género es de interés, por ejemplo entre *P. sativum* y *P. abyssinicum*, ambos cultivados, pero muy diferenciados a juzgar por el grado de sitios de inserción de retrotransposones compartidos, lo que ayudó a proponer que fueron domesticados de forma independiente (Ellis *et al.*, 1998; Pearce *et al.*, 2000).

Las principales colecciones de germoplasma han acumulado un elevado número de accesiones de guisante silvestres, pero muchas de ellas son duplicados bajo diferentes designaciones, y algunas están “contaminadas” por genes de otras formas silvestres y cultivadas en el curso de la reproducción, lo que depara en dificultades en el análisis filogenético y la clasificación. De hecho, la comparación de los resultados de diferentes análisis filogenéticos es difícil debido a las distintas poblaciones de accesiones evaluadas y la información incompleta sobre su atribución taxonómica y el origen de los representantes silvestres incluidos (Kosterin y Bogdanova, 2008).

Jing *et al.* (2010) mostraron los resultados obtenidos mediante el empleo de RBIP en una evaluación de más de 3000 accesiones de guisante respaldan el modelo de la domesticación independiente de *P. sativum* y *P. abyssinicum*. Las relaciones entre ambos germoplasmas cultivados y las varias subdivisiones de *Pisum* silvestres han sido clarificadas y la mayoría de los acervos genéticos ancestrales silvestres

identificados. Sugieren, como Vershinin *et al.* (2003) que *P. abyssinicum* proviene de un cruzamiento entre *P. fulvum* y *P. elatius*. La estructura separa las accesiones por variedades locales, cultivares y líneas silvestres, aunque también hay subestructuración dentro de las accesiones domesticadas según caracteres fenotípicos y localizaciones geográficas restringidas. Al igual que en trabajos previamente publicados cuyos resultados mostraron la ausencia de separación del taxón *P. abyssinicum* en (Jing *et al.*, 2005; 2007).

En la actualidad el fondo génico del guisante cultivado es diverso, reflejando su temprana domesticación y su subsiguiente expansión en el cultivo. Sin embargo la diversidad genética hallada en los cultivares actuales de guisante en el Este de Europa ha sido descrita como muy escasa, especialmente en las variedades mejoradas como forrajeras de siembra primaveral. Baranger *et al.* (2004) y Tar'an *et al.* (2005) demostraron una estrecha diversidad genética entre variedades relacionadas con el este de Europa, especialmente dentro de guisante de siembra de primavera. En contraste, Tar'an *et al.* (2005) demuestran una elevada diversidad genética en líneas cuya procedencia sea Canadá y Australia.

A pesar de que *Pisum* es altamente autógama, el grado de heterogeneidad se mantiene significativamente dentro de las especies de guisante, entre las que destaca una extensa introgresión y panmixia (Vershinin *et al.*, 2003). El conocimiento de la diversidad genética puede tener un importante efecto sobre la mejora del guisante. En comparación con datos de pedigrí, una similitud genética detallada estimada en base a marcadores moleculares se adapta mejor a la selección de genotipos parentales (Tinker *et al.*, 1993; Graner *et al.*, 1994) debido a que ofrecen información adicional acerca del número de *loci* segregantes.

La diversidad del guisante y su variabilidad genética

El desarrollo de métodos para la identificación y clasificación de cultivares es un problema importante en la genética, la mejora y la biotecnología. Hay múltiples aplicaciones para resolver este problema, las cuales difieren a nivel tecnológico, la fiabilidad, las propiedades universales, y el valor comercial (Kozhukhova *et al.*, 2000; Khlestkina y Salina, 2006). El guisante, es un objeto clásico de la genética y un importante cultivo, puede servir como un modelo adecuado para elaborar un sistema de marcadores moleculares que permitan una diferenciación fiable y rápida entre líneas y cultivares (Konovalov *et al.*, 2009).

La mayoría de los métodos actuales para identificar cultivares se basan en el análisis de diferencias entre especímenes con respecto a secuencias de nucleótidos de algunas regiones en el ADN genómico. Estas regiones pueden ser escogidas al azar (cuando se emplean RAPD, ISSR, AFLP y otros métodos basados en PCR) o dirigida (Malyshev y Kartel', 1997; Saliba-Colombani *et al.*, 2000). Los métodos de análisis de *loci* al azar son considerados con frecuencia menos fiables (Jones *et al.*, 1997). Los análisis de *loci* específicos están libres de estos problemas, pero la información sobre las secuencias de ADN que

corresponden a los *loci* de las especies examinadas es requerida normalmente para su aplicación a gran escala.

Los ejemplos más convincentes de la implementación de esta aplicación en guisante son los mencionados en trabajos relacionados con el análisis de polimorfismos en secuencias de genes individuales basados en CAPS, PCR-RFLP (Weeden *et al.*, 1999; Brauner *et al.*, 2002; Gostimskii *et al.*, 2005; Konovalov *et al.*, 2005). Este método basado en la amplificación mediante PCR de la región extendida de un gen objetivo que contiene intrones y en la digestión del producto de reacción con enzimas de restricción con diana específica. Sobre la sustitución de un nucleótido en uno de los sitios de restricción, el espectro electroforético de los productos de restricción se ve modificado de un modo correspondiente, el cual permite una identificación fiable de un SNP específico. A pesar de las ventajas evidentes de esta aplicación, ha sido escasamente aplicada en la identificación de cultivares de guisante (Konovalov *et al.*, 2009). Además, Brauner *et al.* (2002) arrojó dudas sobre la posibilidad de detectar el polimorfismo de secuencias de genes entre los cultivares actuales, al nivel suficiente para su clasificación. No obstante Konovalov *et al.* (2009) pudieron identificar y clasificar cultivares de guisante mediante el empleo de CAPs.

Tar'an *et al.* (2005) separaron claramente genotipos cultivados de las accesiones *Pisum* silvestres mediante ISSR, RAPDs y SSR, al igual que lo hicieron previamente Hoey *et al.* con RAPDs (1996) y Ellis *et al.* (1998) con marcadores basados en retrotransposones. Asimismo, entre las variedades cultivadas, los marcadores moleculares no permitieron obtener una correlación significativa con los caracteres fisiológicos y morfológicos. Sus resultados reflejan el intercambio de germoplasma entre programas de mejora en diferentes países, particularmente tras la introducción del rasgo semiáfila en los guisantes cultivados (Heath y Hebblethwaite, 1985).

Los marcadores moleculares han permitido el estudio de la diversidad mediante las variaciones en la secuencia de ADN, por tanto han facilitado la comprensión del proceso de domesticación en los cultivos (White y Doebley, 1998), el entendimiento del proceso histórico que ha conllevado la mejora de los cultivos más importante (Dubreil y Charcosset, 1999; Narvel *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2000), el establecimiento de la diversidad genética dentro del germoplasma y/o los tipos cultivados de varias especies (Prasad *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Métais *et al.*, 2002; Streiger *et al.*, 2002) y la identificación de cultivares (Rongwen *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares han sido empleados para examinar el efecto de los métodos de mejora vegetal moderna en la diversidad de varias especies como cebada (Koebner *et al.*, 2003) o trigo (Soleimani *et al.*, 2002). Estos estudios concluyeron que el nivel de variabilidad genética dentro del acervo genético de las especies cultivadas se ha mantenido durante el proceso de selección moderno, bien a través de la diferenciación de grupos heteróticos o bien con el mantenimiento de programas de mejora independientes.

Ciertos estudios de diversidad en guisante han sido dirigidos hacia el estudio de la biosistemática dentro del género *Pisum* (Hoey *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1998), o hacia el establecimiento de diferentes marcadores moleculares para analizar la diversidad genética dentro de *Pisum* (Lu *et al.*, 1996; Posvec y Griga, 2000; Burstin *et al.*, 2001; Simionuc *et al.*, 2002). Recientemente, los estudios de diversidad en guisante han intentado englobar ambos enfoques (Baranger *et al.*, 2004).

En los últimos años, se ha demostrado que las clasificaciones más informativas son obtenidas mediante la combinación de varios tipos de marcadores, caracterizados por ratios evolutivos diferentes, y por tanto permitiendo obtener complementariedad en la información genética que revelan (Baranger *et al.*, 2004).

Varios autores describen una clara distinción genética entre ecotipos y variedades cultivadas (Hoey *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1998; Baranger *et al.*, 2004), así como separación entre accesiones bien por su uso final: alimentación animal o humana, o bien en función de su fecha de siembra: guisantes de otoño o de primavera (Baranger *et al.*, 2004). Incluso se han usado métodos basados en retrotransposones (SSAP, IRAP y REMAP) para determinar la huella genética o *fingerprinting* de variedades y, en base a esta identificación de variedades, desarrollar mapas genéticos en guisante (Ellis *et al.*, 1998; Kalendar *et al.*, 2010).

En un programa de mejora vegetal, la estimación de las relaciones genéticas entre líneas parentales puede ser útil para determinar que material debería ser combinado en los cruzamientos para maximizar el beneficio genético. El fondo de diversidad genética entre líneas parentales proporciona una amplia oferta de variación alélica que puede emplearse para crear nuevas combinaciones genéticas favorables (Tar'an *et al.*, 2005).

3. 4. Estudio de la herencia: Mapas genéticos de ligamiento

La identificación de polimorfismos moleculares determinantes para la variabilidad de rasgos fenotípicos, tanto cuantitativos como cualitativos, es un objetivo principal de la actual investigación en agronomía (Aubert *et al.*, 2006).

El mapeo es un proceso en el cual cada nuevo marcador ofrece otra herramienta para futuros estudios (Weeden *et al.*, 1999). Como en todas las especies, el desarrollo inicial de un mapa parcial de guisante ha sido tedioso y prolongado (revisión en McPhee, 2005). El gran abanico de variabilidad morfológica que muestra *P.sativum* permitió ya el análisis de ligamiento en el guisante en 1908 (Punnet, 1923; 1925; 1923) y Vilmorin y Bateson (1912) en cuyos trabajos aparecen parejas o tríos de genes ligados (Rozov *et al.*, 1999).

El primer mapa de ligamiento en guisante es construido por Wellensiek en 1925, quien establece seis grupos de ligamiento, basado en mutaciones, precediendo a numerosas mutaciones que han sido mapeadas en diferentes poblaciones segregantes (resumen en Weeden y Wolko, 1990). El primer mapa de ligamiento de guisante con siete grupos es publicado por Lamprecht en 1948. Blixt (1974) propone un mapa de ligamiento en guisante basado en caracteres morfológicos, fisiológicos y de pigmentación. Una vez que se han identificado suficientes marcadores para desarrollar un mapa de ligamiento primitivo, el principal problema pasa a ser identificar una técnica que pueda exponer polimorfismos genéticos simples. Inicialmente, el polimorfismo fenotípico fue el método escogido, primero seleccionando mutantes naturales y después empleando mutágenos para inducir cambios en la expresión de genes.

Con la llegada de las técnicas moleculares, los primeros genetistas pueden crear las bases de los mapas de ligamiento iniciales basados sobre estos marcadores moleculares. Primero se desarrollaron las técnicas bioquímicas, el polimorfismo de proteínas y alozimas dando lugar a los primeros mapas basados en el análisis de isoenzimas (Weeden y Mark, 1987; Irzykowska *et al.*, 2001), llegando a mapear aproximadamente 50 nuevos *loci* codificantes para estas proteínas y reorganizando completamente los siete grupos de ligamiento.

La llegada de tecnología basada en ADN permitió la resolución de todos los cambios en la secuencia de ADN y, por tanto, cualquier variación genética que estuviera presente entre dos genotipos. Por tanto, el siguiente paso fue la incorporación de marcadores basados en ADN pero no específicos como RAPDs (Weeden y Wolko, 1990; Laucou *et al.*, 1998), o RFLPs (Hall *et al.*, 1997) junto con otros marcadores morfológicos, fisiológicos o bioquímicos (Ellis *et al.*, 1992). Los primeros mapas de ligamiento del genoma de guisante conteniendo marcadores moleculares se desarrollaron ahora hace más de 30 años (Ellis *et al.*, 1992; 1993; Dirlwanger *et al.*, 1994; Weeden *et al.*, 1996).

Uno de los dilemas encontrados en la selección entre técnicas basadas en ADN empleadas en el mapeo es si utilizar una técnica que se base en secuencias conservadas con un polimorfismo relativamente bajo o secuencias altamente polimórficas que no pueden ser extrapoladas a otros cruzamientos o géneros. Con la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante PCR convirtiéndose en la aplicación más comúnmente usada para el desarrollo de marcadores, un número de laboratorios han intentado desarrollar métodos que combinen las secuencias conservadas y polimórficas. Probablemente el mejor ejemplo de esta combinación son los SSR, en los cuales se espera que la repetición por si misma muestre un elevado nivel de polimorfismo, mientras que los cebadores son diseñados para ser homólogos a regiones flanqueantes mucho más altamente conservadas (5). Una segunda aplicación ha sido diseñar cebadores en base a secuencias de ADNc, y cortarlas mediante enzimas de restricción con secuencias diana de 4 bases para detectar polimorfismos internos. Esta última aplicación se denominado CAPS (4). La aplicación de SSR ha probados ser altamente efectiva dentro de género (8), y los CAPs han sido muy útiles, particularmente en cruzamientos amplios (1). El marcador ideal, tal y como proponen Weeden *et al.*

(1999), podría ser un intrón con motivo SSR dentro de un gen. En tal situación los cebadores podrían ser diseñados para regiones conservadas de la secuencia codificante; aunque el elevado polimorfismo SSR aún podría ser amplificado y cualquier polimorfismo resuelto por electroforesis u otra técnica. Dentro de esta última opción se enmarcan los STS. En base a genes de función conocida o ESTs mediante técnicas basadas en PCR también se han obtenido mapas de ligamiento en guisante por diferentes autores (Gilpin *et al.*, 1997; Weeden *et al.*, 1999; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000; Konovalov *et al.*, 2005).

Como ejemplo, Gilpin *et al.* (1997) desarrollaron 18 STS para guisante y mapearon 16 y, en base a sus resultados, concluyeron que los STS podían ser de valor en la genética de poblaciones en guisante ya que se basan en secuencias de ADNc.

Las principales poblaciones de RILs para mapeo en guisante provienen de cruzamientos intraespecíficos de *Pisum sativum*. Estas poblaciones provienen específicamente para el análisis de ligamiento en estado de RIL (generación F₈ y posteriores) En un estudio de la relación entre los mapas genéticos y citogenéticos en guisante (Hall *et al.*, 1997a; 1997b) se encontró una gran diferencia entre las longitudes de los mapas, 1800 frente a, aproximadamente, 750 cM. Un mapa de ligamiento de guisante, consistente en RAPDs principalmente, resultó mostrar un exceso en la longitud del mapa con 1139 cM (Lacou *et al.*, 1998). La expansión del mapa en general y la disparidad entre los mapas genéticos y los físicos han sido objeto de discusión en diversas especies (Taylor 1978; Burr *et al.*, 1988; Burr y Burr, 1991; Tanksley *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1993; Paran *et al.*, 1995; Puchta y Hohn, 1996; Sybenga, 1996).

Hay evidencias citogenéticas indiscutibles de que en eucariotas los quiasmas son las manifestaciones de los sitios de recombinación, que la frecuencia de quiasmas por bivalente es relativamente proporcional a la longitud del cromosoma, y que esta relación esta generalmente bien conservada entre especies (Jones, 1987; Rees y Narayan, 1988; Tease y Jones, 1995). El conteo de quiasmas puede estar subestimado, pero para la longitud del mapa genético a doblar la cantidad de quiasmas podría también necesitar el doble y esto es una equivocación indeseada.

A lo largo del tiempo se han desarrollado mapas genéticos utilizando diferentes tipos de marcadores genéticos más específicos como por ejemplo SSR (Weeden *et al.*, 1998; Pilet-Nagel *et al.*, 2002; Prioul *et al.*, 2004; Loridon *et al.*, 2005), se han publicado mapas comparativos entre *Medicago sativa* y *Pisum sativum* (Kalo *et al.*, 2004; Aubert *et al.*, 2006) e incluso mapas consenso con amplia información de diferentes tipos de marcadores (Loridon *et al.*, 2005) o con secuencias informativas, EST, (Gilpin *et al.*, 1997). Con el objetivo específico de situar 46 genes, se obtuvo un mapa consenso (Weeden *et al.*, 1998), para que posteriormente se anclaran 104 mutaciones (Ellis y Poyser, 2002) en el mismo mapa. También se han construido mapas de ligamiento anclando genes de resistencia (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000) o QTL asociados a resistencia a diferentes estreses bióticos (Hunter *et al.*, 2001; Tar'an *et al.*, 2003; Prioul *et al.*, 2004; Frew *et al.*, 2002; Fondevilla *et al.*, 2011b).

La obtención de mapas de ligamiento en guisante ha permitido, a su vez, desarrollar diferentes aproximaciones como la clonación posicional o el etiquetado de transposones (revisión en Morgante y Salamini, 2003), al igual que la aproximación mediante genes candidatos (Bhattacharrya *et al.*, 1990; Martin y Smith, 1995; Byrne *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 1998; 1999; Pelleschi *et al.*, 1999; Frewen *et al.*, 2000; Thornsberry *et al.*, 2001; Osterberg *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2002; Foucher *et al.*, 2003) que han sido empleadas para descubrir los genes subyacentes a la variación fenotípica en plantas.

Los mapas de ligamiento han ayudado en la identificación de marcadores genéticos ligados a genes únicos de interés agronómico, tales como genes de resistencia a enfermedades, y han permitido la identificación de secuencias de ADN estrechamente ligadas para su uso como herramientas de diagnóstico en la mejora vegetal.

La construcción de mapas funcionales que incluyan genes con función conocida es un componente esencial del enfoque de los genes candidatos. En esta aproximación, se pueden definir dos tipos de candidatos: (i) candidatos funcionales como genes de función conocida cuya expresión puede afectar al rasgo de interés; o (ii) candidatos posicionales como genes que están localizados en la región de QTL o de una mutación que afecta al rasgo de interés.

Un mapa funcional permite verificar cualquier QTL o mutación mapeados, si alguno de los genes mapeados es un buen candidato. Se han obtenido numerosos mapas funcionales en varias especies, usando genes implicados en rutas metabólicas específicas (Causse *et al.*, 1995; Byrne *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2001), genes RGA (Pflieger *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Pfaff y Kahl, 2003; Lanaud *et al.*, 2004), o ESTs expresados en órganos específicos y/o para tratamientos o estados específicos (Ishimaru *et al.*, 2001; Causse *et al.*, 1996; 2004; Potokina *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2004).

3. 5. Estudio de la problemática del adelanto en la fecha de siembra en guisante

La mejora genética para el rendimiento

La mayoría de los rasgos de interés agrícola en guisante, como en otras especies vegetales, son heredados cuantitativamente. Asimismo, muchos de los caracteres asociados al rendimiento de este cultivo se han mostrado correlacionados entre sí y han sido objeto de estudio, como la dehiscencia de la vaina (Weeden *et al.*, 2002) o la correlación significativamente elevada encontrada entre el rendimiento de semilla y el número de vainas por planta (Doré *et al.*, 1998). La complejidad de estos rasgos fenotípicos mostrando variación continua proviene de la segregación de alelos de muchos *loci* interactuando (QTL), cuyos efectos dependen del ambiente. Los avances en genética molecular y en los métodos estadísticos hacen posible crear mapas genéticos cubriendo todo el genoma e identificar regiones cromosómicas donde estos QTL se localizan (Irzykowska y Wolko, 2004).

El estudio de rasgos cuantitativos en guisante es bastante limitado; se han realizado trabajos en función del peso de semilla (Timmerman-Vaughan *et al.*, 1996), el color del cotiledón (McCallum *et al.*, 1997), la longitud del tallo y el número de internudos (Irzykowska *et al.*, 2002), rasgos relacionados con el rendimiento y el contenido proteico de semilla (Irzykowska y Wolko, 2004).

El rendimiento puede incrementarse mediante una siembra temprana (Caminero, 2002) y el uso de semillas de floración temprana (Dumolin *et al.*, 1996). Sin embargo, otro factor importante y determinante en la fecha de siembra y el cultivar es el producto requerido (Bozoglu *et al.*, 2007). Un estudio realizado en Turquía demostró que la siembra invernal es más adecuada para el rendimiento de semilla seca mientras que la siembra en primavera se ajusta mejor a la producción de comida en conserva (Gulumser *et al.*, 1994).

Otro estudio sobre la fecha de siembra demostró que una fecha de siembra temprana incrementa el rendimiento en semilla así como su contenido en proteína (Ceyhan y Onder, 1999). Belcher (1999) evaluó cultivares de guisante de primavera e invierno sembrados en otoño y en primavera. Los cultivares de invierno produjeron rendimientos significativamente más elevados al sembrarse en otoño pero los rendimientos fueron reducidos severamente en la siembra en primavera (Bozoglu *et al.*, 2007).

El efecto del adelanto en la fecha de siembra

Una parte de los programas de mejora de variedades de guisante de invierno se han basado en el uso de líneas de guisante de invierno forrajero debido a su buena resistencia a la congelación: tales genotipos pueden soportar temperaturas de entre -6 y -14°C (Murray *et al.*, 1988). Estas líneas de guisante forrajero de invierno muestran un comportamiento de escapada a la helada, como, por ejemplo, pueden retrasar el estado sensible a la helada (inicio de floración), en respuesta a un corto fotoperíodo durante los meses de invierno (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999). Se cree que además estas líneas de guisante desarrollan mecanismos de tolerancia a heladas (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999). Otro recurso en los programas de mejora de guisante de invierno ha sido *Pisum fulvum* debido a su elevada resistencia a la congelación que muestra: tales genotipos pueden sobrevivir bajo condiciones de -6°C sin mostrar daños en hojas y con un 100% de supervivencia (Balackova *et al.*, 1986).

Las semillas de guisante poseen viabilidad elevada y capacidad germinativa sencilla, germinan rápidamente bajo condiciones ambientales favorables (Mahler *et al.*, 1988). Los guisantes con dureza invernal pueden soportar -10°C y con una cobertura protectora de nieve, la tolerancia puede incrementar hasta -40°C (Slinkard *et al.*, 1994; Serena y Salim, 2006).

Las variedades de guisante sembradas en primavera y sus rendimientos son muy variables, siendo altamente dependientes de la temperatura y el aporte hídrico a final de su ciclo de crecimiento. Las variedades de siembra otoñal suelen tener rendimientos más estables y elevados que las variedades de

primavera: además entran en el periodo de floración antes y así evitan estreses debidos a elevadas temperaturas o un aporte de agua deficitario el cual es frecuente en la primavera avanzada (Ceyhan, 2006). Sin embargo, la siembra en otoño es solo posible si las variedades poseen dureza invernal (Caminero, 2002; Bourion *et al.*, 2003).

La mejora genética del guisante asociada a la dureza invernal

La dureza invernal es uno de los principales estreses abióticos en guisante. La dureza invernal es un rasgo cuantitativo complejo condicionado por el genotipo de la planta y el ambiente en el que se desarrolla. Las variedades actuales sembradas en el mundo son consideradas como tolerantes al frío. Se ha buscado la dureza invernal en Norte América y Francia (Auld *et al.*, 1983; Eteve, 1985) y aunque se ha obtenido cierto nivel de tolerancia al frío sigue siendo un reto (Murray y Swensen, 1991).

Los primeros trabajos sobre la herencia de la dureza invernal en *Pisum* se realizaron en base a evaluaciones en campo caracterizando fenotípicamente rasgos morfológicos (Andersen y Markarian, 1968). A modo de ejemplo, se determinó que las ramificaciones del tallo podían deberse a herencia simple, quizás dos genes recesivos (Lamprecht, 1950).

Aunque se han realizado varios estudios genéticos, no hay consenso en el patrón de acción genético que controla la expresión de la dureza invernal en guisante. Los estudios genéticos sobre dureza invernal en guisante han determinado que es un rasgo cuantitativo en la naturaleza, gobernado por una dominancia intermedia (Cousin *et al.*, 1985) y genes aditivos (Auld *et al.*, 1983). Liesenfeld *et al.* (1986) determinaron que tan solo tres o cuatro genes o grupos de ligamiento podrían ser los responsables de la dureza invernal. Estos mismos autores observaron que la supervivencia al invierno estaba asociada con genes implicados en la pigmentación del hilum y de la testa.

Históricamente, se considera la tolerancia a las heladas en guisante como un carácter de tipo cuantitativo, poligénico, controlado por varios genes aditivos (Markarian y Andersen, 1966; Andersen y Markarian, 1968; Auld *et al.*, 1983). Posteriormente, Cousin *et al.* (1985) encontraron dominancia intermedia para la tolerancia al frío y Liesenfeld *et al.* (1986) sugieren que tan solo 3 o 4 genes o grupos de ligamiento pueden ser responsables de dicho carácter, encontrando asimismo que alguno de ellos está ligado a los genes que codifican para pigmentación del hilum (cromosoma 6, actual grupo de ligamiento II) y pigmentación de la cubierta seminal (cromosoma 1, coincidente con el grupo de ligamiento VI del actual mapa consenso). Auld *et al.* (1985) hablan de otro gen o grupo de ligamiento en el cromosoma 3 (actual grupo de ligamiento V), ligado al gen recesivo “*er*” que confiere resistencia a *Erysiphe polygoni*. Monti *et al.* (1993) encontraron que, dentro del material de sus ensayos, la tolerancia al frío es dominante sobre la susceptibilidad. No obstante, el carácter de tolerancia a las heladas, pese a su aparente complejidad, parece ser altamente heredable (Cousin *et al.*, 1993). Asimismo Eteve (1985) sugiere la posibilidad de que pueda existir una influencia citoplasmática en la tolerancia a la dureza invernal, lo cual parece confirmarse en los estudios de Liesenfeld *et al.* (1986).

En un estudio realizado en el ITACyL sobre la mejora genética del guisante asociada a la tolerancia a heladas ha contribuido a la definición del ideotipo de guisante para la siembra temprana en Castilla y León (Caminero, 2002). En este sentido, este trabajo define como características ideales alta capacidad de ramificación en los primeros estados del crecimiento inicial y durante los rigores invernales, fenología del ciclo reproductivo de carácter semitardío, valores medios o altos de los caracteres número de nudos y altura a la primera vaina y número de nudos totales, un tamaño de semilla no elevado y alto porcentaje de supervivencia en evaluaciones en cámara de ambiente controlado a -9°C, no obstante la morfología de la hoja no resultó determinante (Caminero, 2002).

Más recientemente, y en guisante, Lejeune *et al.*, (2008) no solo localizan varios QTL, asociados a la dureza invernal, ligados estrechamente a marcadores moleculares, sino que además muestran el estrecho ligamiento entre uno de sus QTL y el *locus Hr*, principal responsable del adelanto de la floración en LGIII.

La genética de la aclimatación al frío en guisante

La tolerancia a la congelación en plantas está relacionada, en parte, con la tolerancia celular a la deshidratación, ya que la formación extracelular de hielo reduce el potencial hídrico en las paredes celulares, conduciendo a la pérdida de agua desde el citoplasma (Sakai y Larcher, 1987; Guy, 1990). La tolerancia a congelación de muchas plantas se ve incrementada por la aclimatación a bajas temperaturas pero por encima del punto de congelación (Sakai y Larcher, 1987; Guy, 1990; Welbaum *et al.*, 1997). En guisante, la aclimatación al frío es observada por primera vez tras un par de días a 2°C y aumenta regularmente con el tiempo hasta que el máximo de tolerancia a la congelación es alcanzado a los 20 días (Weiser *et al.*, 1990).

Las estrategias actuales para alcanzar el entendimiento de la tolerancia a heladas se han focalizado en los procesos de aclimatación al frío. El inicio de estos trabajos se fundamentó en el desarrollo de análisis comparativos. Estos análisis comparativos revelaron que durante la aclimatación al frío se suceden varios cambios bioquímicos y fisiológicos (Gilmour *et al.*, 1988; Guy *et al.*, 1985).

En este sentido, muchos de los programas de mejora realizados en este tema sobre guisante se han basado en los avances realizados en otras especies vegetales. En concreto, en leguminosas los factores involucrados en la aclimatación al frío influyen en la expresión de proteínas de estrés al frío (Xin y Browse, 2000), en la acumulación de azúcares, particularmente sucrosa (Strand *et al.*, 1996; Hekneby *et al.*, 2006), observando un incremento de la ruta de síntesis de sucrosa durante la aclimatación al frío (Guy *et al.*, 1992; Holiday *et al.* 1992; Pérez *et al.*, 2001; Strand *et al.*, 2003). Dichos factores también favorecen la acumulación de otros crioprotectores, como prolina (Xin y Browse, 1998; Wanner y Junttila, 1999; Bravo *et al.*, 2001) y almidón, mientras que se han detectado niveles reducidos de sucrosa fosfatasa sintasa en relación al proceso de aclimatación al frío (Hekneby *et al.*, 2006), así como también producen

modificaciones en la composición lipídica de la membrana (Uemura y Steponkus, 1994; Dalmannsdóttir *et al.*, 2001).

El avance de la biología molecular, sus herramientas y la aparición de diversas técnicas han fomentado el estudio del proceso de aclimatación al frío en guisante desde diferentes puntos de vista a lo largo del tiempo.

De este modo, entre los primeros trabajos en este campo, destacan los basados en técnicas Northern Blot, para poder confirmar hipótesis planteadas anteriormente mediante bases genéticas. La acumulación de solutos, el aumento de la membrana entre otros son cambios celulares típicamente asociados a la aclimatación al frío (Levitt, 1980), los cuales contribuyen a incrementar el contenido en materia seca. Weiser *et al.* 1990, detectaron la acumulación del glucanos en la pared celular, en forma de celulosa, acompañada de un incremento comparable de polisacáridos peptídicos en la pared celular (RFOs, *Raffinose Family of Oligosaccharides*), mediante ensayos Northern Blot. También encontraron un pronunciado el aumento de arabinosa en los cultivares con dureza invernal durante la aclimatación. Igualmente aumentó el contenido en ARNm de extensina e hidroxiprolina de pared celular (Weiser *et al.*, 1990) y sobre todo acumulación de ARNm extensina. En un estudio más dirigido, Cheng-Che *et al.* (1998) describen al gen *peaci11.8* como un gen de respuesta a la baja temperatura en guisante.

Con el cambio de siglo y el desarrollo exponencial de numerosas técnicas las perspectivas de estudio del proceso de aclimatación aumentan, permitiendo observar este proceso desde la transcriptómica y la proteómica mediante diferentes aproximaciones metodológicas.

En un análisis de carbohidratos realizado mediante valoraciones de reacciones enzimáticas (Bourion *et al.*, 2003) se demostró que bajo condiciones de aclimatación pero baja intensidad de luz las plantas no se aclimatan. La radicación fotosintética afecta a la acumulación de materia seca. El incremento de azúcares solubles en tolerantes al igual que la concentración de almidón aunque en menor medida que los azúcares solubles (Pollok y Lloyd, 1987) proponiendo los autores que quizá esta acumulación sea un precedente para el subsiguiente cese de la fotosíntesis (Savithc *et al.*, 1997), pero siempre con la necesidad de un mínimo de intensidad de luz (Bourion *et al.*, 2003).

Taylor *et al.* (2005) analizaron el impacto de varios estreses abióticos en el proteoma mitocondrial de guisante mediante análisis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) y Q-TOF MS (Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry) encontrando que frente a los procesos de aclimatación se incrementaban las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90), no se acumulaban productos de peroxidación lipídica (MDA: malondialdehído) pero el metabolismo foliar se vio claramente y causaron modificaciones oxidativas de las proteínas mitocondriales. También detectaron cambios en las enzimas serín-hidroximetiltransferasa y glicina descarboxilasa que las hacía susceptibles rompiéndose, e inhibiendo las rutas de transporte y primarias, y potenciando el reemplazo de proteínas.

La aclimatación al frío ha sido asociada a varios procesos como la estabilización osmótica celular, cambios en la composición lipídica de membrana, aumento de antioxidantes, activación del metabolismo primarios como fotosíntesis y/o biosíntesis de nuevas proteínas (Uemura *et al.*, 1995; Prasad, 1996; Sharma *et al.*, 2005). Además se han encontrado patrones contrarios, de acuerdo con el frío, observados previamente en diferentes líneas de guisante tanto bajo condiciones de campo (Tomashow, 1999) como controladas (Bourion *et al.*, 2003). Mediante electroforesis 2D e identificación proteínas mediante ESI (*Electrospray Ionisation*) se han separado proteínas expresadas constitutivamente en líneas de guisante tolerantes y susceptibles a heladas, proteínas ligadas a la aclimatación por frío, proteínas relacionadas con la respuesta a heladas, y relacionadas con la resistencia a heladas (Dumont *et al.*, 2011).

Estos avances en el entendimiento del proceso de aclimatación a frío en guisante, tanto a nivel bioquímico como a nivel de regulación de la transcripción, permiten asentar las bases genéticas y focalizar de una forma más dirigida cualquier programa de mejora con el objetivo de encontrar variedades de guisante con dureza invernal con rendimientos competitivos y de calidad.

Además, estos avances en la proteómica asociada a la aclimatación al frío favorecen igualmente los avances en otras fases de la mejora del guisante asociada a la dureza invernal. Un ejemplo de estos avances es la detección de QTL asociados a la dureza invernal ligados estrechamente a marcadores moleculares, favoreciendo la aplicación de MAS, pero en el cual los marcadores moleculares aparecen ligados a GTMs cuya función es conocida e involucrada en la calidad de la semilla, como es el caso del *loci Tri* ligado a uno de los QTL asociados al daño por heladas (Lejeune-Henaut *et al.*, 2008).

El avance en la transcriptómica del guisante asociado a respuestas a diferentes condicionantes ha permitido el análisis comprensivo del transcriptoma de esta especie, llegando a ser presentada como modelo bioquímico vegetal con una cobertura en los transcritos casi completa en relación a tejidos aéreos (Frassen *et al.*, 2011).

El desarrollo de las aplicaciones biotecnológicas para el estudio de estreses abióticos y bióticos en otras especies de leguminosas no sólo ha aportado en el pasado, sino que sigue aportando nuevas perspectivas de trabajo y enfoques novedosos para ser aplicados en la comprensión del proceso de aclimatación al frío en guisante (Dita *et al.*, 2006). Aplicaciones basadas en metodologías clásicas como el cultivo *in vitro* han avanzado y han permitido desarrollar y aplicar técnicas más precisas y dirigidas como el cultivo de tejidos, la variación somaclonal y mutagénesis dirigida *in vitro*, la selección *in vitro*, la obtención de doble-haploides, las técnicas de hibridación interespecífica o de transformación genética. A la vez, el desarrollo de otras ciencias y su mayor accesibilidad permiten avanzar en la comprensión de problemáticas complejas, como es caso de la dureza invernal en guisante, en este sentido la aportación de la transcriptómica, la proteómica o la metabolómica puede ser valiosa.

Por otra parte, no sólo ha cambiado la metodología experimental basada en biotecnología avanza, sino también el enfoque en la aplicación de esas bases biotecnológicas. El cambio se ha dirigido hacia el análisis desde un punto de vista funcional. El análisis funcional permite dar un importante paso en el control de las respuestas a estreses en plantas como es la activación o represión de la transcripción de genes (Chen *et al.*, 2002). Las técnicas basadas en *microarrays* (Schena *et al.*, 1995), librerías substractivas (Diatchenko *et al.*, 1996), el análisis seriado (Velculesco *et al.*, 1995) y la medida cuantitativa de los patrones de expresión de factores de transcripción han sido desarrolladas, además de otras técnicas más antiguas como Northern Blot, no sólo para establecer medidas cuantitativas, sino con el objetivo de entender el papel funcional de cada nivel implicado en la expresión definitiva de un rasgo de interés.

Avances en transcriptómica como futuro de la mejora del guisante

Las tecnologías post-genómicas han permitido un mayor progreso en los estudios de perfiles genéticos y han sido rápidamente integrados en el campo de la ciencia vegetal. Estas tecnologías pueden constituir una fuente valiosa para descifrar las redes regulatorias complejas, mejorando nuestro conocimiento sobre los mecanismos que subyacen en los diferentes sistemas planta-patógeno y en la identificación de genes relevantes en procesos biológicos. Entre los métodos para medir la expresión de genes en sistemas biológicos, el más preciso se basa en la PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR, Die *et al.*, 2010). Esta tecnología, RT-qPCR es, actualmente, el método más sensible para detectar ARNm (revisión en Bustin, 2000; 2002; Wong y Medran, 2005; Bustin *et al.*, 2009). Los análisis cuantitativos de la expresión de genes mediante PCR a Tiempo Real requieren del empleo de genes de referencia expresados de forma constitutiva, cuya expresión no se ve afectada por las condiciones experimentales, como control interno para normalizar las diferencias iniciales en el ADNc molde entre muestras. El uso de genes de referencia está comúnmente aceptado como la estrategia de normalización más apropiada (Hugget *et al.*, 2005). No obstante, gran cantidad de trabajos han demostrado la necesidad de analizar el gen o genes seleccionados como sistema de referencia (Udvardi *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2008, Guénin *et al.*, 2009). Como consecuencia, los genes empleados en la actualidad como referencia en el análisis qPCR en plantas son casi exclusivamente supuestos genes de referencia (Guitierrez *et al.*, 2008b).

Actualmente en guisante no se han establecido genes de referencia estables para normalizar los experimentos de cuantificación relativa, salvo por la recomendación del empleo de uno de los genes típicamente empleados en los métodos de normalización e implicado en procesos celulares básicos como 18S ARNr, entre otros, o la combinación de varios genes similares (Die *et al.*, 2010).

Parece claro que es necesario comprobar la estabilidad de la expresión del gen o genes seleccionados dentro del rango de condiciones para cada experimento concreto. En este caso, la bibliografía demuestra

que la selección de los genes de referencia empleados en cada estudio debe ser específica del factor a evaluar.

Mapeo de QTL asociados a la dureza invernal y estreses asociados

Los estudios de mapeo QTL y los estudios de asociación se han convertido en enfoques cada vez más extendidos para examinar detalladamente el determinismo genético de muchos rasgos con importancia económica en la mejora vegetal. En un primer avance se obtuvieron poblaciones con segregación específica sobre los rasgos objeto de estudio que segregaban para los diferentes rasgos de interés. Para relacionar los resultados obtenidos en las diferentes poblaciones para rasgos idénticos o distintos, el desarrollo de herramientas comunes para aplicar marcadores moleculares se vuelve esencial. La disponibilidad de marcadores moleculares con elevado polimorfismo, específicos de *locus*, de transferencia sencilla y de bajo coste distribuidos a través del genoma completo es de gran valor (Loridon *et al.*, 2005).

Waddington (1943) sugirió en una controvertida carta a la revista Nature que a pesar de que existía verdadera diferencia entre la variación poligénica “determinada por numerosos genes” y la variación oligogénica “determinada por pocos genes”, esto no implicaba que el tipo de genes implicados fuera diferente. Mucho tiempo después, Robertson (1985) enfatizó esta idea sugiriendo que la variación oligogénica podría ser el resultado de un gran número de mutaciones, y que la variación poligénica el resultado de mutaciones con efecto menor, en los mismos genes. En realidad, estudios más recientes proponen que los QTL identificados informan acerca de genes conocidos por tener efectos drásticos en fenotipos mutantes que podrían tener control sobre variación en rasgos cuantitativos (Aubert *et al.*, 2006). Thévenot *et al.* (2005) mostraron que varios genes relacionados con el metabolismo del carbono e identificados como mutantes deficientes en almidón en maíz eran buenos candidatos para el control de QTL de las actividades enzimáticas correspondientes al igual que en la composición de carbohidratos en el grano.

Con el desarrollo de mapas de ligamiento moleculares y las aplicaciones estadísticas para el mapeo de QTL, es posible identificar y etiquetar *loci* que controlan genéticamente rasgos complejos. El mapeo de QTL proporciona información sobre el número mínimo de *loci* genéticos que pueden estar involucrados en la determinación de un rasgo fenotípico, las localizaciones en el mapa genético de esos *loci* y la estimación de los efectos de esos *loci* sobre los valores del rasgo, información que es potencialmente útil para el mejorador (Timmerman-Vaughan *et al.* 2005). Los marcadores moleculares asociados con QTL pueden resultar útiles para la mejora mediante MAS. Además, el mapeo de QTL ofrece la posibilidad de aplicar el clonaje basado en mapa para identificar los genes subyacentes a *loci* genéticos (Peters *et al.*, 2003). Los estudios de mapeo de QTL examinando rasgos correlacionados y complejos identifican con frecuencia QTL coincidentes. En guisante, los QTL coinciden para la madurez relativa de la planta y la

resistencia en campo a *Acochyta blight*, dos rasgos que mostraron correlaciones fenotípicas (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002). Por tanto, el mapeo de QTL también proporciona información de las bases genéticas de correlaciones fenotípicas.

En uno de los primeros estudios de QTL en guisante, cinco genes mostraron determinar el carácter de semilla rugosa en mutantes bien conocidos. Los cinco genes codifican para enzimas implicadas en la síntesis de almidón: enzima ramificante de almidón I (*r*, Bhattacharrya *et al.*, 1990), ADPglucosa pirofosforilasa (*rb*, Martin and Smith, 1995), plastidial fofoglucomutasa (Harrison *et al.* 1998), sucrosa sintasa (*rug4*, Craig *et al.*, 1999), y almidón sintasa de unión al gránulo II (*rug5*, Craig *et al.*, 1998). Otros genes, incluyendo los codificantes para AGPasa, PepC, y AAP1, tuvieron efectos drásticos en el tamaño de semilla y su composición cuando su expresión fue alterada en leguminosas transgénicas (Rolletschek *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005).

En guisante se han estudiado las características de un único gen potencialmente relacionado con el rendimiento, incluyendo la genética de la floración, la respuesta al fotoperiodo, y la arquitectura de la planta mediante metodología genética clásica (revisión en Weller *et al.*, 1997; Beverisge *et al.*, 2003). El mapeo de QTL proporciona la oportunidad de ampliar los resultados de los estudios genéticos clásicos. Los estudios sobre QTL en guisante han analizado el color y peso de la semilla (Timmerman-Vaughan *et al.*, 1996; McCallum *et al.*, 1997), el desarrollo de la arquitectura de la planta (Dirlewanger *et al.*, 1994; Tar'an *et al.*, 2003), la capacidad de ramificación (Rameau *et al.*, 1998) y la resistencia a enfermedades (Pilet-Nayel *et al.*, 2002; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002).

El máximo desarrollo de este enfoque basado en la localización de QTL sobre mapas de ligamiento en guisante ha estado vinculado estrechamente al estudio de resistencias frente a diferentes estreses abióticos. En este sentido, la mayoría de los trabajos realizados según este enfoque plantean como objetivo final la aplicación de sus resultados a MAS.

Entre los diferentes estreses bióticos sobre los que se han realizado estudios de QTL, destacan los provocados por dos hongos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, causante de la rabia en guisante, y *Mycosphaerella pinodes*, causante de la ascoquitosis. En el caso de *Fusarium oxysporum* se han detectado diferentes razas causantes de patogénesis y, diversos autores han vinculado la resistencia a dichas razas a diferentes grupos de ligamiento en el mapa genético de guisante. Por ejemplo, la resistencia a la raza 1 se ha asociado al gen *Fw* en LGIII (McClendon *et al.*, 2002), raza 5 asociada a *Fwf* en LGII (Coyne *et al.*, 2000). En un estudio más extenso sobre la raza 2, se han encontrado QTL ligados a LGIII (Fnw3.1 y Fnw3.2) y a LGIV (Fnw4.1), y se ha demostrado el estrecho ligamiento entre cada uno de estos QTL a diferentes marcadores moleculares: Fnw3.1 entre *AD81*, *AD180* y *AC30*, Fnw3.2 entre *Ab64* y *Le*, Fnw4.1 entre *AC22* y *AD61* (McPhee *et al.*, 2012). Con respecto a *Mycosphaerella pinodes*, se han encontrado numerosos QTL asociados a la resistencia ante este patógeno, desde los primeros trabajos (Clulow *et al.*, 1991; Dirlewanger *et al.*, 1994; Onfroy *et al.*, 1999; Wroth, 1998, 1999; Xue *et al.*, 1998),

basados principalmente en la descripción de la enfermedad y su vinculación genética básica, hasta otros más completos (Bretag y Ramsey, 2001; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002; Tar'an *et al.*, 2003; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2004).

En base a la descripción del gen *er-1* en guisante de resistencia a *Erysiphe pisi* (Timmerman *et al.*, 1994), otro trabajo posterior sitúa *er* en LGVI y lo asocian a varios marcadores RAPD y SCAR (Janila y Sharma, 2004). En relación a la resistencia a *Uromyces pisi* Barilli *et al.* (2010) describieron un QTL asociado a la resistencia frente a este patógeno con 65% varianza explicada en LGIII de guisante. Con relación a otros patógenos, se han descrito resistencias a *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* en LGII VI y VII (Hunter *et al.* 2001; Fondevilla *et al.*, 2011).

En resumen, se han realizado esfuerzos significativos en la mejora para la resistencia a enfermedades bajo condiciones continentales y oceánicas donde es sembrado principalmente en primavera (Cousin, 1997). Sin embargo, la prevalencia relativa y la importancia de las diferentes enfermedades varían con las condiciones agroecológicas. En áreas con inviernos templados y primaveras secas, como los ambientes mediterráneos, los tipos de guisante de primavera son sembrados en otoño (Rubiales *et al.*, 2009). Desafortunadamente, se han realizado pocos esfuerzos en la mejora del guisante para analizar las típicas limitaciones de estos ambientes, tales como jopo (*Orobanche crenata*), roya (*Uromyces pisi*), oidio (*Erysiphe pisi*) y ascoquitosis (*Mycosphaerella pinodes*).

El enfoque actual en la mejora aplicada es el aprovechamiento de las herramientas tecnológicas para desarrollar mayor número de marcadores cada vez mejores para permitir MAS con la esperanza de que esto acelere el desarrollo de cultivares mejorados para el agricultor. Hasta la fecha, sin embargo, el progreso en el desarrollo de marcadores y la obtención de marcadores útiles ha sido lento. Ahora también nos enfrentamos a un progreso acelerado en la investigación genómica y biotecnológica, lo cual podría proporcionarnos el entendimiento esencial de algunos mecanismos de desarrollo esenciales tanto en las especies parasitarias como en las plantas hospedadoras (Rubiales *et al.*, 2009). La aplicación del conocimiento adquirido a partir de la investigación genómica básica y la ingeniería genética puede contribuir a la mejora del guisante más rápida.

En general, las escasas fuentes genómicas desarrolladas para leguminosas de invierno y la limitada saturación de las regiones genómicas asociadas a supuestos QTL hacen difícil la identificación de marcadores altamente ligados y la determinación de la posición precisa de los QTL (Rispaill *et al.*, 2009, Rubiales *et al.*, 2009a en Rubiales *et al.*, 2009b). La efectividad de MAS podría aumentar en un corto periodo de tiempo con la adopción de nuevos avances en la tecnología de marcadores con la integración del mapeo comparativo y la genómica funcional. Podría resultar clave la saturación de mapas genéticos con marcadores localizados en regiones genéticamente activas y genes que permitan detectar la expresión de QTL (eQTL) para una selección mediante MAS fiable.

Puesto que la prevalencia de muchas de las enfermedades, tanto de origen fúngico como de origen bacterianos, se ven afectadas por el adelanto en la fecha de siembra, es importante tener en cuenta los avances en el entendimiento de la patogénesis asociadas a estos estreses bióticos, así como en la obtención de QTL y marcadores con aplicación en MAS.

La investigación molecular enfocada a las secuencias genómicas de miles de especies e individuos dentro de especies transformará nuestro actual entendimiento de la magnitud, distribución y significado funcional de la variación genética en poblaciones naturales (Allendorf *et al.*, 2010, en Ghafoor y McPhee, 2011). Por consiguiente, deberíamos tener un mapa de carreteras sobre el cual las herramientas genómicas y los enfoques sean los más apropiados para utilizar en los diferentes aspectos de la biología molecular, especialmente en el fortalecimiento de la mejora para estreses bióticos y abióticos (Ribaut *et al.*, 2008).

3. 6. Otros recursos en la mejora genética del guisante

La sintenia como recurso de la mejora genética del guisante

Las investigaciones realizadas en otras especies incluyendo especies modelo como *Arabidopsis thaliana* como modelo general y *Medicago truncatula* como modelo específico de leguminosas, al igual que los trabajos realizados bajo otros estreses nos sirven como herramienta básica para poder intuir la función de determinados genes o incluso su implicación bajo el stress y en nuestra especie a estudio bien por ortologías en las secuencias o bien por paralogía en la función de dicho gen o familia génica. Este trabajo de carácter fundamental permite acelerar el proceso de búsqueda de genes de interés mediante el diseño de cebadores degenerados con el objetivo de secuenciar dichos genes en nuestra especie. Dichas secuencias tienen diferentes aplicaciones dependiendo del enfoque del trabajo a realizar, por un lado su secuenciación y la búsqueda de diferencias en dicha secuencia entre diferentes líneas de guisante nos permitirían su anclaje en un mapa de ligamiento y, por otro lado, su secuencia permite crear sistemas de amplificación los cuales mediante ensayos de cuantificación (qPCR) ayudan a conocer el patrón de expresión de dicho gen bajo nuestras condiciones estresantes. (López *et al.*, 2008).

Una importante herramienta para la explotación de la genética del guisante es el empleo de genómica comparativa. El pequeño genoma de leguminosas como *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*, taxonómicamente relacionadas con guisante (Doyle *et al.*, 1997) puede proporcionar una vía para eludir los problemas de escala en el genoma.

La diferencia en el tamaño del genoma entre guisante (4×10^9 pb por genoma haploide) y *M. truncatula* (5×10^8 pb por genoma haploide) permite a esta última especie tener un uso potencialmente interesante como leguminosa modelo donde la secuenciación de la disposición de genes es posible. La información de *M. truncatula* puede emplearse para reforzar el desarrollo del mapa funcional de guisante, garantizando la correcta conservación de la sintenia entre las especies. Así mismo, una segunda

aplicación conlleva el diseño de nuevas parejas de cebadores tras la búsqueda de posibles ortólogos de los genes de guisante mapeados en las bases de datos de EST para *M. truncatula* (Aubert *et al.*, 2006).

Los estudios de sintenia han demostrado un nivel elevado de conservación del contenido en genes y la asignación a los grupos de ligamientos entre los genomas de guisante y *M. truncatula* (Gualtieri *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004; Aubert *et al.*, 2006) y entre guisante y *M. sativa* (Kalo *et al.*, 2004).

Los estudios de mapeo comparativo como recurso en la mejora del guisante

Los estudios de mapeo genético comparativo revelan las diferencias y similitudes en contenido de genes y su orden entre dos géneros pertenecientes a diferentes taxones (Kaló *et al.*, 2004). En los últimos 30 años el mapeo de ligamiento comparativo ha demostrado que, dependiendo de la distancia taxonómica entre ellas, las plantas han mantenido un número mayor o menor de regiones conservadas en sus genomas durante la evolución (Paterson *et al.*, 2000). Los genes dentro dichas regiones conservadas serán colineares si se comparan bien mediante métodos físicos o bien con métodos genéticos, incluyendo el análisis de secuencia completo. En tanto en cuanto la secuenciación completa de los genomas aún no está completa, los mapas genéticos con un número suficiente de *loci* genéticos adecuados pueden servir como fuente de información para las comparaciones genómicas. Generalmente, a mayor número de *loci* empleados en los estudios comparativos, se obtiene mayor precisión en el análisis de la sintenia. Sin embargo, no todos los *loci* son apropiados para tales análisis: sólo aquellos que poseen el apropiado grado de similitud genética (basado en la hibridación en el análisis directo de la secuencia) y son únicos o están presentes en un reducido número de copias, pueden ser legítimamente empleados. Las relaciones entre genes en especies relacionadas fueron analizadas inicialmente mediante la comparación de las propiedades de sus productos proteicos (por ejemplo marcadores basados en isoenzimas o alozimas), pero posteriormente se ha podido relacionar con las secuencias de ADN. La similitud de secuencia por sí sola (grado de identidad), sin embargo, resulta muchas veces insuficiente para permitir esbozar las conclusiones correctas sobre la filogenia genética, desde el punto de vista en que la evolución de los genomas puede enmascarar las relaciones entre *loci* homólogos. Las secuencias homólogas pueden ocupar localizaciones cromosómicas sinténicas (“ligamiento conservado” o “co-linearidad”; Erlich *et al.*, 1997) al ser comparadas con otros homólogos que parecen haber sido recolocados en una posición diferente dentro del mapa (homólogos no sinténicos).

Las leguminosas han sido objeto del análisis genético comparativo desde que Vavilov (1992) introdujo la Ley de las series homólogas de variación. Las comparaciones entre guisante (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris*) (Weeden *et al.*, 1992), guisante y garbanzo (*Cicer arietinum*) (Simon y Muehlbauer 1997), judía mungo (*Vigna radiata*) y el caupí (*Vigna unguiculata*) (Menancio-Hautea *et al.*, 1993), judía mungo y frijón flamenco (*Lablab purpureus*) (Humphry *et al.*, 2002) y entre varias leguminosas

papilionáceas (Choi *et al.* 2004^a, 2004b) han permitido establecer la evidencia del orden genético conservado.

La extensa co-linearidad entre los mapas de alfalfa (*Medicago sativa*) y guisante ha permitido la identificación de genes homólogos sinténicos (Kaló *et al.*, 2004), siendo este grado de co-linearidad único entre dicotiledóneas debido, a pesar de la diferencia significativa en el tamaño de su genoma, a la presencia de un escaso número de reordenaciones cromosómicas tras su divergencia. El elevado grado de conservación del orden genético entre los genomas de guisante y alfalfa posibilita la explotación de la información sinténica y permite transferir información desde la leguminosa modelo con menor genoma, *Medicago truncatula*, a *P. sativum*, una leguminosa cultivable con un mayor genoma.

3. 7. Selección de líneas de guisante mejoradas

La selección de plantas en una población segregante que contiene las combinaciones apropiadas de genes es un componente crítico de cualquier programa de mejora de cultivo (Robout *et al.*, 1997; Ribaut y Hoisington, 1998; Tibaut y Betran, 1999; Weeden *et al.*, 1994). Desde que los mejoradores vegetales trabajan con grandes poblaciones (Witcombe y Virk, 2001), la técnica MAS puede incrementar la eficiencia y eficacia de la selección en mejora vegetal en comparación de los métodos convencionales. Una vez que los marcadores que están estrechamente ligados a los genes de interés son identificados, los mejoradores puede usar marcadores basados en ADN específicos como herramienta de diagnóstico en la identificación de plantas que llevan los genes o QTL objetivo previo a la evaluación en campo de un número elevado de plantas (Michaelmore, 1995; Ribaut *et al.*, 1995).

El empleo de tecnología basada en marcadores depende de la disponibilidad de sistemas de marcadores apropiados y estos son muy limitados en la mayoría de las leguminosas (Kumar *et al.*, 2011) debido a que el uso de MAS no es preferente para los mejoradores vegetales clásicos debido a su pobre reproducibilidad, falta de experiencia en algunas técnicas (Gupta *et al.*, 2010). Debido a la intervención de los sistemas de marcadores moleculares modernos, los marcadores basados en PCR han sido populares entre los mejoradores debido a que estos marcadores pueden ser fácilmente empleados en el genotipado de grandes poblaciones segregantes de una manera efectiva en coste y con unas necesidades de infraestructura mínimas. Debido a la alta reproducibilidad y robustez de los marcadores basados en PCR los mejores tradicionales han adoptado recientemente el uso de marcadores para MAS (Gupta *et al.*, 2010). En otros muchos cultivos, éstos han sido utilizados de forma extensiva (Kumar *et al.*, 2010), pero su empleo es aún limitado en leguminosas (Varshney *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2010). Entre las varias aplicaciones de la tecnología del ADN en mejora, la más prometedora para el desarrollo de cultivares es la MAS que ha sido llevada a cabo con éxito en varios cultivos de leguminosas como soja, judía común y guisante (Torres *et al.*, 2010).

La técnica de MAS ahorra tiempo y fuentes de investigación valiosas mediante la eliminación de evaluaciones fenotípicas indeseables que pueden ser influidas fuertemente por efectos ambientales. La selección puede hacerse a nivel de plántula incluso para rasgos con baja herencia. Desde que se ha empleado MAS para rasgos cuantitativos, se requieren varios marcadores, marcadores flanqueantes fuertemente ligados deben ser los seleccionados (Collard *et al.*, 2005). Sin embargo, Ribaut y Betran (1999) sugieren no usar más de 3 QTL, mientras que, hay informes de más de 5 QTL han sido sometidos a introgresión en tomate (*Lycopersium esculentum*) vía MAS (Hittalmani *et al.*, 2002).

El coste de emplear MAS comparado con la mejora convencional vegetal varía considerablemente entre estudios dependiendo del cultivo y de la naturaleza de los rasgos de interés. Dreher *et al.* (2003) indicó que el coste-efectividad necesita ser considerado caso por caso. Los factores que afectan al coste relacionado con MAS para QTL incluyen, el número de QTL controlando el rasgo, el método de evaluación fenotípica (Por ejemplo, campo, invernadero, cámara de crecimiento), coste de labores y conste de consumibles. En algunos casos, la evaluación fenotípica es más barata comparada con MAS (Bohn *et al.*, 2001; Dreher *et al.*, 2003). Sin embargo, en otros casos la evaluación fenotípica requiere más tiempo y labores de ensayo intensivas. Así que el uso de MAS puede ser preferido. Algunos estudios que conllevan marcadores para la resistencia a enfermedades han demostrado que una vez que los marcadores han sido desarrollados (en judías para resistencia a CBB) y establecidos para MAS, puede ser más barato que los métodos convencionales (Yu *et al.*, 2000). En algunas situaciones, la evaluación fenotípica puede llevar mucho tiempo y, por tanto, el uso de marcadores puede ser más barato y preferible (Young, 1999).

Un aspecto importante de MAS que no es mostrado frecuentemente es que los marcadores pueden ser más baratos de usar, pero conllevan un coste inicial grande y experiencia en su desarrollo. Una estimación del coste del desarrollo de un marcador único realizada hace más de 10 años indicó que el coste ascendía a 64.000 € (Landridge *et al.*, 2001). Pero con el avance en la tecnología de marcadores moleculares el proceso se estima en ser completado en 6 semanas con el coste aproximado de 4.000 € por tanto, los bajos costes y la duración de la experimentación reducida refuerzan el uso de técnicas de secuenciación de nueva generación para el desarrollo de SSR que representan una herramienta poderosa para estudios de genética de poblaciones (Csencsics *et al.*, 2010). Para reducir costes en el desarrollo de estos marcadores, la elevada similitud filogenético ha fomentado a los investigadores a transferir marcadores SSR de un cultivo a otro (Datta *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2010). Los marcadores procedentes de la tecnología de matrices de diversidad (DArT: *Diversity Arrays Technology*) han sido considerados como muy útiles para MAS debido a su bajo coste (Wenz *et al.*, 2010).

La identificación de polimorfismos moleculares dando lugar a variabilidad de rasgos fenotípicos, tanto cuantitativos como cualitativos, es el principal objetivo de la investigación agronómica actual. Las diferentes aproximaciones tales como el clonaje posicional o el etiquetado de transposones (revisión en Morgante y Salamini, 2003), al igual que la aproximación de genes candidatos (Bhattacharya *et al.*,

1990; Martin y Smith, 1995; Byrne *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1999; Frewen *et al.*, 2000; Thornsberry *et al.*, 2001; Osterberg *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2002; Foucher *et al.*, 2003) ha sido utilizada para descubrir genes subyacentes a la variación fenotípica en plantas. El etiquetado de genes y la selección asistida por marcadores, MAS, para resistencia a enfermedades ha progresado hasta el punto donde la selección indirecta para resistencia de un número de principales enfermedades es ahora rutinario en programas de mejora de judía tanto en EEUU como en resto del mundo (Ghafoor y McPhee, 2011).

La genómica comparativa y los análisis de sintenia con leguminosas estrechamente relacionadas, junto con el mapeo intensivo de genes de resistencia análogos (RGAs), podrá revelar nuevos genes candidatos y marcadores seleccionables para su empleo en MAS.

Capítulo II

Objetivos



Capítulo II. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el contribuir al desarrollo y aplicación de herramientas moleculares útiles para la mejora genética de guisante proteaginoso, vinculándose con las actividades relacionadas con el programa para la obtención de nuevas variedades desarrollado en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

La consecución de este objetivo general se plantea a través de tres aproximaciones aplicables a dicho programa de mejora, para cada una de las cuales se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis exploratorio del fondo genético de una colección de germoplasma de trabajo representativa del género Pisum.

Objetivo 1.1: Estudiar la variabilidad genética presente en la colección y su influencia en la estructura y organización de la misma en relación a la taxonomía del género y de factores relacionados; el origen geográfico y evolutivo, el tipo o estatus de las accesiones y caracteres morfológicos.

Objetivo 1.2: Analizar la información aportada por distintos tipos de marcadores moleculares en el estudio de variabilidad e influencia en la detección de su estructura de forma independiente y global.

2. Estudios preliminares relacionados con el mapeo genético necesario para la aplicación de marcadores moleculares como apoyo en selección asistida.

Objetivo 2.1: Obtener mapas de ligamiento parciales en tres poblaciones segregantes para caracteres agronómicos de interés y elaboración de un mapa compuesto a partir de ellos.

Objetivo 2.2: Detectar y mapear QTL relacionados con caracteres agronómicos de interés: rendimiento y algunas de sus componentes, fenología, tolerancia a heladas, morfología.

3. Determinación, mediante estudio de la expresión génica, de genes candidatos relacionados con procesos de aclimatación y tolerancia a helada.

Objetivo 3.1: Analizar la expresión diferencial a bajas temperaturas de genes previamente publicados potencialmente involucrados con procesos de adaptación y endurecimiento.

Objetivo 3.2: Vincular la regulación observada con posibles diferenciales de tolerancia a heladas, determinando el efecto regulador de la temperatura de aclimatación en los niveles de expresión sobre los diferentes genotipos.

Objetivo 3.3: Relacionar los genes candidatos con los QTL asociados a la tolerancia a heladas y otros caracteres agronómicos de interés, y con marcadores moleculares mapeados que puedan ser susceptibles de ser empleados en selección asistida.

Capítulo III. Materiales y métodos

1. Estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones

1. 1. Materiales para el estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones

Material vegetal empleado

Todas las líneas se obtuvieron gracias a donaciones de los bancos de germoplasma pertenecientes a diferentes centros de investigación: *United States Department of Agriculture* (USDA), *Institut National de Recherche Agronomique* (INRA), *John Innes Centre* (JIC), Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CRF) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y el propio Instituto Tecnológico de Castilla y León (ITACyL). La información de los datos de pasaporte y caracterización de cada una de las accesiones se obtuvo a partir de las bases de datos disponibles de los bancos de germoplasma donantes y otros relacionados:

John Innes Centre: <http://www.jic.ac.uk/germplas/Pisum/index.htm>

USDA Germoplasm System: <http://www.ars-grin.gov/npgs/germform.html>

CRF (INIA): <http://wwwx.inia.es/crf/WWWCRF/CRFesp/>

Nordic GeneBank: <http://www.nordgen.org/>

A partir del código de registro de cada línea de guisante en el banco de germoplasma origen de la donación, y con ayuda de las bases de datos disponibles, se creó una base datos propia para incluir información sobre cada línea seleccionada. Esta matriz incluyó sus datos de pasaporte en relación a clasificación taxonómica, el número de registro del banco donante, correspondencia con números de registro de otros bancos de germoplasma, códigos de donación y año, el origen en cuanto a país y región, el tipo de material (cultivar, especie local, silvestre, etc.), e información básica de evaluación y caracterización.

Posteriormente se añadieron dos columnas; una columna de observaciones en la que se incluyeron comentarios sobre informaciones contradictorias entre las diferentes bases de datos, y otra columna en la

que se asignaron los rangos taxonómicos en base a la clasificación propuesta por Maxted y Ambrose (2000), para unificar las diferencias en la clasificación realizada por los diferentes bancos de germoplasma y bases de datos. Sin embargo, en los análisis de diversidad y de estructura de poblaciones se mantuvieron todos los taxones como especies, en grupos independientes, hasta establecer su rango taxonómico en base a nuestros propios resultados.

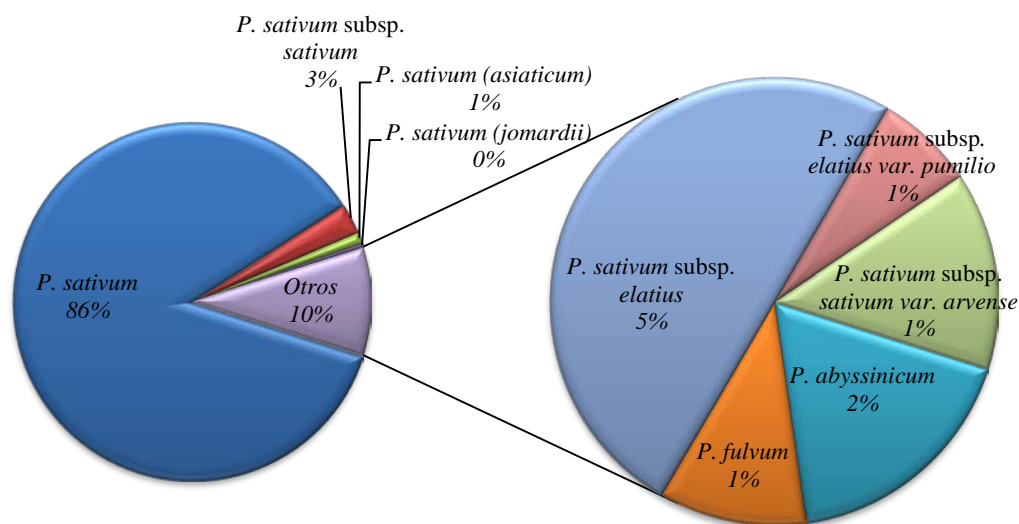


Figura III.1. Distribución de taxones dentro de la muestra a estudio

Se seleccionaron un total de 288 líneas pertenecientes al género *Pisum*. Entre todas las líneas, 40 líneas correspondían a accesiones del género *Pisum*, agrupando diferentes taxones dentro del género, excluyendo a *P. sativum*. Las 244 líneas de guisante restantes pertenecían al taxón *P. sativum* y correspondían a cultivares, ecotipos, líneas silvestres y líneas comerciales. La descripción detallada de cada una de las líneas seleccionadas se resume en el [Anexo III.1](#).

En relación a la distribución geográfica, la muestra agrupaba líneas de diferentes orígenes geográficos (Figura III.2), representando a todos los continentes. Entre las diferentes accesiones que componían la muestra a estudio, un total de 58 líneas eran variedades comerciales, cuyo origen geográfico no ha sido incluido en los análisis. El resto de accesiones se correspondieron con: un 54,3% de origen europeo, un 25,2% eran accesiones asiáticas, un 10,9% de entradas americanas, el 6,5% provenían de África, y un 2,6% procedían de Oceanía.

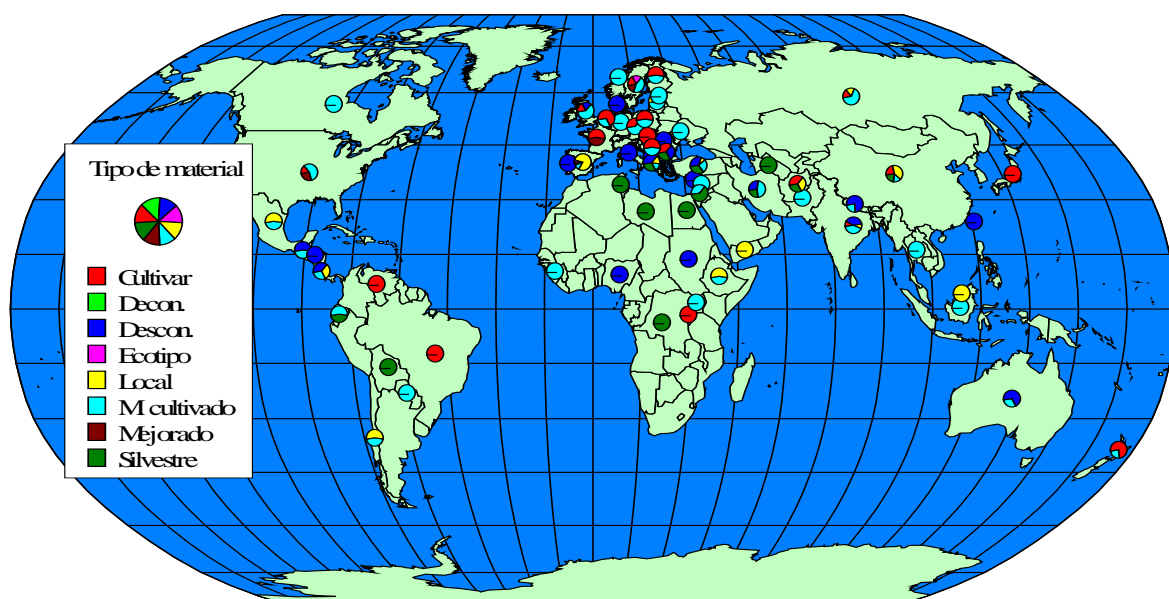


Figura III.2. Distribución geográfica de los distintos tipos de accesiones en la muestra a estudio

Marcadores moleculares seleccionados

Para realizar los estudios de variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones se procedió a una búsqueda de marcadores moleculares específicos de guisante, basados en secuencia conocida, publicados en los últimos años. A partir de varias publicaciones (Timmerman-Vaughan *et al.*, 1993; Gilpin *et al.*, 1997; Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006) se obtuvo un primer grupo de marcadores moleculares a analizar en nuestras muestras. Este primer grupo estaba constituido por SSR, RBIP, ASP, CAPS, dCAPS, Size y STS ([Anexo III.2](#)).

Se partió de una colección de 293 SSR, obtenida a partir del listado de 309 microsatélites definido por Loridon *et al.*, (2005), de un total de 56 RBIP descritos en Jing *et al.*, (2005) y de un grupo de 87 GTMs definidos en un conjunto de publicaciones: 24 STS (Timmerman-Vaughan *et al.*, 1997; Gilpin *et al.*, 1997; Weeden *et al.*, 1998) y de 6 ASP, 39 CAPS, 4 dCAPS y 14 Size descritos por Aubert *et al.*, (2006).

Se realizó una primera selección en base a la revisión bibliográfica realizada en función del tamaño de amplificación y la posible identificación de todos los alelos.

En segundo lugar se comprobó la correcta amplificación de los marcadores seleccionados, probando en un conjunto de 95 de las líneas obtenido al azar entre las 288 que componían nuestra muestra. Se incluyó un control negativo, NTC (*No Template Control*), para comprobar la ausencia de amplificaciones inespecíficas. Se eliminaron aquellos marcadores que amplificaron de forma inespecífica o cuyo patrón de bandas no fue nítido.

Finalmente, para la realización del estudio poblacional y los análisis de diversidad fueron seleccionados aquellos marcadores moleculares que presentaran, al menos, polimorfismo bialélico. El

listado final de marcadores seleccionados para ser analizados en el conjunto de línea de guisante se compuso de 31 RBIP, 20 SSR y 32 GTM (Tabla III.1).

Tabla III.1. Listado de marcadores moleculares seleccionados en el estudio de diversidad

	<i>Locus</i>	Tipo		<i>Locus</i>	ER	Tipo	<i>Locus</i>	Tipo	
1	<i>1006NR13</i>	RBIP	1	<i>AgpS1</i>		ASP	1	<i>A9</i>	SSR
2	<i>1006NR2</i>	RBIP	2	<i>AgpI1</i>	<i>Sna</i> I	CAPS	2	<i>AA175</i>	SSR
3	<i>1006NR32</i>	RBIP	3	<i>AgpS2</i>	<i>Sna</i> I	CAPS	3	<i>AA200</i>	SSR
4	<i>1006-x19</i>	RBIP	4	<i>Aldo</i>		Size	4	<i>AA278</i>	SSR
5	<i>1006-x21</i>	RBIP	5	<i>Clpser</i>		Size	5	<i>AA285</i>	SSR
6	<i>1006-x50</i>	RBIP	6	<i>Egl1</i>		Size	6	<i>AA321</i>	SSR
7	<i>1006-x58</i>	RBIP	7	<i>Gbsts1</i>		ASP	7	<i>AA335</i>	SSR
8	<i>1794-1</i>	RBIP	8	<i>Gbsts2</i>		ASP	8	<i>AA345</i>	SSR
9	<i>1794-2</i>	RBIP	9	<i>M27</i>	<i>Hinf</i> I	STS	9	<i>AA72</i>	SSR
10	<i>1794-x9</i>	RBIP	10	<i>Nin</i>	<i>Nru</i> I	CAPS	10	<i>AB100</i>	SSR
11	<i>2055NR1</i>	RBIP	11	<i>Nlm</i>	<i>Mae</i> III	CAPS	11	<i>AB113</i>	SSR
12	<i>2055NR51</i>	RBIP	12	<i>NTH1</i>		ASP	12	<i>AB119</i>	SSR
13	<i>2055NR53</i>	RBIP	13	<i>P108</i>	<i>Taq</i> I	STS	13	<i>AB122</i>	SSR
14	<i>2385-x56</i>	RBIP	14	<i>P628</i>	<i>Hinf</i> I	STS	14	<i>AB130</i>	SSR
15	<i>281-x1</i>	RBIP	15	<i>Pip1</i>	<i>Bspl</i> 19I	CAPS	15	<i>AB23</i>	SSR
16	<i>281-x40</i>	RBIP	16	<i>Pore</i>		ASP	16	<i>AC58</i>	SSR
17	<i>281-x44</i>	RBIP	17	<i>Ppgm</i>		Size	17	<i>AC76b</i>	SSR
18	<i>281-x5</i>	RBIP	18	<i>PsAAP2</i>		Size	18	<i>AD134</i>	SSR
19	<i>399-9x</i>	RBIP	19	<i>PsAAT1</i>		Size	19	<i>AD146</i>	SSR
20	<i>399-x131</i>	RBIP	20	<i>PSAS1</i>	<i>Ehe</i> I	CAPS	20	<i>D21</i>	SSR
21	<i>45-x31</i>	RBIP	21	<i>PSAS2</i>	<i>Rsa</i> I	CAPS			
22	<i>64-x14</i>	RBIP	22	<i>Q126</i>		STS			
23	<i>64-x29</i>	RBIP	23	<i>Sbe2</i>	<i>Eco</i> RI	CAPS			
24	<i>64-x76</i>	RBIP	24	<i>sM2P5-234</i>		STS			
25	<i>95-x2</i>	RBIP	25	<i>sN13-927</i>		STS			
26	<i>95-x19</i>	RBIP	26	<i>sO12-581</i>		STS			
27	<i>95-x25</i>	RBIP	27	<i>Sps</i>	<i>Rsa</i> I	CAPS			
28	<i>95-x43</i>	RBIP	28	<i>sT11-800</i>		STS			
29	<i>Birte-x16</i>	RBIP	29	<i>Sugtrans</i>		Size			
30	<i>Birte-x34</i>	RBIP	30	<i>Sut1</i>		Size			
31	<i>Birte-x5</i>	RBIP	31	<i>Tip</i>	<i>Hae</i> III	CAPS			
			32	<i>Xyft</i>		Size			

ER: Enzima de restricción

1. 2. Metodología aplicada en el estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones

Obtención del ADN vegetal

Todas las accesiones empleadas en este trabajo fueron sembradas bajo condiciones de invernadero. Las condiciones de siembra consistieron en la preparación de bandejas con 24 macetas de 9 × 9 cm en cada una y un sustrato compuesto de una mezcla de turba:arena:vermiculita en relación 2:1:1. En cada maceta se sembraron 5 semillas correspondientes a una accesión. Todas las líneas del ensayo fueron sembradas al mismo tiempo y manteniéndose en invernadero bajo condiciones controladas con un fotoperiodo de 10/14 h (luz/oscuridad), a una temperatura de 20/14°C con riego frecuente. Se mantuvieron estas condiciones hasta alcanzar un desarrollo vegetativo de dos hojas en las accesiones.

Al alcanzar el estado mínimo de dos hojas, se tomó como muestra para la extracción de ADN 100 mg de tejido foliar, o estípulas en el caso de líneas semiáfílas, procedentes de al menos tres plantas de la misma línea. Cada muestra de tejido se recolectó de forma independiente y se guardó en un tubo de 1,5 mL estéril. La toma de muestras se realizó por duplicado para cada línea, una de las muestras era la muestra de trabajo y la otra muestra se guardó como reserva de material vegetal. Todas las muestras fueron tratadas inmediatamente con nitrógeno líquido, para pasar posteriormente a su almacenamiento a -80°C hasta el momento de su utilización.

Extracción de ADN a partir de muestra vegetal

El aislamiento de ADN se llevó a cabo mediante el protocolo “Norm’s Mini Mix: DNA Isolation Microprep”, basado en el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990) y obtenido a través del USDA-ARS (Pullman, WA).

El procedimiento parte de las hojas muestreadas a las que se añadió el tampón de extracción (2% CTAB (p/v), 1M Tris pH 8.0, 5M NaCl, 0.5M EDTA y 0.4% β-mercaptoetanol). Se realizó la rotura mecánica de las muestras mediante un homogeneizador FastPrep-24 (MP Biomedicals, Francia). Para favorecer la liberación de los ácidos nucleicos, se incubaron las muestras en agitación a 65°C durante 1-2 horas. La precipitación de los restos celulares se realizó mediante la adición de 700 µL de cloroformo:isoamílico 24:1, seguida de centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos. Para degradar el ARN se incubaron las muestras 30 minutos a 37°C con 30mg/ml de RNasa. La precipitación del ADN se llevó a cabo mediante la adición de 1 mL de etanol frío al 95% durante 30 min a 4°C. Tras la precipitación se centrifugó a 8.000 rpm durante 15 min y se añadió etanol al 70% para la limpieza del ADN obtenido. Tras una última centrifugación, de 15 min a 8.000 rpm, y eliminar el etanol, se obtuvo un precipitado de ADN para eluir.

Tras eluir las muestras en 150 μL de tampón TE (1M Tris-0.5M EDTA), se realizaron diluciones 1:10 de cada una de las muestras. Las eluciones originales fueron almacenadas a -80°C , para garantizar su estabilidad, hasta su utilización.

Cuantificación del ADN y preparación del ADN de trabajo

La cuantificación de ADN y el control de calidad de las diluciones 1:10, se realizó mediante espectrofotometría con un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Tras comprobar la calidad y cantidad del ADN obtenido se prepararon diluciones de trabajo a una concentración de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Desarrollo experimental con marcadores moleculares

Preparación de los marcadores de trabajo

En base a la secuencia de los marcadores moleculares previamente publicados por otros autores, la síntesis de los cebadores se obtuvo a través de Eurofins MWG Operon (Alemania). Todos los cebadores se reconstituyeron con agua estéril libre de nucleasas (SIGMA-Aldrich, EEUU) a una concentración de 100 μM , a excepción de los RBIP, que se reconstituyeron a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se mantuvieron como solución madre a -20°C . Las diluciones de trabajo se realizaron con agua libre de nucleadas (SIGMA-Aldrich, EEUU) hasta una concentración final de 20 μM previamente, con excepción de los RBIPs, que se diluyeron hasta 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$, tal y como se sugiere en (Flavell *et al.*, 2003).

Condiciones de amplificación

Las reacciones de amplificación mediante PCR se realizaron basándose en las mezclas descritas previamente por los diferentes autores y optimizando las concentraciones para obtener una resolución óptima con las menores concentraciones posibles. Se redujo al máximo el volumen de reacción hasta 15 μL . En cambio, para aquellos marcadores moleculares que requerían una posterior digestión enzimática (CAPS, dCAPS y STS), el volumen final se mantuvo a 25 μL , lo que permitió realizar una comprobación de la presencia de producto de amplificación, previa a la digestión.

Las concentraciones de los reactivos para cada uno de los tipos de marcadores se presentan en las siguientes tablas (Tabla III. 2 y III. 3).

La enzima empleada para todas las reacciones fue AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, EEUU) y la concentración de dNTPs utilizada siempre se preparó en relación a la concentración de cada uno de los cuatro dNTPs.

La preparación de la mezcla de reactivos se realizó en cabinas de flujo laminar, separando siempre el ADN del resto de componentes de la reacción. Se procedió a añadir el ADN en último lugar siempre, completando la reacción en una cabina separada para evitar contaminaciones cruzadas.

Tabla III.2. Mezclas de reacción para marcadores moleculares ASP, Size, CAPS, dCAPS y SSR

	ASP [] final (1)		Size [] final (1)		(d)CAPS [] final (1)		SSR [] final (2)	
Cebador 1	0,2	μM	0,2	μM	0,2	μM	2,0	μM
Cebador 2	0,2	μM	0,2	μM	0,2	μM	2,0	μM
Cebador 3	0,2	μM						
Cebador 4	0,2	μM						
Buffer	1	X	1	X	1	X	1	X
MgCl₂	1,5	mM	1,5	mM	1,5	mM	1,5	mM
dNTPs	0,2	mM	0,2	mM	0,4	mM	0,2	mM
Taq pol	1,2	U	1,2	U	1	U	0,6	U
H₂O MQ								
ADN	20	ng	20	ng	20	ng	20	ng

(1): Aubert *et al.*, (2006); (2): Loridon *et al.*, (2005)

Tabla III.3. Mezclas de reacción para marcadores moleculares RBIP y STS

	STS [] final (3)		STS [] final (4)		STS [] final (5)		RBIP [] final (6)	
Cebador 1	0,1	μM	0,5	μM	0,1	μM	1,6	ng/μL
Cebador 2	0,1	μM	0,5	μM	0,1	μM	1,6	ng/μL
Cebador 3							1,6	ng/μL
Buffer	1	X	1	X	1	X	1	X
MgCl₂	2,0	mM	1,5	mM	2,5	mM	1,5	mM
dNTPs	0,2	mM	0,2	mM	0,2	mM	0,2	mM
Taq pol	1	U	1	U	0,6	U	0,6	U
H₂O MQ								
ADN	40	ng	30	ng	20	ng	30	ng

(3): Timmerman-Vaughan *et al.*, (1993); (4): Weeden *et al.*, (1998); (5): Gilpin *et al.*, (1997); (6): Flavell *et al.*, (2003)

Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las indicadas por los autores que diseñaron cada tipo de marcador, tal y como se describen en las Tablas III.4 y III.5:

Tabla III.4. Condiciones de amplificación para marcadores ASP, Size, CAPS, dCAPS y SSR

	ASP [] final (1)		Size [] final (1)		(d)CAPS [] final (1)		SSR [] final (2)	
	T ^a	T _p	T ^a	T _p	T ^a	T _p	T ^a	T _p
Desnaturalización	92°C	50 s	92°C	50 s	94°C	50 s	95°C	30 s
Anillamiento	55°C	50 s	55°C	50 s	T ^a An	50 s	T ^a An	30 s
Amplificación	72°C	3 min	72°C	3 min	72°C	2 min	72°C	30 s
Nº de ciclos	35		35		35		35	
Extensión Final	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

(1): Aubert *et al.*, (2006); (2): Loridon *et al.*, (2005); T^a An: temperatura de anillamiento

Tabla III.5. Condiciones de amplificación para marcadores ASP, Size, CAPS, dCAPS y SSR

	STS (3)		STS (4)		STS (5)		RBIP(6)	
	T ^a	T _p	T ^a	T _p	T ^a	T _p	T ^a	T _p
Desnaturalización	95°C	1 min	94°C	1 min	95°C	1 min	95°C	1 min
Anillamiento	60°C	1 min	T ^a An	2 min	65°C	1 min	T ^a An	1 min
Amplificación	72°C	1 min	72°C	4 min	72°C	1 min	72°C	1 min
Nº de ciclos	40		38		40		35	
Extensión Final	72°C	8 min	72°C	6 min	72°C	8 min	72°C	7 min

(3): Timmerman-Vaughan *et al.*, (1993); (4): Weeden *et al.*, (1998); (5): Gilpin *et al.*, (1997); (6): Flavell *et al.*, (2003); T^a An: temperatura de anillamiento

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo, indistintamente, en los diferentes termocicladores disponibles: GeneAmp 9700 y Veriti (Applied Biosystems, EEUU), o Mastercycler-gradient (Eppendorf, Alemania).

Digestión enzimática de los productos de amplificación

Para todos los CAPS, dCAPS y STS descritos por Gilpin *et al.*, (1997) y Weeden *et al.*, (1998), se separó una alícuota de 10 µL, de los 25 µL iniciales, para comprobar la correcta amplificación del producto de PCR obtenido. La digestión enzimática del producto de amplificación se llevó a cabo sobre el volumen restante de 15 µL.

Tabla III.6. Condiciones de restricción para cada una de las enzimas empleadas

ER	Tampón	BSA	T ^a Activ (°C)	T ^a Inact (°C)
<i>BsTB</i> I	4	No	65	No
<i>Eco</i> RI	U (<i>Eco</i> RI)	No	37	65
<i>Ehe</i> I	2	Si	37	65
<i>Hae</i> III	2	No	37	80
<i>Hinf</i> I	2	No	37	80
<i>Mae</i> III	1	No	37	65
<i>Nru</i> I	3	No	37	65
<i>Rsa</i> I	1	No	37	65
<i>Sna</i> I	3	No	37	No
<i>Taq</i> I	3	Si	65	80

La enzima de restricción, ER, correspondiente a cada marcador molecular específico se adicionó a los 15 µL restantes siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (NEB, Reino Unido), tal y como se indica en la Tabla III.6. Tras examinar la intensidad de banda en comparación de un patrón de referencia, se estableció que consideró que la cantidad de ADN del producto final de amplificación era de aproximadamente 1 µg. Los cálculos de la concentración de enzima necesaria y la cantidad de tampón se estimaron en función de 1 µg de ADN a digerir:

Tan solo se realizó una pequeña modificación sobre el tiempo de incubación, el cual se extendió hasta 2 horas en agitación, para favorecer la digestión completa del producto de amplificación obtenido.

Condiciones de electroforesis y resolución

Todos los productos de amplificación obtenidos a partir de los marcadores moleculares fueron resueltos mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. La tinción se realizó mediante una solución de bromuro de etidio a 5 mg/mL. Para la visualización y fotografiado de los geles se utilizó el transiluminador Gel Doc XR Gel Documentation System (BioRad).

Los productos procedentes de la amplificación con SSR requirieron una resolución mayor que el resto de marcadores, de modo que se utilizó agarosa de alta resolución al 3,5% en TBE al 1×. Los productos de amplificación del resto de marcadores no requirieron agarosa de alta resolución, por lo que se empleó agarosa convencional. Las condiciones de electroforesis se ajustaron a las diferencias de tamaño esperadas según el tipo de marcador, así los RBIP se resolvieron en geles al 2%, y para el resto de marcadores se utilizaron geles al 1,5%. En este último caso también se incluyeron los productos de amplificación digeridos con enzimas de restricción.

Creación de las matrices de resultados

A partir de los patrones de bandas obtenidos para cada accesión y cada uno de los marcadores moleculares se establecieron los diferentes alelos observados para cada *loci*. La nomenclatura establecida se basó en el tamaño de cada alelo, asignando por orden alfabético una letra a cada una de las bandas obtenidas. De forma que, el alelo de mayor tamaño correspondió con el alelo *a* para ese *locus*, y así sucesivamente. Posteriormente, se discriminó presencia/ausencia de banda o alelos mediante la codificación 1, presencia de banda o, 0, ausencia. De esta forma se configuró la matriz fenotípica. En base al carácter codominante común a todos los marcadores, descrito en guisante por diferentes autores (Gilpin *et al.*, 1997; Flavell *et al.*, 1998; Aubert *et al.*, 2006; Smukal *et al.*, 2008; Jing *et al.*, 2010), se estableció el genotipo de cada una de las accesiones evaluadas, y se transfirieron los resultados a una matriz de datos diploides para su análisis, constituyendo así la matriz genotípica.

Las matrices fenotípica y genotípica fueron las matrices de partida para diseñar los archivos de entrada específicos para cada programa utilizado en el análisis estadístico.

1. 3. Análisis estadístico

Análisis descriptivo de la variabilidad genética

Estudio de la variabilidad genética en función de los marcadores moleculares

La matriz genotípica resultante fue objeto de diferentes análisis estadísticos, con el objetivo de evaluar la variabilidad de la muestra a estudio y las relaciones entre los individuos o grupos de individuos dentro de la muestra en función a su distancia o similitud genética.

Los análisis iniciales se basaron en un estudio descriptivo de la variabilidad genética en función del número observado de alelos, del porcentaje de *loci* polimórficos, del número efectivo de alelos y del índice de Shannon. El cálculo de todos estos parámetros se realizó a través de diferente software y en base a las definiciones realizadas por diversos autores.

El número medio de alelos por *locus* (n_a): definido como la media del número de alelos obtenido para cada *locus* en una población o muestra.

El número efectivo de alelos (n_e) se define como el recíproco de homocigosidad (Kimra y Crow, 1963) y se corresponde con:

$$n_e = \frac{1}{\sum x_i^2}$$

Siendo x_i la frecuencia alélica: la frecuencia de cada alelo del *locus*.

Para establecer el porcentaje de *loci* polimórficos se fijó el criterio del 95%, según el cual un *locus* se considera polimórfico si la frecuencia del alelo mayoritario no supera el valor máximo de 0,95.

Los *loci* en los que algún alelo presentó frecuencia 1 o 0 dentro de los grupos a estudio fueron descritos como *loci* fijados para ese grupo concreto.

La medida de la diversidad génica para cada *locus* se calculó en base al índice de Shannon (I) (Shannon y Weaver, 1949), según la ecuación:

$$I = - \sum_{i=1}^n p_i \log[p_i]$$

Donde p_i es la frecuencia genotípica relativa del *locus* i -ésimo para cada grupo y n es el número de genotipos.

Todos los estadísticos descritos fueron calculados mediante el programa para el análisis genético de poblaciones, de carácter libre, POPGENE v1.32 (Yeh y Boyle, 1997).

Estudio de la variabilidad genética en función de la ordenación taxonómica

Para estudiar la distribución de la variabilidad genética dentro y entre los taxones del género *Pisum* se estimaron dos índices de diversidad: el índice de polimorfismo (P_j) y el índice de heterocigosidad (H_j). Además, se realizaron análisis de la varianza molecular (AMOVA: *Analysis of MOlecular VAriance*).

El índice de polimorfismo (P_j) se define como el polimorfismo de cada *locus* en cada una de las poblaciones (Brown *et al.*, 1980):

$$P_j = \sum_{i=1}^n p_i (1 - p_i) = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i -ésimo y n el número de alelos observados para cada *locus* en cada grupo.

En base a este índice se calculó para cada grupo el valor medio del polimorfismo (P_S). Análogamente se estimó el polimorfismo para el conjunto de la muestra a estudio (P_T), considerando a todas las accesiones analizadas como pertenecientes a un único grupo. De este modo se pudo analizar la distribución de la variabilidad genética total (P_T) e intra-grupal (P_S). Por otra parte se asumió que:

$$P_T = P_S + D_{ST}$$

De forma que D_{ST} corresponde al índice de diversidad que mide la diferencia existente entre los distintos grupos de la muestra a estudio (Nei, 1973). Su valor se podría interpretar como la variabilidad inter-muestral.

La magnitud relativa de la diferenciación génica entre subpoblaciones puede ser medida mediante el coeficiente de diferenciación, G_{ST} (Nei, 1973), el cual ofrece una medida relativa de la diferencia entre poblaciones con respecto al polimorfismo total, y corresponde a:

$$G_{ST} = D_{ST} + P_T$$

Por último, la relación D_{ST}/P_S permite comparar la diversidad entre los grupos y dentro de cada grupo (Brown, 1979).

El índice de heterocigosidad, H_j , o diversidad genética por *locus* (Brown *et al.*, 1978) asume que en una población con cruzamiento al azar donde x_i es la frecuencia del alelo i -ésimo para cada *locus*, la heterocigosidad de dicho *locus* viene determinada por la ecuación:

$$H_j = \sum_{i=1}^n x_i^2$$

Donde n es el número de alelos de dicho *locus*. La heterocigosidad media, H , es la media de este valor para todos los *loci*.

Al igual que en el caso del índice de polimorfismo P_j , también se ha calculado el valor medio de la heterocigosidad de cada grupo, H_S , y el valor global de la heterocigosidad de todos los individuos de la muestra a estudio, H_T , para los distintos *loci* analizados en todos los grupos.

En la determinación del grado de variabilidad dentro de cada grupo, entre muestras y de modo global, teniendo en cuenta el índice de heterocigosidad se han analizado parámetros equivalentes a los calculados para el índice de polimorfismo P_j :

$$D'_{ST} = H_T - H_S$$

En este caso, a diferencia de D_{ST} , D'_{ST} se corresponde con la distancia genética estándar de Nei basada en la corrección en función del tamaño muestral (Nei, 1978).

Los estadísticos F permiten el análisis de estructura en poblaciones subdivididas. También puede emplearse para medir la distancia genética entre las subpoblaciones, un concepto que se fundamenta en la idea de que aquellas subpoblaciones que no presentan apareamiento entre sí tendrán frecuencias alélicas diferentes a las de la población total. La distancia F_{ST} por parejas puede ser utilizada como herramienta de la distancia genética entre poblaciones. Este índice puede ser calculado en base al índice de heterocigosidad:

$$F_{ST} = 1 - \left(H_S / H_T \right)$$

De forma que este índice estadístico refleja el grado de diferenciación génica entre las poblaciones en función de las frecuencias alélicas. Los valores próximos a 0 corresponden a un grado de diferenciación mínimo es decir, panmixia, que va en aumento según se ve incrementado el valor de F_{ST} .

Los valores F_{ST} pueden representarse en una matriz que muestre el grado de diferenciación presente entre pares de grupos definidos dentro de la muestra analizada, de tal modo que permita comparar los grados de diferenciación entre todos los grupos a estudio.

El análisis de varianza molecular, AMOVA, se basa en un modelo jerárquico o anidado. Se diferencia de un análisis de varianza (ANOVA) en que puede contener diferentes suposiciones evolutivas sin

modificar la estructura básica del análisis y que la hipótesis utiliza métodos de permutación que no requieren la suposición de una distribución normal.

Este análisis de varianza molecular se puede calcular en función del estadístico F_{ST} en base a datos genotípicos. Si se asume que la muestra a estudio está estructurada en grupos que a su vez se pueden dividir en poblaciones, los cálculos se basan en los indicados en la Tabla III. 7:

Tabla III.7. Características del cálculo de AMOVA en poblaciones

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SSD)	Cuadrados medios esperados
Entre grupos	$G - 1$	SSD (G)	$n'' \sigma_a^2 + n' \sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre poblaciones de los grupos	$P - G$	SSD P(G)	$n \sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Dentro de las poblaciones	$2N - P$	SSD E(P(G))	σ_c^2
Total	$2N - 1$	SSD (T)	σ_T^2

G: entre grupos, P: entre poblaciones, E: entre entradas, T: total

Donde σ es el componente de la covarianza asociada al grupo, a , a la población, b , o a la entrada, c . G corresponde al número de grupos, P al número de poblaciones y N al número de individuos analizados.

Se comprobó la significatividad de los índices de fijación mediante una aproximación basada en permutaciones no paramétricas descritas en Excoffier *et al.*, (1992), tras las permutaciones se recalculan los estadísticos hasta obtener su distribución nula. El número de permutaciones realizado ha sido de 1.500, número suficientemente elevado como para obtener un grado de precisión adecuado en la probabilidad final, tal y como se sugiere en el manual del programa de análisis de genética de poblaciones, de carácter libre, Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

En base a los cálculos realizados, y a la comparación entre la suma de los cuadrados observada y esperada, se obtuvo la varianza de los componentes, y por tanto el porcentaje de variación debido a las variabilidad de cada nivel de estructuración de la muestra a estudio.

Todos los estadísticos descritos fueron calculados mediante el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

Estructura de la población a nivel genético

Análisis exploratorio: aplicación de un método basado en distancias

La estructura de la población se ha analizado en base a un modelo basado de distancias descrito por Link *et al.*, (1995) para establecer las relaciones entre grupos definidos dentro de la población. Los grupos dentro de la colección a estudio se han definido en función de los resultados obtenidos en el apartado anterior, en función de taxones.

El método basado en distancias descrito por Link *et al.*, (1995) permite obtener la distancia genética a través del siguiente modelo matemático:

$$GD_{xy} = \frac{N_x + N_y}{N_x + N_y + N_{xy}}$$

Donde N_x es el número de bandas en la línea x pero no en la línea y, N_y es el número de bandas en la línea y pero no en la x, y N_{xy} es el número de bandas que comparten las líneas x e y.

Mediante un análisis de remuestreo, *bootstrap*, se puede alcanzar intervalo de confianza en las filogenias, y, de hecho, es un tipo de análisis estadístico para comprobar la precisión de las ramas de una árbol evolutivo (Efron and Gong, 1983; Felsenstein, 1985; Swofford *et al.*, 1996). Fijando un *bootstrap* de $S = 1.000$ en nuestros análisis, el programa TREECON *for Windows* v1.3b (Van de Peer y De Wachter, 1994) generó 1.000 matrices de distancia, a partir de las cuales obtuvo los correspondientes dendrogramas y tras su comparación mostró el árbol filogenético más fiable.

El algoritmo utilizado para la construcción del dendrograma fue el basado en *Neighbor-Joining*, NJ, (Saitou and Nei, 1987; Studier and Kepler, 1988). Este algoritmo se relaciona con los métodos de agrupamiento, pero no asume que la tasa de evolución sea la misma para todas las accesiones y crea un árbol sin raíz. En el método NJ, se construye una matriz de distancias modificada en la que la separación entre cada pareja de nodos es ajustada en base a su divergencia media del resto de nodos. Este algoritmo resulta estadísticamente consistente bajo diversos modelos de evolución. Atteson (1997) probó que si cada entrada en la matriz de distancias difiere de la distancia real en menos de la mitad de la longitud de la rama más corta del árbol, entonces NJ reconstruirá el árbol real con elevada probabilidad.

Todos los análisis se han llevado a cabo mediante el programa libre de construcción y dibujo de árboles evolutivos de distancia TREECON *for Windows* v1.3b (Van de Peer y De Wachter, 1994).

Análisis exploratorio: aplicación de un método basado en modelos paramétricos

Con el objetivo de establecer el número de grupos en los que se estructuraba la muestra a estudio y obtener la distribución y el grado de pertenencia de las accesiones a cada grupo se utilizó un método basado en modelos paramétricos con ayuda del programa de carácter libre STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000).

Muchos estudios (Pritchard y Donnelly, 2001; Rosenberg *et al.*, 2001; Manel *et al.*, 2002; Turakov y Easteal, 2003 (revisión en Evanno *et al.*, 2005) han probado la eficiencia del programa STRUCTURE en la asignación de individuos a sus poblaciones de origen (aunque la mayoría se basaron en simulaciones con un número limitado de poblaciones y ausencia de dispersión entre las mismas).

STRUCTURE adopta el método Bayesiano mediante especificación de modelos (*priors*) $\Pr(Z)$ y $\Pr(P)$, para ambos Z y P , siendo Z el número de grupos y P las frecuencias alélicas en las poblaciones. El método bayesiano permite un marco coherente para incorporar la incertidumbre inherente de la estimación de parámetros dentro del procedimiento de inferencia y también para evaluar la fuerza de la evidencia de los agrupamientos inferidos. Conociendo las frecuencias alélicas (P) y el número de poblaciones (Z), pudimos calcular la probabilidad de nuestros datos bajo el modelo $\Pr(X|Z,P)$, donde X son los datos muestreados.

En este modelo bayesiano existen K grupos, cada grupo caracterizado por un conjunto de alelos para cada *locus*. El programa permite obtener el estimado de la probabilidad logarítmica de los datos $\Pr(X|K)$ para cada valor de K , permitiendo la estimación del número más probable de grupos. Para establecer el número de grupos que componen una muestra puede utilizarse ΔK (Evanno *et al.*, 2005), una cuantificación *ad hoc* relacionada con la tasa de cambio de segundo orden de la probabilidad logarítmica de los datos con respecto al número de grupos, que resulta ser un buen predictor del número real de grupos.

Los análisis se han realizado seleccionando el modelo *admixture*, el cual permite considerar accesiones mezcladas mediante el parámetro Q . Este parámetro denota la proporción de mezcla de cada accesión, ofreciendo una cuantificación de cómo de probable es para cada individuo su pertenencia a cada grupo. Este modelo además, permite interpretar la existencia de un grupo ancestral a partir del cual se originen el resto de grupos, ya que asumimos que puede existir la posibilidad de que individuos puedan presentar ascendencia mezclada, es decir, que cada alelo genotipado proviene de una u otra de las k poblaciones (Pritchard 2000 y Falush, 2007).

Durante el análisis se han supuesto frecuencias alélicas correlacionadas, lo cual asume que las poblaciones divergen de una ancestral, pero permite la deriva. El modelo aplicado ha sido el modelo F descrito por Falush *et al.* (2003), el cual es análogo a F_{ST} descrito por Wright (1951) ya que permite reconocer señales de estructuración más sutiles a partir de los estimados F_{ST} . Este modelo asume que la mayoría de los individuos clasificados como poseedores de un ecotipo particular poseen un linaje puro de ese tipo, pero que una pequeña proporción de individuos puede tener una proporción de su linaje procedente de un ecotipo alternativo, es decir, serían híbridos. Los individuos clasificados como híbridos mostrarán además elevada *admixture* estimada, lo que implicaría que hay concordancia entre los dos análisis.

Por último, se han realizado los análisis en base a los datos moleculares. También se ha empleado la opción de agregar información sobre las poblaciones, en este caso datos de pasaporte. Esta información previa, junto con las frecuencias alélicas correlacionadas, permite asignar a ciertos individuos con a una población u a otra con mayor precisión.

Se ha utilizado STRUCTURE para, en primer lugar, determinar el número de grupos que componen la colección a estudio utilizando ΔK como predictor del número real de grupos. Para desarrollar el análisis se estableció un periodo de *burnin* de 10.000 y tras este periodo siguieron 10.000 repeticiones del algoritmo de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC: *Markov Chain Monte Carlo*). Se seleccionó el modelo *admixture*, para estimar tasas de mezcla para cada accesión para agrupar individuos dentro de poblaciones en base a datos y frecuencias genotípicas mediante agrupamientos iterativos por subgrupos (Pritchard *et al.*, 2000). Todos los análisis se han llevado a cabo para la subdivisión de la muestra entre 3 y 20 poblaciones, y en todos los casos con un número de repeticiones igual a 10.

Para comprobar la base estadística de la evidencia de flujo genético entre los grupos se usa la opción USEPOPINFO (Pritchard 2000), con GESBACK 3, MIGPRIOR 0,001 y un análisis de poblaciones mediante modelo F.

Por último, tras establecer el número de poblaciones K, se realizó un análisis bajo 100.000 MCMC iteraciones tras 100.000 *burnin*, manteniendo el resto de condiciones, para obtener un gráfico final en función del parámetro Q. Este parámetro permitió estimar los coeficientes de asignación de cada accesión a una población. Los valores F_{ST} permitieron determinar el grado de panmixia entre las poblaciones obtenidas y establecer la estructura de la colección estudiada.

El método basado en modelos paramétricos mediante agrupamiento bayesiano se ha llevado a cabo para la muestra global de forma similar a lo aplicado en el modelo basado en distancias, es decir, se ha realizado para todos los marcadores moleculares en global, y de forma separada para RBIP, SSR y GTM. Además se ha realizado el análisis incluyendo información geográfica y fisiológica para determinar si existe agrupación de las líneas bajo estos condicionantes.

Genética de poblaciones

Análisis de variabilidad genética en la estructura poblacional

A partir de los resultados obtenidos mediante el método basado en modelos paramétricos se definieron los grupos que englobaban la muestra. Se estimó la heterocigosis esperada para cada *loci* en cada uno de dichos grupos. Por último se representó gráficamente el número de alelos en relación a los *loci* de cada uno de los grupos definidos y la heterocigosis esperada para cada *loci*. Para las representaciones gráficas se empleó el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

Estudio de la diversidad genética: agrupación y ordenación

Una de las medidas de la distancia genética más ampliamente aplicada es la basada en el índice de identidad de Nei (1972). Este índice ha sido utilizado en gran número de trabajos y define que para un único *locus* con n alelos la identidad genética es:

$$I_n = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{(\sum x_i^2 \sum y_i^2)}}$$

Donde x e y son las frecuencias del alelo i -ésimo para el *locus* j -ésimo en las poblaciones X e Y respectivamente.

La distancia genética basada en este índice de identidad, distancia genética de Nei (1978), se define como:

$$D_n = -\ln(I_n)$$

El cálculo de este índice así como la obtención de la matriz de distancias se obtuvo mediante el programa POPGENE v1.32 (Yeh y Boyle, 1997).

El algoritmo utilizado como método de agrupamiento fue UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) que asume la misma tasa de cambio para todas las accesiones, siendo uno de los algoritmos de agrupamiento jerárquico más utilizado y el más sencillo de calcular. La obtención final de los dendrogramas se realizó indistintamente mediante los programas TreeView (Win 32) v1.6.6 (Page, 1996) y MEGA v4 (Tamura *et al.*, 2007).

Análisis factorial

El análisis en componentes principales, PCA (*Principal Component Analysis*), se encuadra dentro de los modelos factoriales basados en la reducción de la dimensionalidad de la información, es decir, de las variables. Dicha reducción se basa en la exploración para descubrir tendencias no mostradas claramente en los datos, identificar patrones fenotípicos o genotípicos dentro de la muestra. Por tanto, este método constituye en sí mismo una herramienta exploratoria.

El resultado obtenido es una nube de valores en un espacio multidimensional. Para caracterizar la tendencia mostrada por los datos, PCA extrae las direcciones en las cuáles la nube se encuentre más dispersa. A través de la combinación de las variables originales, el PCA permite reducir la dimensionalidad inicial y crear una nueva distribución de los datos en función del máximo de la varianza explicada. Esta reducción de la dimensionalidad permite la representación gráfica de los datos con el fin de detectar relaciones entre los mismos y una estructura subyacente. De este modo, un análisis en componentes principales, permite obtener nuevas variables denominadas componentes principales, CP.

Mediante el análisis de la sedimentación correspondiente al número de componentes obtenida en PCA frente al autovalor propio de cada componente se puede analizar el número de componentes representativas. El criterio de Kaiser (1960) estudia los autovalores obtenidos y determina que las

componentes representativas son aquellas que muestran autovalores superiores a 1. Sin embargo, este criterio tiende a sobrestimar el número de componentes principales. El test de *scree* propuesto por Catell (1960), conlleva el análisis gráfico en busca de un punto de inflexión en el gráfico que enfrenta el número de CP frente al autovalor de cada componente, no obstante, al contrario que el criterio anterior, este método tiende a subestimar el número de componentes a retener.

El grado de resolución se estimó mediante la medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO). El test de esfericidad de Bartlett, permite comprobar la diagonalidad de la matriz de correlación, de modo que si se rechaza la hipótesis, se demuestra que existen relaciones significativas entre las variables y por tanto el modelo factorial es adecuado.

El análisis de las comunalidades y las cargas factoriales favorece la determinación del grado de representación de las variables en el espacio de los factores.

Para facilitar la interpretación de los resultados, en los casos en los que la distribución espacial pueda no ser clara, se recurre a la rotación. Las rotaciones son movimientos de los ejes de tal manera que se mantenga la comunalidad y el porcentaje de varianza explicada por el modelo, aunque no por cada eje. Se busca que cada factor tenga unos pocos pesos altos y el resto cercanos a cero, y que cada variable este saturada en solo un factor.

Una de las transformaciones ortogonales más utilizada es la *Varimax*. Esta transformación maximiza la diferencia de varianzas entre las variables, conservando la independencia estadística de los factores.

En función de la estructura obtenida a partir del método bayesiano para la colección de germoplasma estudiada se establecieron los grupos dentro de la muestra. Sobre estos grupos se realizó el análisis en componentes principales para reducir de la dimensionalidad de los datos moleculares y representar los datos con el fin de detectar relaciones entre los distintos grupos y una estructura subyacente. El grado de resolución se estimó mediante la KMO y se comprobó la adecuación del modelo factorial a nuestra muestra a estudio mediante el test de esfericidad de Bartlett. La reducción de la dimensional se realizó aplicando el criterio de Catell y el test *scree*. Para determinar el grado de aproximación a la realidad de las variables en el espacio se realizó un estudio de las comunalidades y de las cargas factoriales. Por último, la representación gráfica se realizó en un espacio de dos dimensiones en función de las dos primeras componentes tras aplicar una rotación *Varimax*.

Todo el análisis factorial se llevó a cabo mediante el paquete estadístico *SPSS v15.0.1 for Windows* (IBM, EEUU).

Clasificación jerárquica y agrupación basada en UPGMA

El método de agrupamiento basado en modelos ha demostrado que el estadístico F puede resultar útil a la hora de establecer relaciones a nivel de distancia genética entre los grupos mediante la determinación de F_{ST} . Se estimó este estadístico en relación a cada uno de los grupos definidos. Tanto el cálculo de este estadístico como la representación gráfica de la matriz de emparejamiento en base a distancias F_{ST} se obtuvo mediante el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

Con los nuevos grupos definidos en el método basado en modelos, se procedió de nuevo al cálculo de la distancia de Nei y el agrupamiento UPGMA a partir de la matriz de distancias hasta la obtención del dendrograma global mediante los programas Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005) y MEGA v4 (Tamura *et al.*, 2007).

Ordenación mediante escalamiento multidimensional

El análisis en coordenadas principales (PCoA: *Principal Coordinates Analysis*) es un tipo de escalamiento multidimensional de tipo métrico basado en la distancia euclídea que permite visualizar similitud o distancia entre muestras. Este tipo de análisis se realizó, mediante el paquete estadístico SPSS v15.0.1 for Windows (IBM, EEUU).

PCoA trata de hallar los ejes principales a través de una matriz y como resultado se muestra la rotación de la matriz de distancias sin modificar la posición relativa de cada punto, permitiendo establecer diferencias y similitudes entre los grupos.

Los análisis de escalamiento multidimensional basados en PCoA se llevaron a cabo a partir de una matriz de distancias F_{ST} , lo que permitió asignar, para cada ítem, una localización en un espacio con un número de dimensiones reducidas.

2. Mapeo genético y análisis de QTL de importancia agronómica y asociados a tolerancia a heladas

2. 1. Materiales para el mapeo genético y análisis de QTL

Selección de poblaciones para el mapeo genético y análisis de QTL

Para la construcción de los mapas de ligamientos se partió de 3 poblaciones de mapeo: PopESP, obtenida a partir del cruzamiento de la variedad comercial “Cheyenne” y el genotipo ZP-1366, de origen turco, obtenida del banco de germoplasma del ITACyL; PopFRA, correspondiente al cruzamiento entre

los cultivares franceses “Champagne” y “Terese”; y PopUSA, obtenida mediante el cruzamiento de las variedades comerciales americanas “Medora” y “Melrose”. Las tres poblaciones se obtuvieron mediante la técnica de descendencia a partir de semilla única (*Single Seed Descent*) hasta la obtención de líneas recombinantes puras (RILs) de plantas F₆ en el caso de PopESP, F₈ en PopFRA y F₉ en PopUSA. En el caso de PopFRA, dichas RILs fueron obtenidas por el INRA y parte de su material fue donado para la realización de este trabajo, al igual que PopUSA cuyas RILs fueron obtenidas en el USDA y donadas al ITACyL. Por último, la población PopESP fue desarrollada completamente en el ITACyL como parte del programa de mejora de guisante proteaginoso desarrollado en este centro. Las poblaciones de mapeo se obtuvieron a partir de un total de 94 RILs para PopESP, 144 RILs para PopFRA y 144 RILs para PopUSA.

Las líneas parentales fueron escogidas por su polimorfismo en los rasgos objetivo, de acuerdo con diferentes observaciones realizadas en cada uno de los centros donde se desarrollaron dichas poblaciones. De tal manera, que en relación a los parentales de origen francés, Champagne es una línea forrajera derivada de una población local francesa, es tolerante a heladas y una línea con dureza invernal, utilizada antiguamente como un parental en la mejora del guisante seco de invierno en Francia. En contraste, Terese es una variedad de guisante seco de primavera francés, sensible a heladas, por lo que no suele ser capaz de sobrevivir durante el invierno en latitudes nórdicas. Champagne y Terese también contrastan en rasgos morfológicos, tales como el tipo de hoja formada (convencional y áfila, respectivamente), el color de la flor (morada y blanca, respectivamente), el color de la testa de la semilla (con o sin jaspeado), el color del hilum (negro y claro) y finalmente la longitud del entrenudo (largo y enano).

Por su parte, Medora es una variedad de siembra primaveral, mientras que Melrose es una línea utilizada en siembras otoño-invernales. Ambas difieren también en caracteres morfológicos a nivel de forma de la hoja (áfila y convencional, respectivamente), color de la flor (blanca y morada, respectivamente), longitud del entrenudo (corto y largo, respectivamente) y en la coloración de la testa de la semilla (verde y marrón con color secundario, respectivamente).

Por último, las líneas parentales de la PopESP fueron seleccionadas dentro del programa de mejora de guisante proteaginoso por su variabilidad en diversos caracteres agronómicos y en su respuesta ante diversos estreses bióticos. No obstante, también se comprobó posteriormente su variabilidad en la respuesta ante la dureza invernal, incluyéndose en los estudios relacionados con la tolerancia a heladas. De nuevo difieren también en caracteres morfológicos, ya que Cheyenne presenta flores blancas, entrenudo corto, hojas desarrolladas como zarcillos y semilla amarilla lisa sin coloración secundaria, mientras que ZP-1366 posee flores moradas, entrenudo largo, hojas convencionales y semillas de coloración verde con color secundario y forma irregular. Estas diferencias de carácter morfológico fueron también incluidas en los posteriores análisis para su inclusión en los mapas de ligamiento. Estos rasgos, siendo marcadores clásicos, resultan útiles para anclar al mapa genético a mapas de ligamiento de

guisante ya publicados (Aubert *et al.*, 2006; Ellis and Poyser 2002; Loridon *et al.*, 2005; Weeden *et al.*, 1998).

2. 2. Metodología aplicada en el mapeo genético y análisis de QTL

Toda la metodología experimental aplicada para la obtención de mapas genéticos se basó en la aplicada en el análisis de variabilidad genética y en el análisis de la genética de poblaciones, de tal manera que los métodos empleados hasta la obtención de las matrices de resultados fueron los mismos:

Extracción de ADN a partir de muestra vegetal

La extracción de ADN a partir del tejido foliar obtenido para cada uno de los parentales y las tres poblaciones RILs se realizó del mismo modo que se detalla en la obtención de ADN para el análisis de variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones ([Apartado III.1.2.1.2](#))

Tras eluir cada muestra, se realizaron diluciones 1:10. Las eluciones originales fueron almacenadas a -80°C, para garantizar su estabilidad, hasta su utilización.

Cuantificación del ADN y preparación del ADN de trabajo

La metodología corresponde a la descrita en el [Apartado III.1.2.1.2](#).

Marcadores moleculares seleccionados

Selección de marcadores moleculares para el mapeo genético

Los marcadores moleculares analizados fueron pre-seleccionados a partir del análisis de polimorfismo detectado en los parentales durante los estudios de diversidad previos.

Se incluyeron además otros marcadores moleculares amplificados en el comparativo de los parentales de cada uno de los tres cruzamientos en busca de polimorfismo. Todos los marcadores moleculares que mostraron polimorfismo entre parentales fueron analizados en la población correspondiente.

El listado de marcadores pre-seleccionados se muestra en la Tabla III.8:

Tabla III.8. Listado de marcadores pre-seleccionados para mapeo genético

Marc	Tipo	Población			Marc	Tipo	Población			Marc	Tipo	Población		
		1	2	3			1	2	3			1	2	3
<i>NTH1</i>	GTM		Si	Si	<i>A9</i>	SSR	Si			<i>AB141</i>	SSR			Si
<i>Rbcs</i>	GTM		Si		<i>AA122</i>	SSR			Si	<i>AB142</i>	SSR			Si
<i>Bfruct</i>	GTM		Si		<i>AA155</i>	SSR			Si	<i>AB146</i>	SSR		Si	Si
<i>DipeptIV</i>	GTM			Si	<i>AA160</i>	SSR		Si	Si	<i>AB23</i>	SSR	Si		
<i>P54</i>	GTM		Si	Si	<i>AA170</i>	SSR	Si			<i>AB27</i>	SSR			Si
<i>PepC</i>	GTM	Si	Si		<i>AA175</i>	SSR		Si		<i>AB31</i>	SSR	Si		

Marc	Tipo	Población			Marc	Tipo	Población			Marc	Tipo	Población		
		1	2	3			1	2	3			1	2	3
<i>Pip1</i>	GTM	Si			<i>AA176</i>	SSR			Si	<i>AB32</i>	SSR			Si
<i>PsAAP2</i>	GTM	Si			<i>AA200</i>	SSR	Si			<i>AB40</i>	SSR			Si
<i>PSAS1</i>	GTM			Si	<i>AA206</i>	SSR			Si	<i>AB53</i>	SSR	Si		
<i>PSAS2</i>	GTM	Si	Si		<i>AA258</i>	SSR			Si	<i>AB64</i>	SSR	Si	Si	
<i>Ptrans</i>	GTM	Si			<i>AA260</i>	SSR	Si			<i>AB68</i>	SSR	Si		
<i>PutTIP</i>	GTM	Si	Si		<i>AA27</i>	SSR			Si	<i>AB72</i>	SSR	Si		
<i>Sbe2</i>	GTM	Si			<i>AA278</i>	SSR	Si			<i>AB85</i>	SSR		Si	Si
<i>SS</i>	GTM	Si			<i>AA285</i>	SSR	Si		Si	<i>AC17</i>	SSR	Si		
<i>ThiolP</i>	GTM			Si	<i>AA303</i>	SSR		Si	Si	<i>AC32</i>	SSR	Si	Si	
<i>Clpser</i>	GTM	Si			<i>AA317</i>	SSR			Si	<i>AC58</i>	SSR	Si		
<i>Ga2ox</i>	GTM		Si		<i>AA321</i>	SSR	Si			<i>AC75</i>	SSR			Si
<i>Gs3B</i>	GTM		Si	Si	<i>AA332</i>	SSR			Si	<i>AC76a</i>	SSR		Si	
<i>Gsp</i>	GTM		Si		<i>AA335</i>	SSR	Si			<i>AC76b</i>	SSR	Si		
<i>Xyft</i>	GTM		Si		<i>AA345</i>	SSR	Si			<i>AC8</i>	SSR			Si
<i>L109</i>	GTM		Si		<i>AA349</i>	SSR	Si			<i>AD135</i>	SSR			Si
<i>M27</i>	GTM		Si		<i>AA355</i>	SSR	Si		Si	<i>AD146</i>	SSR	Si	Si	Si
<i>P393</i>	GTM		Si		<i>AA369</i>	SSR	Si			<i>AD146s</i>	SSR	Si		
<i>P446</i>	GTM			Si	<i>AA378</i>	SSR	Si			<i>AD147</i>	SSR			Si
<i>P482</i>	GTM	Si			<i>AA399</i>	SSR	Si			<i>AD148</i>	SSR			Si
<i>P628</i>	GTM		Si		<i>AA430902</i>	SSR			Si	<i>AD174</i>	SSR	Si		
<i>Q141</i>	GTM			Si	<i>AA446</i>	SSR	Si			<i>AD237</i>	SSR			Si
<i>Q363</i>	GTM			Si	<i>AA497</i>	SSR	Si			<i>AD270</i>	SSR	Si	Si	
<i>ST11-800</i>	GTM		Si		<i>AA5</i>	SSR		Si		<i>AD280</i>	SSR			Si
<i>SUS3</i>	GTM		Si		<i>AA505</i>	SSR			Si	<i>AD59</i>	SSR	Si		
<i>2055NR51</i>	RBIP		Si		<i>AA67</i>	SSR		Si		<i>AD61</i>	SSR	Si		
<i>2055x36</i>	RBIP	Si			<i>AA72</i>	SSR	Si		Si	<i>AD68</i>	SSR			Si
<i>281x1</i>	RBIP		Si		<i>AB100</i>	SSR	Si			<i>AD73</i>	SSR			Si
<i>281x16</i>	RBIP	Si			<i>AB109</i>	SSR		Si	Si	<i>AD79</i>	SSR			Si
<i>281x40</i>	RBIP	Si			<i>AB111</i>	SSR			Si	<i>AD81</i>	SSR	Si		
<i>281x44</i>	RBIP	Si			<i>AB112</i>	SSR	Si			<i>AF016458</i>	SSR			Si
<i>45x31</i>	RBIP	Si			<i>AB113</i>	SSR	Si		Si	<i>AF29243.2</i>	SSR	Si		
<i>64x45</i>	RBIP		Si		<i>AB114</i>	SSR			Si	<i>B14</i>	SSR	Si		
<i>BirteX5</i>	RBIP	Si	Si		<i>AB119</i>	SSR		Si		<i>CHPSGPA1</i>	SSR	Si	Si	
<i>A</i>	Morf.	Si	Si	Si	<i>AB122</i>	SSR	Si			<i>D21</i>	SSR	Si		
<i>Af</i>	Morf.	Si	Si	Si	<i>AB125</i>	SSR			Si	<i>D23</i>	SSR		Si	Si
<i>Cs</i>	Morf.	Si	Si		<i>AB130</i>	SSR	Si		Si	<i>M16903</i>	SSR			Si
<i>Le</i>	Morf.	Si		Si	<i>AB132</i>	SSR	Si			<i>PSADH1</i>	SSR		Si	Si
<i>PI</i>	Morf.		Si		<i>AB140</i>	SSR			Si	<i>PSAS</i>	SSR			Si
										<i>PSBLOX2</i>	SSR	Si		
										<i>PSGSR1</i>	SSR		Si	
										<i>PSP4OSG</i>	SSR			Si
										<i>PSRBCS3C</i>	SSR		Si	
										<i>PSU81288</i>	SSR		Si	
										<i>X51594</i>	SSR			Si
										<i>Y13321</i>	SSR			Si

Marc: marcador; Morf.: morfológico; Población 1: PopESP; Población 2: PopFRA; Población 3: PopUSA

Condiciones de reacción de PCR

Tanto las mezclas de reacción como las condiciones para cada uno de los diferentes tipos de marcadores se prepararon según se detalla en el [Apartado III.1.2.1.2](#), a partir de las diluciones preparadas según el [Apartado III.1.2.1.1](#).

Todos los ensayos de amplificación incluyeron la presencia de los parentales para la evaluación de su polimorfismo así como un NTC, como control negativo, para comprobar la ausencia de amplificación inespecífica en los marcadores analizados.

Digestión enzimática de los productos de amplificación

Para los marcadores moleculares del tipo CAPS y STS se procedió a digerir el producto de amplificación tal y como se describe en el [Apartado III.1.2.1.3](#).

Condiciones de electroforesis y Resolución

Por último, tanto la electroforesis horizontal como la resolución de los geles se realizaron del mismo modo que en el [Apartado III.1.2.1.4](#). En base a las imágenes de los geles se procedió a codificar las matrices de resultados.

Creación de las matrices de resultados

En función de los resultados obtenidos en las amplificaciones se crearon las matrices de datos para cada una de las poblaciones de mapeo. Los datos se recogieron para cada *locus* individual según presencia (1) o ausencia (0) de banda, registrándose también los datos perdidos (-). En base a esta matriz de datos alélicos se configuró la matriz de datos genotípicos, de forma que se estableció como criterio A homocigotos para el *locus* de mayor tamaño, B homocigotos para el *locus* de menor tamaño y H para definir el estado heterocigótico. La creación de la matriz genotípica se basó en la hipótesis de que todos los marcadores eran codominantes, posteriormente dicha matriz fue sometida a un análisis de segregación tal y como se indica en el [Apartado III.2.2.2.1](#).

Estas matrices de resultados permitieron crear tres archivos de entrada, *inputs*, correspondientes a cada una de las tres poblaciones de mapeo: PopESP, PopFRA y PopUSA, para su análisis estadístico.

Metodología experimental para el análisis de QTL

El entendimiento del determinismo genético para la tolerancia al frío es un pre-requisito para el desarrollo de cultivares tolerantes al frío. En este sentido, Timmerman-Vaughan *et al.* (2002) y Lordon *et al.* (2005) ya definieron a los mapas de ligamiento moleculares y al mapeo de QTL como valiosas herramientas para la caracterización genética de la resistencia y/o tolerancia a diferentes estreses bióticos

y abióticos. Permiten localizar *loci* de resistencia, e identificar marcadores ligados útiles en la selección asistida por marcadores (MAS) durante la mejora vegetal.

El desarrollo de herramientas moleculares ha permitido progresar significativamente hacia el entendimiento de la dureza invernal, el escape a la congelación y la tolerancia al frío (Frew *et al.*, 2002). Sin embargo hay que tener en cuenta dos conceptos destacados en Lejeune-Hénaut *et al.* (2008), la dureza invernal integra las respuestas interactivas al conjunto completo de estreses invernales y puede ser evaluada solo bajo condiciones de campo, mientras que la tolerancia al frío en *s. str.* suele ser evaluada bajo condiciones controladas. Teniendo en cuenta las diferencias entre dureza invernal y tolerancia a frío se diseñaron los diferentes ensayos para el análisis de QTL asociados a estos dos conceptos.

Con el objetivo de caracterizar la dureza invernal se evaluaron dos poblaciones de guisante, PopESP y PopFRA, mediante experimentos en campo. Por otro lado, para evaluar la tolerancia al frío se realizó un experimento en cámaras de ambiente controlado evaluando la población PopUSA.

Ensayo en campo

Las poblaciones PopESP y PopFRA se sembraron en dos localidades, Peñaflor y Zamadueñas, en otoño y en primavera y en dos campañas sucesivas, 2006-2007 y 2007-2008 (Tabla III.9). El diseño de todas las siembras se basó en el diseño experimental de bloques completos al azar, incluyendo todas las líneas evaluadas mediante marcadores moleculares. Para evitar una desviación en la estimación de la respuesta a la dureza invernal causada por el efecto borde se rodeó cada ensayo por una fila adicional en cada extremo de la variedad de guisante “Dove”, permitiendo así considerar cada experimento como unidad experimental neta. La definición de cada unidad experimental dentro de la matriz dependió de la semilla disponible, y por tanto de la campaña de siembra. De tal forma que en la campaña 2006-2007 cada parcela individual consistió en una fila de 1 m con 10 semillas, con una separación de 0,3 m entre filas, se realizaron ensayos en ambas localidades con dos réplicas en otoño en Zamadueñas y en Peñaflor para ambas poblaciones.

Tabla III.9. Ensayos realizados en campo

		Campaña 2006-2007		Campaña 2007-2008	
		PopESP	PopFRA	PopESP	PopFRA
Peñaflor	Otoño	2 Repeticiones	2 Repeticiones	2 Repeticiones	1 Repetición
	Primavera			2 Repeticiones	1 Repetición
Zamadueñas	Otoño	2 Repeticiones	2 Repeticiones	2 Repeticiones	1 Repetición
	Primavera			2 Repeticiones	1 Repetición

En la campaña 2007-2008, se añadieron las siembras en primavera para poder establecer una comparativa, y la unidad experimental pasó a ser una fila de 2 m con 20 semillas con una separación entre

filas de 0,5 m. Además se realizaron dos repeticiones de la población PopESP para ambas localidades, tanto en otoño como en primavera, mientras que se sembró una sola repetición en cada fecha de siembra para la población PopFRA. Los insectos, enfermedades y malas hierbas fueron controlados químicamente y de forma manual.

Evaluación del Ensayo

Las evaluaciones en campo durante la primera campaña se realizaron para cada ensayo en base a caracteres agronómicos:

- Porcentaje de germinación de las semillas (%SG), evaluado en porcentaje de semilla total germinada con respecto a la sembrada.
- Viabilidad de las plantas germinadas (%PV), evaluado como porcentaje de plantas viables con respecto a las plantas germinadas.
- Inicio de floración (INF), valorado como la fecha en la que el 50% de las plantas viables habían florecido.
- Peso total de la semilla (PT), como media del peso total de la semilla cosechada.
- Número medio de semillas(N), como el número medio de semilla por unidad experimental.
- Peso de 100 semillas (P100), como el peso medio para 100 semillas.

En la segunda campaña se realizaron las mismas evaluaciones y se añadieron evaluaciones correspondientes a:

- Fecha de fin de floración (FIF), entendiéndose como fecha a la cual el 50% de las plantas han finalizado el estado de floración.
- Fecha teórica de cosecha (COS), como fecha a la cual el 50% de las plantas poseen las vainas secas.
- Número medio de ramificaciones (RAM), como la media de las ramificaciones por planta evaluado en un total de cinco plantas en el momento de la cosecha.

Ensayo en cámara de ambiente controlado

Para evaluar la tolerancia al frío en *s. str.*, reduciendo otros efectos ambientales que actúan paralelamente durante el invierno y que pueden afectar a la evaluación de la capacidad de la planta para tolerar las bajas temperaturas, se procedió a realizar un ensayo en la población PopUSA bajo 4 diferentes temperaturas: -6°C, -9°C, -12°C y -15°C mediante un experimento en cámaras de ambiente controlado. El protocolo seguido para la realización del ensayo de heladas fue el propuesto por Caminero (2001) con pequeñas modificaciones.

Como material a evaluar se partió de las mismas RILs de la PopUSA utilizadas en los análisis de mapeo, junto con los parentales Medora y Melrose. Se prepararon bandejas con 24 macetas de 9×9 cm en cada una y un sustrato compuesto de una mezcla de turba:arena:vermiculita en relación 2:1:1. La unidad experimental correspondía con cada una de las macetas que contenía un total de 10 semillas. En cada maceta se sembró una RIL o parental. Se realizaron 3 repeticiones para cada una de las temperaturas a evaluar y se procedió a definir cada ensayo mediante un diseño en cuadrados latinos (Fisher, 1926).

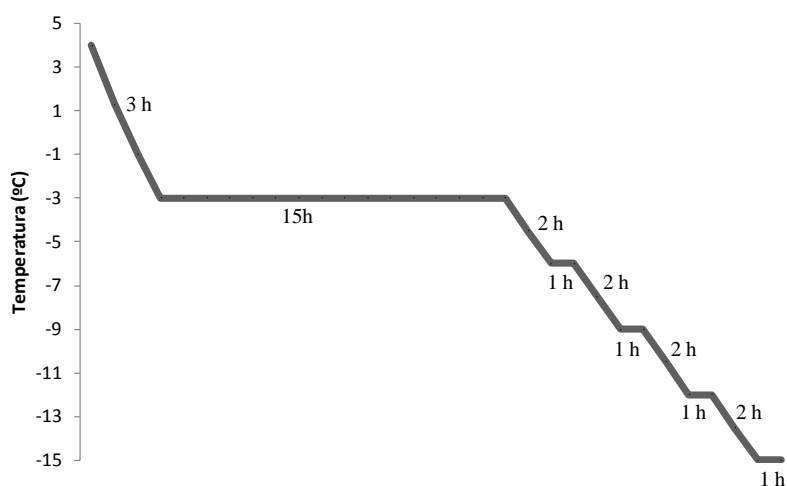


Figura III.3. Condiciones de temperatura y tiempo en los ensayos en cámara climática

Todos los ensayos del experimento fueron sembrados al mismo tiempo y se mantuvieron en cámara climática bajo condiciones controladas, con un fotoperiodo de 10/14 h (luz/oscuridad) a una temperatura de 20/14°C, hasta alcanzar el estado vegetativo de dos hojas, el cual se alcanzó tras dos semanas de tratamiento. Tras un período de 2 semanas se tomaron las evaluaciones iniciales y se modificaron las condiciones ambientales para favorecer el proceso de aclimatación: fotoperiodo de 8 h a 4°C de forma constante durante otras 2 semanas, tras las cuales se procedió a realizar las evaluaciones pre-heladas. Al finalizar las 2 semanas se procedió a programar la cámara climática de forma que la temperatura se redujera paulatinamente, manteniendo a temperatura constante durante 1 h la cámara en cada una de las temperaturas a evaluar: -6°C, -9°C, -12°C y -15°C. El esquema general del proceso de heladas para todos los ensayos se resume en la Figura III.3. Todos los cambios de temperatura se intentaron asemejar, en rangos y variaciones, a los que ocurren en campo, y se evitó cualquier tipo de estrés artificial como las caídas bruscas de temperatura o la desecación por congelación (Olien, 1967). Todas las bandejas se mantuvieron en la cámara hasta finalizar el tiempo bajo la temperatura correspondiente a su ensayo, tras lo cual fueron trasladadas a una segunda cámara climática bajo las condiciones de recuperación: fotoperiodo de 8 h a 4°C de forma constante. Tras realizar todos los ensayos y mantener las plantas 24 h en condiciones de recuperación, se procedió a realizar las evaluaciones post-heladas. Por último, todos los ensayos se mantuvieron otras dos semanas en recuperación y se realizaron las últimas evaluaciones correspondientes a la recuperación.

Evaluación del Ensayo en cámara climática

Antes de someter las plantas al proceso de aclimatación se realizó una evaluación inicial del porcentaje de nascencias (NAS-AC) para cada línea evaluada, para así comprobar la germinación de las plantas. Tras las 2 semanas a 4°C se realizaron las evaluaciones pre-heladas (Pre-Fr), en las que se evaluó:

- Porcentaje de plantas viables (% Viab-Pre-Fr), entendido como el porcentaje de plantas vivas tras la aclimatación.

Las evaluaciones post-heladas (Post-Fr) se realizaron al día siguiente de haber realizado el ensayo de heladas para todas las temperaturas y se valoró:

- Porcentaje de plantas supervivientes a las heladas (%SUP-Post-Fr) entendido como el porcentaje de plantas vivas con respecto a % Viab-Pre-Fr.

Finalmente, tras dos semanas de acondicionamiento se realizaron las evaluaciones de recuperación (Rec), en las cuáles se calculó:

- Porcentaje de superación (%SUP-Rec) en función del número de plantas viables con respecto al %SUP-Post-Fr.
- Desarrollo de ápices (Br), cuantificando el número medio de nuevas ramificaciones en función de %SUP-Rec.

La valoración de la planta se realizó acorde a tres puntos: daño en hojas, daño en tallos y daño general. Las escalas de daños se basaron en la definida por Lejeune-Hénaut (2008).

Los daños en hojas (DH) se valoraron en función de la siguiente escala:

- (0): no hay daños apreciables
- (1): quemaduras por congelación limitadas a los bordes de las hojas
- (2): quemaduras por congelación en la mayor parte de la superficie foliar
- (4): la mayoría de las hojas están totalmente quemadas por congelación

En cuanto a la escala aplicada para valorar los daños en tallos (DT):

- (0): no hay daños apreciables
- (1): menos de la mitad de la parte superior del tallo está dañada o presenta heridas leves
- (2): tallo dañado en su mayor parte o con heridas claras
- (3): tallo muerto o partido

En cuanto a la valoración de los daños generales (DG) se evaluó la planta de forma global estimando su viabilidad y vigorosidad:

- (0): planta totalmente recuperada
- (1): planta con daños leves o con presencia de brotes viables
- (2): plantas con daños visibles pero restringidos a menos del 50% de su superficie y con aspecto fortalecido
- (3): plantas con daños visibles en más del 50% de su superficie o con aspecto débil
- (4): plantas con daños graves o muertas

2. 3. Análisis estadístico

Construcción de mapas de ligamiento

Análisis de la segregación. Estudio del ajuste a la normalidad en la segregación

Una vez obtenida la matriz de datos genotípicos para los marcadores moleculares, se añadieron los datos referentes a los rasgos morfológicos diferenciales antes mencionados y se procedió a comprobar su segregación. Cada marcador fue evaluado para el ratio de segregación 1:1, tal y como se espera para una segregación mendeliana para esta población, mediante el estadístico Chi-cuadrado (χ^2 ; gl 1). El criterio de significatividad estadística establecido fue $p = 0,05$, por lo que todos los marcadores con un valor χ^2 mayor que 3,125 en el caso de PopESP (F_6 RILs), 0,781 en el caso de popFRA (F_8 RILs) o mayor de 0,391 en el caso de PopUSA (F_9 RILs) fueron tratados como desajustados de la segregación esperada. Los datos de cualquier población en la cual hubiera indicación de desviación estadísticamente significativa a partir del ratio de segregación esperado fueron eliminados del análisis.

$$\chi_{gl}^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

O_i : frecuencia observada, E_i : frecuencia esperada, n : número de casos, gl : grados de libertad

Construcción de los mapas de ligamiento

Los mapas de ligamiento para los marcadores segregantes en las tres poblaciones fueron realizados mediante el programa MAPMAKER/EXP versión 3.0b (Lincoln *et al.*, 1992). Los marcadores fueron posicionados mediante los comandos “*try*”, “*place*” y “*ripple*” del mismo programa. La función Haldane fue utilizada para calcular las distancias en centiMorgan (cM). Dicha función asume que los entrecruzamientos en diferentes intervalos ocurren de acuerdo a la distribución de Poisson, de forma que Haldane (1919) expresó la distancia de mapa (χ) como:

$$\chi = -1/2 \ln(1 - 2r)$$

cuya inversa es

$$r = 1/2 (1 - e^{-2\chi})$$

La función de mapa de Haldane ignora el fenómeno de la interferencia y, por tanto, asume que $i = 0$ y que los sobrecruzamientos son totalmente independientes entre sí.

Los umbrales LOD para asignar los marcadores a los grupos de ligamiento fueron fijados en $\text{LOD} \geq 3.0$ y el umbral de distancia en 30 cM.

Obtención del mapa compuesto

Los mapas genéticos fueron diseñados a partir de los resultados de ligamiento entre marcadores mediante el programa MapChart v 2.2 (Voorrips, 2002).

Análisis de QTL

Análisis de la segregación

Estudio del ajuste a la normalidad en la segregación

Una vez realizadas todas las evaluaciones de campo y de cámara climática se configuró una matriz de datos iniciales para cada una de las líneas evaluadas. La matriz integró cada evaluación individual para cada repetición como variables independientes. Cada variable fue sometida a análisis de varianza mediante el programa estadístico SPSS v15.0.1 for Windows (IBM, EEUU), evaluando las distribuciones en los residuos mediante los estadísticos apuntamiento o *skweness*, y kurtosis. La normalidad de dichas distribuciones se evaluó mediante la prueba de Saphiro-Wilk (Saphiro y Wilk, 1965).

Normalización de las variables

De este modo se detectaron los residuos anormales y los datos fueron corregidos. En el caso de variables que no se ajustaran a la normalidad fueron ajustadas mediante mínimos cuadrados.

El conjunto de variables con distribución normal representó las matrices de datos cuantitativos para cada población evaluada y se incluyeron con las matrices de datos genotípicos obtenidas en la fase de mapeo.

DetECCIÓN DE QTL

Tras obtener los distintos mapas de ligamiento mediante el programa MAPMAKER/EXP los datos de salida junto con los rasgos cuantitativos permitieron el análisis de detección de QTL mediante el programa Windows QTL Cartographer (WinQTLCart) v 2.5 (Wang *et al.*, 2005) siguiendo las condiciones descritas en Timmerman-Vaughan *et al.* (2002) y Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008). Los QTL fueron mapeados mediante Composite interval mapping (CIM), seleccionando en el propio programa el modelo 6 (más de 5 marcadores control), modelo estándar, con una precisión de 1 cM, un tamaño de ventana fijado a 10 cM y 5 marcadores control. Los marcadores empleados como cofactores fueron seleccionados con el método de regresión *forward* y *backward* (probabilidad dentro y probabilidad fuera donde cada set toma un valor de 0.1). El porcentaje de varianza, R^2 , bajo $H_0:H_3$ ($H_0:a = 0, d = 0$; $H_3: a \neq 0, d \neq 0$, siendo a el efecto aditivo y d el efecto dominante) fue estimado por el programa. Los QTL detectados por CIM fueron declarados como significativos si excedían el umbral de significatividad determinado tras correr un test de 1.000 permutaciones ($\alpha = 0,05$) para cada uno de los rasgos cuantitativos evaluados en cada población. El umbral más elevado LOD = 2,50, fue seleccionado para realizar CIM para todos los rasgos.

ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE QTL

Los criterios de cribado aplicados para todos los resultados de CIM para obtener los QTL fueron: seleccionar aquellos QTL con un valor LOD > 2,50 y valores de $R^2 > 1\%$. Tras este cribado se procedió a localizar los QTL y definir la región del mapa de ligamiento a la que se mostraban asociados. La nomenclatura asociada a cada QTL se basó en el rasgo cuantitativo al que estaban asociados, en el grupo de ligamiento, y en el marcador molecular al que se asociaban con mayor probabilidad (indicado por el orden en el que se situaba en el grupo de ligamiento). En el caso de los rasgos evaluados en cámara climática, se añadió, al nombre de cada QTL, la temperatura a la que se había evaluado.

La detección de QTL a partir de las evaluaciones del experimento de campo se realizó de forma individual a partir de los dos mapas de ligamiento obtenidos para las poblaciones PopESP y PopFRA. El análisis para cada rasgo se realizó primeramente en la población PopESP, por ser el mapa de ligamiento con mayor número de *loci* anclados, posteriormente se comprobaron los resultados comparándolos con los obtenidos para PopFRA.

En primer lugar, se analizaron las nascencias, en base a los QTL detectados se realizó una comparativa y se obtuvieron los QTL coincidentes en más de una condición y/o población con un porcentaje de varianza explicada representativo. Los resultados obtenidos a partir de ambas poblaciones, PopESP y PopFRA, fueron comparados con los resultados obtenidos en la detección de QTL asociados a las nascencias evaluadas en el ensayo de cámara climática, en PopUSA.

El resto de rasgos evaluados se analizaron localizando los QTL asociados en todos los grupos de ligamiento en ambas poblaciones de mapeo dentro de cada temperatura. Posteriormente se realizó una comparativa para cada rasgo evaluado entre las diferentes condiciones de temperatura evaluadas; -6°C, 9°C, -12°C y -15°C. En este punto se compararon los QTL detectados entre temperaturas contiguas y se buscaron QTL solapantes para las cuatro temperaturas.

Por último, se construyeron mapas de ligamiento mediante MapChart v2.2 (Voorrips, 2002) con los QTL asociados a cada rasgo, obtenidos mediante Windows QTL Cartographer (WinQTLCart) v2.5 (Wang *et al.*, 2005). El mapa se construyó tras la selección de los QTL según las comparativas anteriores, para cada una de las temperaturas, para poder comparar todos los rasgos evaluados en conjunto según la temperatura ensayada.

En este último análisis, se renombraron los QTL más influyentes según el rasgo al que estaban asociados, el grupo de ligamiento en el que se situaban y el número de QTL presentes en dicho grupo de ligamiento.

3. Análisis de la expresión diferencial asociada a la aclimatación en guisante

3. 1. Materiales para la expresión diferencial asociada a la aclimatación en guisante

Material vegetal

Las líneas escogidas para el estudio de expresión diferencial asociada a la aclimatación en guisante se seleccionaron en función de información previa referente a su posible comportamiento diferencial frente a la dureza invernal, en concreto por el grado de tolerancia a heladas descrito para cada accesión, distinguiendo líneas tolerantes a heladas y líneas susceptibles a heladas.

Se seleccionaron los seis parentales de los tres cruzamientos empleados en el apartado de mapeo genético y análisis de QTL asociados a caracteres de interés agronómico y a tolerancia a heladas: Medora y Melrose como parentales de PopUSA, Terese y Champagne como parentales de PopFRA y, ZP-1366 y Cheyenne como parentales de PopESP.

Las características diferenciales entre las seis líneas de guisante seleccionadas se describen en el [Apartado III.2.1.1.1](#) y se resumen en la Tabla III.10, entre las que destacan para este estudio la baja tolerancia a heladas presentada por las líneas Medora y Terese, siendo variedades de siembra primaveral. En cambio, Melrose y Champagne, presentan un grado más elevado de tolerancia a heladas. La línea Cheyenne se corresponde con una variedad de siembra invernal, considerada tolerante a heladas, por el

contrario, ZP-1366 muestra un menor grado de tolerancia a heladas siendo considerada en este trabajo como línea susceptible a heladas.

Tabla III.10. Características diferenciales entre accesiones seleccionadas

Accesión	Estatus	Origen	Heladas	Tipo hoja	Color flor	Color 2rio semilla	Longitud entrenudo	
Cheyenne	Cy	Comercial	Francia	Tolerante	Áfila	Blanca	Ausente	Corto
ZP1366	Tu	Local	Turquía	(Susceptible)	Convencional	Morada	Presente	Largo
Champagne	Cg	Comercial	Francia	Tolerante	Convencional	Morada	Presente	Largo
Terese	Te	Comercial	Francia	Susceptible	Áfila	Blanca	Ausente	Corto
Medora	Md	Comercial	E.E.U.U.	Susceptible	Áfila	Blanca	Ausente	Corto
Melrose	MI	Comercial	E.E.U.U.	Tolerante	Convencional	Morada	Presente	Largo

Teniendo en cuenta estas características, las evaluaciones iniciales se realizaron sobre Medora y Melrose, para analizar, en primer lugar, la amplificación de los sistemas diseñados y su eficacia, y en segundo lugar, para analizar la expresión de los genes en función del tratamiento o del tipo de línea analizada.

Marcadores moleculares

Con el fin de buscar genes candidatos relacionados con la tolerancia al frío se realizó una búsqueda de secuencias de guisante en la base de datos de Genbank/EMBL correspondiente a ARNm de *P. sativum*. Se realizó una primera selección de secuencias siguiendo varios criterios de eliminación: (1) secuencias de menos de 500 nucleótidos, (2) secuencias que carecieran de correspondencia con un gen/proteína concreto y (3) secuencias que pudieran corresponder a genes duplicados. Las secuencias seleccionadas corresponderían a secuencias codificantes para diversos genes. Se realizó una búsqueda bibliográfica mediante la base de datos del NCBI, PubMed, de genes relacionados con estreses abióticos, en concreto con estrés a bajas temperaturas en diferentes cultivos, y genes implicados en el metabolismo primario vegetal con participación en la respuesta al estrés. A partir de esta búsqueda se seleccionaron los genes por su relación en la respuesta frente a diferentes estreses abióticos en especies relacionadas y sus respectivas secuencias ([Anexo III.3](#)).

Para cada una de las secuencias seleccionadas se diseñaron parejas de cebadores óptimos para su utilización en PCR en tiempo real, mediante la aplicación *PrimerExpress* (Applied Biosystems, EEUU), de acuerdo a los siguientes parámetros: longitud de los cebadores entre 18 y 27 pb, con una longitud óptima de los mismos de 20 pb; temperatura de fusión (*melting*) óptima de 60°C para todos los cebadores; evitar cualquier auto-complementariedad, sin presencia de Gs y Cs consecutivas en el extremo 3', con un contenido total en GC entre 30 y 80%, y longitud del amplicón entre 50 y 150 pb. Se comprobó la especificidad de cada secuencia y del sistema de amplificación diseñado para el gen descrito en guisante mediante la opción megablast del BLASTN frente a las secuencias disponibles del género *Pisum*.

Los 132 sistemas de amplificación diseñados se resumen en la Tabla III.11. La correspondencia de cada sistema de amplificación con el número de accesoión al partir del cual se diseñó y el gen o la proteína correspondiente se detallan en el [Anexo III.3](#).

Tabla III.11. Sistemas de amplificación diseñados a partir de las 132 secuencias seleccionadas

Nombre	Cebador <i>Forward</i>			Cebador <i>Reverse</i>		
	L	T _m	Secuencia 5' – 3'	L	T _m	Secuencia 5' – 3'
<i>Ps_001</i>	18	58	CCCTCGAAGGCCAAATCA	17	59	GCCACCCGCCACTCATT
<i>Ps_002</i>	19	59	TCGGCAATGAAGGCTCTTG	19	59	GAAGGCCAACCCGTTTCAC
<i>Ps_003</i>	21	58	GGTGGTGTGGAAGAAAATGGA	20	59	GCCACCCGACAACTTGATTG
<i>Ps_004</i>	22	59	TGTTCAAGGAATCAACCGTTTTG	24	59	TTGAGGCTATGAAATGGAATGAGA
<i>Ps_005</i>	17	58	CCATGGCCGTCGAGTTG	22	59	CGATTTTCCGAAACTCCAAC
<i>Ps_006</i>	21	59	TGGTTGATGCAAGCACACCTA	27	58	GCAAGCTTCTTTAGCTTTAGTCTCAAT
<i>Ps_007</i>	22	59	GAGATTACCGGTGGACCTGAAG	19	60	GGTGGTGGCTCAGGCTTGT
<i>Ps_008</i>	25	58	TCGATTCTAAGTTTTTCGATGATGA	20	59	GGGCACTTGACAGTCCAAGAT
<i>Ps_009</i>	21	58	GCGGTTACCGAATCCTCTCTT	21	58	AGCGTTTGAGTTGGTCGTGTT
<i>Ps_010</i>	18	58	CTCCTCGACCGCTTGGA	24	59	CCTTGCATGAAGATACCTGAACAA
<i>Ps_011</i>	18	60	TCGGCGTCTTGAATCGA	23	59	CATTTTGTAGCCACCCAAGTTG
<i>Ps_012</i>	24	59	TTGCAITCACAAGGATACATTTCC	18	58	TGTTGTCCGGGCAAGACA
<i>Ps_013</i>	21	59	GGATTGCTCCAAGTGGTGTA	16	60	GGTGCCGGTGCC ATT
<i>Ps_014</i>	25	59	CAAGTAACCCTGATCCAATATGAA	20	59	TTGAGTGGCTGGAACGTTGA
<i>Ps_015</i>	22	59	GGGAATCAAGTTCGCAAAAGT	22	59	CGACGGTTTTCTCCTTAACGA
<i>Ps_016</i>	23	58	TTGCACAACTATCCGATCTGAA	23	59	AACCTTGCCGACTTTTGTGAGA
<i>Ps_017</i>	24	60	TCGCTAAAGATGACTCGAGGAAGT	20	58	CGTTGGTGTGCGTTTCAGAA
<i>Ps_018</i>	18	58	CCCCAATGCACCCAATTC	20	60	GGAGCGGTTGAGGGAAAGAG
<i>Ps_019</i>	24	59	TGGAAGCCCTATGACAAAGATCCT	20	58	TGCAAGACCCATTTGGATGA
<i>Ps_020</i>	24	58	TGCATTTAATAAGCGACGAGATT	21	59	TTCCATGACGCTGACGAAAGT
<i>Ps_021</i>	20	58	AATTCGGCACGAGCGTTAAT	20	58	AGAGGAATGGCATTGGCAAT
<i>Ps_022</i>	23	58	AACTCACAAATGCAAAAGACCAA	22	58	CCATGCATATCCGTTTGTCTTC
<i>Ps_023</i>	20	58	CAGGGTGATCCAGGGTCAGT	24	58	CATGGTAACCATCCACCCATATAG
<i>Ps_024</i>	23	58	TTGTACCTCAACCATTGGAGACA	25	59	TTGGCTTCCTTCATTATCACCTCTA
<i>Ps_025</i>	22	59	GGCATTAAACATCAGTGGCATCA	22	59	AGAAGGGCCAACTTGAAATTCC
<i>Ps_026</i>	18	60	TGTGCGGCCCTCCAATTA	18	59	CGAGACCCATCGCGTGAT
<i>Ps_027</i>	19	58	GCGCTCTCTTGGCCTTCT	28	58	AGAAATAAGACAAAGGAAGAGGTTTCATT
<i>Ps_028</i>	23	59	CAAGTGTAGCTGTTTCTCTTCG	23	59	GGCAAACAAGACGATCAAAGAAG
<i>Ps_029</i>	20	59	GGAGGACCAGGGCTACATGA	20	59	CCGTCAGAACCAGCCAAAAT
<i>Ps_030</i>	20	58	TCGCCGCAAATGTTGTTAAC	23	59	CACCATTGGAGAGCACTTGAGTT
<i>Ps_031</i>	18	59	TTGCCACCATGGGTTGCT	26	60	CATTCACCTCTCAGATACTCCAGACA
<i>Ps_032</i>	19	60	CCGGCAAAGTAGCCATCGT	20	59	CAAAGAGATGCGCCGTCTCT
<i>Ps_033</i>	23	59	GAGCAGCAGAGTCTGATATTGC	22	58	ACCAATTCCTCAGGCTTCTTG
<i>Ps_034</i>	22	58	GTTGAGTTGCACAATCCAATC	23	60	CCACAGGAGACATTTTCGTGTGT
<i>Ps_035</i>	19	60	GGCACCAGGGACTGGAAGA	21	59	CAGATACCAGAGCCCCTGTCA
<i>Ps_036</i>	21	58	CATGGGACAGTTACCCGTCAT	21	59	CTATGCCGTTTGTGCTGGTTT
<i>Ps_037</i>	19	58	GCCAACCAGAGGATTGCAA	22	58	CATCACCTCCTCTCGGAAATT
<i>Ps_038</i>	19	58	TCCACATTACCGGACACA	19	59	CCTCGGCATTGACCAACAC
<i>Ps_039</i>	21	59	GGAGAACGTTATGGCCCTTTG	23	59	GATCGGGAGTGGATACAACAATG
<i>Ps_040</i>	20	58	AATGGCTGGCATGGTACCTT	21	59	TGGATATTCAGCGGCAAGTC
<i>Ps_041</i>	21	58	CAATGCAGCACAGGTATGGAA	17	59	CCGCCACCACCAGGTTT
<i>Ps_042</i>	18	58	TTTCGCGCACCGTGAAA	20	59	GGCGTGGTTTTGGTGTAAAGC
<i>Ps_043</i>	24	59	TTCGTTATTCAGGGTTTTGGAAAT	24	59	TTTTCCACCTTCTCATCAATCA
<i>Ps_044</i>	22	59	GGTTTGGCAAAGGTTTACGAA	18	58	TCTGGAAGCACGGCAACA

Nombre	Cebador <i>Forward</i>			Cebador <i>Reverse</i>		
	L	T _m	Secuencia 5' – 3'	L	T _m	Secuencia 5' – 3'
<i>Ps_045</i>	20	58	GGCTGGTGGAAAAGGTTTCAG	23	59	TGGAACACGTTGATGAATTTCTG
<i>Ps_046</i>	17	59	CAGGGCGTGCAGGATCA	23	60	TCACAAGGAACATGTCACGATCA
<i>Ps_047</i>	20	59	TCAAGGCTGCACCATCTCAA	20	58	CATTGCGTTCATCATTGCT
<i>Ps_048</i>	17	59	ACTTCGGCGGCCTGAAA	20	58	CGGTGGAGTATGGACGGATT
<i>Ps_049</i>	20	59	AATACGGCGACATCGTTTCC	21	58	GCCGAAGAGATGACGACAAC
<i>Ps_050</i>	21	59	CATCTATGGTTCGGCTCCAAA	21	58	AGAAAGGCTTTCGCCATTCT
<i>Ps_051</i>	21	58	CTTCGCCTAGATTCGGGTTTT	18	59	ATTCGGCGCAGGATACGA
<i>Ps_052</i>	20	60	CGTCGACCCGAGCATTAAA	21	60	TCGAGGTGGTCACATCGGTTA
<i>Ps_053</i>	18	60	GCGGCCACCCATTAAAGG	21	59	TGTGCCCAAACATGTCAATTG
<i>Ps_054</i>	20	59	AACCGCTGATCCTGATTCTGA	16	59	GCGAGCGTCGCGTGT
<i>Ps_055</i>	24	60	GGTGATAACGAGGTTACGCGTACT	19	59	TGTTTCTCGGGCATCAA
<i>Ps_056</i>	22	58	ACTGTCAGTTTTGGCATCGAAA	22	58	GAAATCTTCGCTTGTGTTGCAA
<i>Ps_057</i>	22	58	GATTTGGATTGGAAAGCACTT	24	58	CATCAAGATCTGGGATCTCTGAGA
<i>Ps_058</i>	20	60	GCGCTGGTGATTGAAGAAGT	20	60	GTGACTGCACACACAGCAGA
<i>Ps_059</i>	19	59	GTTGCTTGGGAACCCGTGT	20	60	GAGGCATGAGGCTGAGTAGC
<i>Ps_060</i>	20	60	CAAGGAAGCTGGCTTTGAAC	20	60	CACAATGGCCCTACCACTCT
<i>Ps_061</i>	20	60	AGCGTTGGAATCGGTATCAG	20	60	ATGTTTGTCAATGGCGGAAT
<i>Ps_062</i>	20	59	CCCAAGGCTGCATTAGAGAT	20	60	CATCTATGGATTTCGGCAAGG
<i>Ps_063</i>	27	60	ATTTTCTTAATCCCTATCTTCTGCTC	19	60	GGGACACCCACATCATCAA
<i>Ps_064</i>	20	60	AAATCTCCGTCACGTGGAAC	20	60	TAACCGATGCCCTTCCATAG
<i>Ps_065</i>	20	60	GTGTGGGCCCATTACAGTATC	20	59	AAGGGTGGATTGCATGATCT
<i>Ps_066</i>	19	61	TCTCCGGTCACCGAAAATC	25	59	TTCCATTGATAGTTAACCCCTCTCTC
<i>Ps_067</i>	20	60	GCTCGTGTGTTGGTTGTTTG	20	60	ACTTCCCTAGTGGCCCTCAT
<i>Ps_068</i>	20	60	GGTGCAAACCCGTGCTTAT	20	60	TTGTCCAAGGTAAGGCCAAC
<i>Ps_069</i>	20	59	TCCAACACCGACAATACCAA	20	59	GGAACAAGCCTTCCAACATC
<i>Ps_070</i>	21	59	AGCAACACTATTCTGCCGTTT	20	59	CCTGGATGTTGGAGTCACAG
<i>Ps_071</i>	20	59	GAGAAGCCACAAGCCAGAAT	20	60	CCTTGCTCCTTTTGTTCAGG
<i>Ps_072</i>	20	59	TGGTCACGAGCTTAGCAAAA	22	59	TGCAACCCAATAATACCACAAG
<i>Ps_073</i>	20	60	AAAACGGAAACCGAAGAAGGT	20	60	GGTAGGCGTGTCCAACATCAT
<i>Ps_074</i>	21	59	GGCAAGATGAAAGAGGAGTGA	25	59	AAAACATAATCTTCAITGCCAACTT
<i>Ps_075</i>	20	60	TGGAATCAGCTTACGCACAG	20	60	AAGTCATACCAAGGCATCC
<i>Ps_076</i>	20	60	ATCCATCCGAACAGATTGG	20	60	TTCTCAGCATCCTCGTCTT
<i>Ps_077</i>	22	59	GGCAGTGGTCTGCTTATATTT	20	60	GACCAGCTGCTACTCTCCA
<i>Ps_078</i>	20	60	GGGCATGAAAAGGAAATGAA	20	60	TCCAAATGGCAACAACTCAA
<i>Ps_079</i>	20	60	TCAGCAAAGGGGAATTGTTT	20	60	CAGAGTGTGTCAGCTTCCA
<i>Ps_080</i>	20	60	CGCACTCCTCAGGATGTTT	23	59	AGGAAGGAGTTAAATGGAAATGG
<i>Ps_081</i>	24	59	TCCTGGTACTGAACAATCAAGAAC	20	59	GCTCCGTAACCAAGTTGATCC
<i>Ps_082</i>	20	60	ATATCCCCTCAACGACGA	20	60	AATGCATTCCATTTCCAAGG
<i>Ps_083</i>	20	60	AATGGCTTTCGGTTTGA	20	60	ACCGCCAACAACCTTACCAG
<i>Ps_084</i>	20	60	ACCATTGGTGAAGCATGTGA	20	60	TGTTGTTCAACACTGCCCTA
<i>Ps_085</i>	20	60	CCTCCAACCTGAAGACGCTGT	21	59	AATCGATGAGATCCTGTTTCG
<i>Ps_086</i>	27	60	GAGTGACTGTCTTTTAGGGTTAATCA	22	59	CCAATCAAATTCTACCAATTGA
<i>Ps_087</i>	20	60	CCCTCCATGTCAAAAACCTG	26	59	AGTTAAAGATGTTGGATCACAATGAG
<i>Ps_088</i>	22	60	CGAAGGCTTTTCTATCTTGAC	21	59	TGATCATCTTGCAAACAGACG
<i>Ps_089</i>	20	60	GCTTCCTCCAATTTCCCAAT	26	59	AACITTAACACTTGTGACCTTGTGC
<i>Ps_090</i>	20	60	ACCCAATTGGATGGCACTAA	20	60	GCTTGCCCAACAAACTGT
<i>Ps_091</i>	20	60	GAATCAACGGATTCGGAAGA	20	60	TCCTTCAACTTGCCCTCAG
<i>Ps_092</i>	20	60	CATGGGAAATTGCTTGGTCT	20	60	CTCACAGCATCCCCGTAAAT
<i>Ps_093</i>	20	60	AGGAGGCGGTGGTGATAGAT	18	60	CCGCCACCACGAGAGTAG
<i>Ps_094</i>	20	60	TTGGCAACCGAAGGAGTAAC	20	59	GCACACAAATTGAAGCAACC
<i>Ps_095</i>	23	59	CGGAGCTTAAGTCAAGTCTAAA	19	60	GCAGAAAGGACCGGATTGT

Nombre	Cebador <i>Forward</i>			Cebador <i>Reverse</i>		
	L	T _m	Secuencia 5' – 3'	L	T _m	Secuencia 5' – 3'
<i>Ps_096</i>	26	60	CGATTAAGAGAAGAAGAAATGTAGCA	20	61	TTCCACCAACCAACTTTTG
<i>Ps_097</i>	22	59	TCTCAACAGCTGAACGTAGAGG	21	59	TTCAAGAAGCTGGGAGAAGAA
<i>Ps_098</i>	20	60	CCACCAAAGGATCCATACCA	20	59	TGTGGGTGAGGATAGGTGTG
<i>Ps_099</i>	25	59	CGCTCTATAAAGACACGTAGAATGA	21	60	CATGCATGCACATGCTGTACT
<i>Ps_100</i>	20	60	TACCATAAAACCCGGGTGAC	20	60	CTGGATCTTCCCTATGCAA
<i>Ps_101</i>	22	60	TGGGTTTCACTGATAAGCAAGA	20	60	AGGCAACTTCCAAGCAGTA
<i>Ps_102</i>	24	60	CCCAAAAGCTAAGAGGTACATCAA	19	60	TGGGGTAAAGTCGGGAAAA
<i>Ps_103</i>	22	59	TGTAAAGCTTGCAGATTTTGA	23	60	TCGTGTGTAATGTTCTGACAGG
<i>Ps_104</i>	26	59	GCTACCTTAAGAAAATCAAATTGTCC	21	60	TCTAGAGGTGCCAAATTGGTG
<i>Ps_105</i>	20	60	GCACTTGGGATGAAGGTGTT	21	59	CAAATTTGTCCCAAATGGTC
<i>Ps_106</i>	23	59	CGTCAATGATTTTACAACAACG	23	59	CAAGCTGGGATTTCTACTAGCTG
<i>Ps_107</i>	21	59	CAGCGTGGCAGCTATATAAGG	24	59	AACTGAATTTCTGAGCAACATT
<i>Ps_108</i>	21	60	TCTGCGAAACAAACAATCAA	20	60	GCAACGAACGCATACTCCTT
<i>Ps_109</i>	20	60	CGGACAACGTCCCTTTATCA	20	59	TCTTCATCTTCTCGGAACCTC
<i>Ps_110</i>	20	60	CCTGGCCAGAGAAAATCAA	20	60	AGGGGGCTTCTGCTAAAGAG
<i>Ps_111</i>	20	60	CTATGGATTCCAGCCACGTT	20	60	CCCATCTCAGCAATCTTGT
<i>Ps_112</i>	20	59	CTTCTGCTCCGATGCTTCT	19	59	GAGGTGGGTGTTGACATGG
<i>Ps_113</i>	19	60	GGTGGAACACCTCCCATC	20	60	AACTGGTGGCTGACTCCAAC
<i>Ps_114</i>	21	59	TGACGTTATCCATTTGCTTGA	20	59	TGCTAGCTCAACTCGTCCAC
<i>Ps_115</i>	20	60	CTTGACCATCTGATCGCTGA	20	60	CTCCACCGCAGCTTCTAAC
<i>Ps_116</i>	20	59	GGCTTATTCAAGCGTGGAG	20	60	CAGTGCATCCATACCATCCA
<i>Ps_117</i>	27	61	AACACTGACATTACTTCCATTACAAGC	22	60	TGCAATTTGAAATCCAAAAACA
<i>Ps_118</i>	20	60	CCAATCCCAGATCAATGGAC	20	60	CTCCACGCACAATCTTCTCA
<i>Ps_119</i>	20	60	CCTCTTCTGATTCCGTGAGC	20	60	GCGAGCCACAGTAGGAAGTC
<i>Ps_120</i>	20	60	GGGCATTGATATCCCGTATG	20	60	CGGCCTTCCAAAGGTTACTT
<i>Ps_121</i>	27	59	GTGAATTTGAAGTACAAGAGATTGTGT	21	59	ACACCTTTTGAGAATCAGCA
<i>Ps_122</i>	22	60	CACTAAAGGAGGCTTACAACC	20	59	CGGTGGAACAACACTCAC
<i>Ps_123</i>	19	59	AGAAGATGAAGCCCGCAGT	23	60	CTGTGACAGTACTCCACACCAGA
<i>Ps_124</i>	20	60	ACCCCGTCAAGTTCAGAATG	20	60	CGACGACCTTCTTGCTTAG
<i>Ps_125</i>	21	59	TGCAGTGAGCTATTTGCATA	20	60	TGACCGTCAAAACACCAGAA
<i>Ps_126</i>	18	60	CATGGCTCCTCCCTTGAA	23	57	GCTTCTTTCATCAAATCATAAGG
<i>Ps_127</i>	22	59	AAGGTAAACATGGACACCCAAT	19	59	GGATTGGCATTGTTGAGA
<i>Ps_128</i>	20	60	CTGTTGGGGTGTCTGAGAT	20	60	AGCTACTCTGCCACCAGCAT
<i>Ps_129</i>	20	60	GAGCTGGTTAGCATGGCACT	20	59	CAAGAACACGGTTGATTTGC
<i>Ps_130</i>	20	60	CGTTGATGCATGGAACGATA	21	58	TGTTGTCAATTAGGGAATCCA
<i>Ps_131</i>	23	60	TGATGAAATTAGCTTTGGTGCTT	20	59	ATCGAAACGAGCATCAACAA
<i>Ps_132</i>	25	59	TTATCTTCAGGAGATGTTTTGTGA	21	59	AGGAAGCTTTTAGGGCAACTG

L: Longitud (pb), T_m: temperatura de *melting*

La síntesis de estos nuevos cebadores se solicitó a Eurofins MWG Operon (Alemania) y, del mismo modo, se reconstituyeron en agua libre de nucleasas (SIGMA-Aldrich, EEUU) a una concentración de 100 µM como concentración madre, a partir de la cual se obtuvieron las diluciones de trabajo a 10 µM también en agua libre de nucleasas.

Para cuantificar de forma relativa en los ensayos de PCR en tiempo real, qPCR, la expresión diferencial entre líneas tolerantes y susceptibles sometidas a diferentes tratamientos se empleó un gen de referencia. En cada una de las PCR realizadas se incluyó como gen de referencia un sistema de amplificación basado en el gen que codifica 18S rRNA. El sistema de amplificación 18S, Eukaryotic 18S

rRNA Endogenous Control (VIC/TAMRA Probe, Primer Limited), es comercializado (Applied Biosystems, EEUU); como control endógeno. El sistema *18S* ARNr permite la cuantificación relativa de la expresión de genes en muestras de ADNc cuando se utilizan otras químicas de PCR en tiempo real, como fue en este caso SYBR-Green. En cada una de las placas de amplificación se incluyeron 4 muestras correspondientes a los dos parentales, en condiciones control y tratado, para su amplificación con este sistema de referencia.

3. 2. Metodología aplicada en la expresión diferencial

Metodología experimental

Con el fin de estudiar los efectos de la aclimatación sobre diferentes líneas de guisante se diseñaron los ensayos en cámaras de ambiente controlado para evaluar y tomar muestras de los seis parentales de los tres cruzamientos: Medora, Melrose, Terese, Champagne, ZP-1366 y Cheyenne.

Los ensayos realizados para cuantificar la expresión diferencial a nivel de ARNm debida al proceso de aclimatación se diseñaron de forma que permitieran:

- Cuantificar la expresión diferencial debida al proceso de aclimatación.
- Analizar la diferencia en los niveles de expresión entre líneas de guisante tolerantes y susceptibles a heladas.
- Comparar los resultados en varias líneas de guisante.

Con estos objetivos se emplearon en el ensayo los tres genotipos tolerantes a heladas (Tol: MI, Cg y Cy) y los tres genotipos susceptibles a heladas (Susc: Md, Te y Tu). Para poder comparar la diferencia en los niveles de expresión se diseñaron dos experimentos: control o no aclimatación (NA) y aclimatación (AC).

Ambos experimentos se realizaron simultáneamente, siguiendo en ambos casos las mismas condiciones: se preparó sustrato turba:arena:vermiculita en relación 2:1:1 en macetas de 9 × 9 cm, colocadas en un total de 12 bandejas con una capacidad de 24 macetas por bandeja. En total se prepararon 6 bandejas correspondientes al experimento NA y 6 bandejas correspondientes al experimento AC. Las 12 bandejas se repartieron según genotipos, dos bandejas por genotipo, una para cada experimento. En cada bandeja se sembraron un total de 120 semillas, 5 semillas por maceta.

Todas las bandejas, NA y AC, se mantuvieron en condiciones controladas en invernadero con un fotoperiodo de 10/14 h (luz/oscuridad), a una temperatura de 20/14°C. Tras 2 semanas se separaron las bandejas manteniendo en invernadero, bajo las mismas condiciones, una bandeja por genotipo

correspondiente al experimento NA. El resto de bandejas, experimento AC, se trasladaron a una cámara climática con unas condiciones de fotoperiodo de 10/14 h a 4°C de forma constante. Tras 14 días se tomaron muestras de cada una de las plantas de forma individual para cada maceta, en cada uno de los experimentos, para la extracción de ARN.

Para estandarizar la toma de muestra se procedió a tomar 100 mg de las estípulas, debido a la presencia de plantas áfilas, de cada línea a muestrear en los diferentes tratamientos: líneas aclimatadas y líneas sin aclimatar. Se recogió el material tras el mismo tiempo de crecimiento, para eliminar efectos debidos a estado vegetativo o de desarrollo de la planta. Todas las muestras se recogieron, por duplicado, en tubos de 2 ml libre de nucleasas (Deltalab, España) y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido, todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Se obtuvieron 24 muestras de tejido correspondientes al cada genotipo y en cada experimento, todas por duplicado.

Obtención de ADNc a partir de ARN

Todos los reactivos preparados para su uso directo con ARN fueron preparados con agua DEPC (agua tratada con 0,1% (v/v) de dietilpirocabonato) para evitar la presencia de RNasas. La obtención de ARN se llevó a cabo mediante un protocolo basado en la utilización de TRIzol (Invitrogen, Reino Unido); reactivo que contiene isotiocianato de guanidina, potente agente desnaturizante de proteínas, y fenol, que permite mantener el ARN en una fase acuosa. Se siguieron las recomendaciones del fabricante y se partió uno de los duplicados de las muestras de 100 mg tejido obtenidas para los diferentes genotipos ensayados tras la finalización de los dos experimentos realizados ([Apartado III.3.2.1.2](#)), manteniendo el otro duplicado a -80°C como reserva.

Las extracciones de ARN se realizaron de forma individualizada para cada una de las muestras recogidas, obteniendo un total de 24 muestras de ARN para cada uno de los genotipos y en cada experimento. Una vez obtenido el ARN se mezclaron las muestras de ARN según genotipo y tratamiento en un mismo tubo a partir del cual se prepararon alícuotas. Las alícuotas se almacenaron las a -80°C hasta el momento de sintetizar el ADNc.

La cuantificación de ARN y el control de calidad de las extracciones de ARN se realizó mediante dos técnicas: (1) espectrofotometría con un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU), para comprobar calidad y cantidad de ARN y; (2) electroforesis en gel de agarosa en TAE 1X, para comprobar la ausencia de contaminantes como ADN. Tras comprobar la calidad y cantidad del ARN total obtenido las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

Para sintetizar una cadena simple de ADN copia a partir del ARN total extraído, partimos de 3 µg del ARN total obtenido y se añadieron 0.5 µg de oligo(dT) (Invitrogen, Reino Unido) con el fin de enriquecer la muestra en ARNm susceptible de ser amplificado. Para completar la primera fase de la reacción se

añadió 1 µL de la mezcla de dNTPs 10mM (cada uno) y se llevó el volumen final a 12 µL con agua DEPC. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y se pasó a hielo. En una segunda fase se añadieron a la mezcla inicial 2 µL de DTT (ditioteitol) 0,1 M, como agente reductor, y 40 unidades de RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Reino Unido), para evitar la acción de RNasas. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 2 minutos y se añadieron 200 unidades de la retrotranscriptasa M-MLV RT (Invitrogen, Reino Unido). Para la completa síntesis de la cadena de DNA copia se incubó la reacción final a 37°C durante 50 minutos, y para inactivar la reacción se calentó hasta 70°C durante 15 minutos. De cada síntesis de DNA copia se obtuvieron 20 µL de volumen final que se diluyen 1,5 veces en agua destilada estéril. Los 30 µL de volumen final se guardaron a -20°C hasta su uso como ADN molde en los ensayos de PCR en tiempo real.

Previo a cualquier otro ensayo se procedió a optimizar las condiciones de PCR convencional para testar los sistemas de amplificación diseñados en ADN de guisante. Utilizando 40 ng de ADN genómico de las accesiones Medora y Melrose como ADN molde y modificando las concentraciones de reactivos, se obtuvo amplificación bajo las siguientes condiciones (Tabla III.12):

Tabla III.12. Tabla de concentración de reacción para amplificación mediante PCR convencional

Reactivos	Concentración final
Cebador L	0,3 µM
Cebador R	0,3 µM
Buffer	1 ×
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	0,3 mM
Taq Hot-Start	1,2 U
ADN	40 ng
H ₂ O MQ	Hasta 25 µL

Las condiciones de amplificación también fueron ajustadas a las características de longitud y secuencia de los cebadores diseñados, al igual que se tuvo en cuenta el tamaño del producto de amplificación esperado (Tabla III.13):

Tabla III.13. Condiciones de amplificación mediante PCR convencional

1 ciclo	95°C	10 min
	95°C	1 min
35 ciclos	60°C*	1 min
	72°C	2 min
1 ciclo	72°C	8min

*: Temperatura decreciente de 0,5°C por ciclo en los primeros 10 ciclos

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 1% en TAE 1× y se tiñeron y fotografiaron tal y como se indica en el [Apartado III.1.2.1.4](#).

Tras la eliminación de aquellos sistemas de amplificación que resultaron ineficaces, bien por no amplificar para las muestras evaluadas o bien por presentar un patrón inespecífico, se procedió a optimizar las condiciones de qPCR.

La concentración de los reactivos para los ensayos fue optimizada para reducir volumen de reacción y seleccionar la cantidad necesaria de ADNc. De este modo se utilizó para todos los ensayos con el sistema *I8S* ARNr como tampón TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EEUU) y 2 µL del ADNc obtenido en la retrotranscripción. La concentración de los cebadores y sonda del sistema *I8S* fue 1×, tal y cómo se especifica en las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems, EEUU). Por tanto, tras el proceso de optimización, la mezcla de reactivos fue la descrita en la Tabla III.14:

Tabla III.14. Concentraciones de reacción para optimización de PCR en tiempo real

Reactivos	Concentración final
Sistema <i>I8S</i> (VIC™ - TAMRA™)	1 ×
TaqMan Universal PCR Master Mix	1 ×
ADNc	2 µL
H ₂ O MQ	Hasta 20 µL

En el caso de los sistemas diseñados se partió de la misma cantidad de ADNc y la concentración recomendada (Applied Biosystems, EEUU) 1× de la mezcla de PCR SYBR GREEN Universal PCR Master Mix con un volumen final de reacción de 20 µL. En base a estas condiciones se modificaron las concentraciones de los cebadores, *forward* y *reverse*, de cada uno de los sistemas de amplificación.

Las concentraciones probadas, en nM, fueron (en sentido *forward-reverse*): 50-50, 50-100, 100-50, 100-100, 50-300, 300-50, 100-300, 300-100 y 300-300.

Debido al gran número de sistemas diseñados, se optó por escoger al azar un total de 26 sistemas de amplificación, correspondiente al 20% de los sistemas diseñados. Se añadió como control positivo la misma cantidad de ADNc, el sistema *I8S* como gen de referencia, y tres NTC para comprobar la ausencia de amplificación inespecífica. Todas estas combinaciones se analizaron por triplicado con ADNc procedente del ARN extraído a partir de tejido foliar de la línea comercial Medora.

Se estandarizaron las condiciones de la mezcla de PCR en base a los resultados obtenidos para todos los sistemas de amplificación (Tabla III.15).

Tabla III.15. Concentraciones finales de reacción de amplificación por PCR en tiempo real

Reactivos	Concentración final
Sistemas diseñados	300 nM (cada)
SYBR GREEN Universal PCR Master Mix	1 ×
ADNc	2 µL
H ₂ O MQ	Hasta 20 µL

Las condiciones de amplificación seguidas para todos los experimentos realizados fueron las recomendadas para el gen de referencia *18S* por la casa comercial (Applied Biosystems, EEUU), tal y cómo se indica en la tabla III.16.

Tabla III.16. Condiciones finales de amplificación mediante PCR en tiempo real

1 ciclo	2 minutos	50°C
1 ciclo	10 minutos	95°C
50 ciclos	15 segundos	95°C
	1 minuto	Ta°C

Ta: Temperatura de anillamiento descrita para cada marcador

3. 3. Método de cuantificación

La transcripción reversa combinada con la PCR (*Reverse Transcription-PCR*: RT-PCR) conforman un método potente para cuantificar la expresión de los genes (Murphy *et al.*, 1990; Noonan *et al.*, 1990; Horikoshi *et al.*, 1992). La tecnología de la PCR en tiempo real, o PCR cuantitativa (*quantitative PCR*: qPCR), ha sido adaptada para llevar a cabo RT-PCR cuantitativa. Uno de los métodos más comúnmente utilizados para analizar datos procedentes de qPCR es la cuantificación relativa. La cuantificación relativa describe los cambios en la expresión de un gen objetivo en relación a algún grupo de referencia, tal como un control no tratado o una muestra a tiempo cero en un estudio a lo largo del tiempo.

La cuantificación relativa de los cambios en la expresión de genes mediante qPCR se ha realizado mediante las ecuaciones, supuestos, diseños experimentales, y validaciones descritos en el Boletín del Usuario de Applied Biosystems Número 2 (P/N 4303859). Se siguieron las normas de actuación descritas por Bustin *et al.* (2009) para el desarrollo de los experimentos de cuantificación relativa y los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa.

Para comprobar la sensibilidad y precisión en la cuantificación del sistema *18S* como gen de referencia a utilizar en los ensayos de expresión diferencial y validar el sistema, se analizaron 9 diluciones seriadas en factor 1:10 de ADN copia procedente de ARN extraído a partir de la línea de *P. sativum* Medora, cada una de ellas por triplicado.

Los resultados obtenidos, expresados en valores C_q para cada uno de los triplicados de las 9 diluciones, fueron analizados en primer lugar para comprobar si se podían aplicar pruebas paramétricas a los datos, en relación al cumplimiento de tres condiciones. La primera condición, variable dependiente de carácter numérico, que al ser el valor C_q se cumple. La segunda condición es la normalidad, referente a la distribución normal de los valores de la variable dependiente; para dicha comprobación se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Por último, la tercera condición, homocedasticidad, se comprobó mediante el cálculo del estadístico de Levene que comprueba la homogeneidad de varianzas.

Tras comprobar el cumplimiento de todas las condiciones se realizó ANOVA como prueba paramétrica para detectar la presencia de diferencias significativas entre las diluciones seriadas en función de la variable dependiente, es decir los valores C_q .

Para poder determinar a qué nivel o niveles se encontraban las diferencias significativas se realizaron análisis *post hoc*, basados en el tamaño muestral, la media armónica y $\alpha = 0,05$. Para poder determinar con fiabilidad el punto de diferenciación entre las diluciones seriadas, se aplicaron tres tipos de comparaciones múltiples de los subconjuntos; Student-Newman-Keuls, HSD de Tukey y Duncan.

En base a estos resultados se pudo establecer el límite de detección (LOD: *Limit of Detection*) del sistema de amplificación *18S* y su límite de cuantificación (LOQ: *Limit of Quantification*). La definición de LOD se corresponde con el menor nivel al cual el analito, en este caso ADNc de guisante, puede ser detectado con fiabilidad en una probabilidad del 95%, y que permite delimitar el rango lineal dinámico estableciendo el límite inferior. Por otro lado, LOQ es la menor cantidad en la que la precisión de la medida realizada muestra confiabilidad.

La construcción de la recta estándar se realizó en base a los resultados de LOD y LOQ mencionados. La recta se construyó en función de las diluciones correspondientes al rango lineal dinámico. Se calculó el coeficiente de regresión R^2 para comprobar la linealidad del sistema. Por último se calculó la eficiencia del sistema, E, en base a la ecuación:

$$E = 10^{-1/pdte} - 1$$

En la cual *pdte* es la pendiente de la recta estándar obtenida anteriormente.

Antes de realizar los análisis de cuantificación relativa se comprobó la sensibilidad y precisión en la cuantificación de los sistemas de amplificación diseñados. Se prepararon un total de 4 diluciones 1:10 seriadas a partir del ADNc procedente del *bulk* de ARN obtenido para el genotipo Medora en el experimento control.

Se comprobaron todos los sistemas de amplificación que resultaron seleccionados tras comprobar su óptima amplificación en ADN ([Apartado III.3.2.1.3](#)). Todos los sistemas se comprobaron para cada una

de las cuatro diluciones por triplicado, incluyendo en todos los análisis tres NTC para comprobar la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

En base a los resultados obtenidos para cada uno de los sistemas de amplificación se construyó su curva estándar. El ajuste a la recta se expresó mediante el coeficiente de regresión R^2 y la eficiencia de cada sistema se expresó como E, de igual modo que se describe en el apartado anterior para la validación del control interno ([Apartado III.3.2.2.1](#)).

La cuantificación relativa de los cambios en la expresión de genes mediante qPCR se ha realizado siguiendo las recomendaciones descritas en el Boletín del Usuario de Applied Biosystems Número 2 (P/N 4303859), basados en el método comparativo de C_q o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$. En este método, la cantidad obtenida para el sistema amplificado, normalizada mediante el gen de referencia, viene dada por: $2^{-\Delta\Delta C_q}$. El método se basa en la ecuación que describe la amplificación exponencial de la PCR:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n$$

En la cual X_n es el número de moléculas del objetivo en el ciclo n; X_0 es el número inicial de moléculas; E_X es la eficiencia del sistema de amplificación; y n el número de ciclos. C_q indica el número de ciclos al cual la cantidad de objetivo amplificado alcanza un límite fijado (*threshold*):

$$X_q = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{q,X}} = K_X$$

Donde X_q es el número límite de moléculas objetivo; $C_{q,X}$ es el ciclo límite para la amplificación objetivo; y K_X es una constante.

Si tenemos en cuenta una ecuación similar para la reacción del gen de referencia:

$$R_q = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{q,R}} = K_R$$

Donde R_T es el número límite de moléculas de referencia; $C_{q,R}$ es el ciclo límite para la amplificación de referencia y; K_R es una constante.

A partir de estas ecuaciones y asumiendo que las eficiencias de todos los sistemas son similares se obtiene la siguiente fórmula:

$$\frac{X_{N,T}}{X_{N,R}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{q,T}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{q,R}}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_q}$$

Y, por tanto:

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q,T} - \Delta C_{q,R}$$

En primer lugar se analizó la expresión diferencial entre dos genotipos diferentes de guisante en cuanto a tolerancia a heladas; por un lado Medora como variedad de primavera y susceptible a heladas y por otro lado, Melrose, variedad de siembra otoño-invernal como genotipo tolerante a heladas. Para determinar la diferencia en la expresión de los genes analizados se empleó siempre el genotipo susceptible en condiciones control, en este caso Medora. La comparación de la expresión diferencial se realizó sobre las muestras sometidas al ensayo AC; dos semanas de aclimatación a 4°C.

Se separaron por un lado aquellos sistemas que mostraron sobreexpresión entre genotipos y, por otro lado, los que mostraron subexpresión. Por último, se prepararon aquellos sistemas de amplificación que no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles de expresión entre ambos genotipos.

Tanto subexpresión como sobreexpresión se dividió en dos niveles; un nivel claro de expresión diferencial, para aquellos sistemas de amplificación que mostraron valores absolutos mayores de 3, y un nivel bajo de expresión diferencial cuando los valores absolutos de $\Delta\Delta C_q$ estaban entre 2 y 3. Los valores entre -2 y 2 se consideraron como expresión similar entre los dos genotipos, asumiendo ausencia de expresión diferencial.

Se definieron los criterios para realizar análisis comparativos entre los niveles de expresión de los dos tipos de líneas de guisante, tolerante (MI) y susceptible (Md), con respecto al estado control (NA) frente al estado tras aclimatación (AC). De forma que se pudieran diferenciar las diferentes causas en la variación de los niveles de expresión, expresados como $\Delta\Delta C_q$.

Para comprobar que los resultados obtenidos para los genotipos Medora y Melrose se mantenían independientemente de la línea a estudio, se analizaron los sistemas de amplificación seleccionados en los otros 4 genotipos dos susceptibles Terese (Te) y ZP-1366 (Tu), y dos tolerantes, Champagne (Cg) y Cheyenne (Cy) y se compararon con los resultados obtenidos previamente para los genotipos Medora (Md) y Melrose (MI). A partir de los valores C_q se calcularon los $\Delta\Delta C_q$ y se analizaron los resultados para comprobar: (1) los niveles de expresión diferencial de las muestras sin aclimatar y tras la aclimatación; (2) los resultados de la evaluación por separado de genotipos susceptibles y genotipos tolerantes, tras el experimento control y tras tratamiento de aclimatación; (3) el análisis conjunto de la expresión diferencial mostrada por las seis líneas evaluadas. Finalmente se pudieron determinar los genes cuya expresión se vio potenciada o reprimida por efecto de la aclimatación, independientemente del genotipo específico.

Capítulo IV. Resultados y Discusión

1. Estudio de la variabilidad genética y análisis de la genética de poblaciones

1. 1. Análisis descriptivo de la variabilidad genética

De los 337 marcadores moleculares previamente considerados en base a la bibliografía revisada, tras el proceso de selección y cribado ([Apartado III.1.1.2.2](#)), finalmente se seleccionaron un total de 83 (el 24,63% de los marcadores de partida): 31 de tipo RBIP (55,36% de los RBIP iniciales), 20 de tipo SSR (6,83%) y 32 GTM (36,78%). En la Tabla IV.1 figura la relación de *locus* definidos por los marcadores finalmente seleccionados, junto con el número de alelos detectado para cada uno de ellos en la colección de estudio.

Así, los marcadores moleculares analizados han permitido detectar un total de 233 alelos correspondientes al total de 83 *loci* polimórficos, lo que supone una media de 2,84 alelos por *locus*. Sin embargo, se observaron diferencias entre los distintos tipos de marcadores moleculares (Tabla IV.1). En concreto los GTM mostraron una media de 2,28 alelos por *locus* y, de forma similar los RBIP alcanzaron una media de 2,28 alelos por *locus*. Por otra parte, los SSR presentaron una media de 4,15 alelos por *locus*.

Los SSR destacaron por su carácter multialélico, de tal forma que en la muestra analizada se pudieron diferenciar hasta 6 formas alélicas en los SSR *AA321* y *AD134*, siendo el *locus* con mayor número de alelos un SSR, *AA285*, con un total de 7 variantes alélicas dentro de la muestra a estudio. Por su parte, los RBIP se presentaron en su mayoría como bialélicos, considerando en ello tanto los que mostraron las dos variantes alélicas en relación a presencia o ausencia de banda, como los que mostraron dos variantes alélicas en función de dos tamaños diferentes de productos de amplificación, asociados a priori con presencia o ausencia de inserto en el producto de amplificación. Finalmente, entre los marcadores basados en genes, GTM, destacaron los *loci* con dos o tres alelos, aunque algunos mostraron mayor número, como *M27*, con 5 alelos.

En el [Anexo IV.1](#) se aportan las frecuencias alélicas detectadas en cada uno de los *loci*. Tan sólo 5 *loci*, todos ellos RBIP, presentaron algún alelo con frecuencia superior al 95% para alguno de sus alelos,

mientras que el 68% de los *loci* analizados mostraron alguna variante alélica con frecuencia menor al 5% dentro de la colección.

Tabla IV.1. Número de alelos por *locus* obtenido en la muestra a estudio

Tipo	<i>Locus</i>	Número alelos	Tipo	<i>Locus</i>	Número alelos	Tipo	<i>Locus</i>	Número alelos
ASP	<i>AgpS1</i>	1*	SSR	<i>A9</i>	4	RBIP	<i>1006NR13</i>	2
ASP	<i>Gbsts1</i>	2	SSR	<i>AA175</i>	5	RBIP	<i>1006NR2</i>	1*
ASP	<i>Gbsts2</i>	3	SSR	<i>AA200</i>	4	RBIP	<i>1006NR32</i>	1*
ASP	<i>NTH1</i>	3	SSR	<i>AA278</i>	5	RBIP	<i>1006-x19</i>	1*
ASP	<i>Pore</i>	4	SSR	<i>AA285</i>	7	RBIP	<i>1006-x21</i>	3
CAPS	<i>Agpl1</i>	2	SSR	<i>AA321</i>	6	RBIP	<i>1006-X50</i>	1*
CAPS	<i>AgpS2</i>	3	SSR	<i>AA335</i>	4	RBIP	<i>1006-X58</i>	2
CAPS	<i>Nin</i>	1*	SSR	<i>AA345</i>	2	RBIP	<i>1794-1</i>	3
CAPS	<i>Nlm</i>	2	SSR	<i>AA72</i>	5	RBIP	<i>1794-2</i>	4
CAPS	<i>Pip1</i>	1*	SSR	<i>AB100</i>	2	RBIP	<i>1794-X9</i>	2
CAPS	<i>PsAS1</i>	2	SSR	<i>AB113</i>	4	RBIP	<i>2055NR1</i>	4
CAPS	<i>PsAS2</i>	2	SSR	<i>AB119</i>	4	RBIP	<i>2055NR51</i>	1*
CAPS	<i>Sbe2</i>	2	SSR	<i>AB122</i>	3	RBIP	<i>2055NR53</i>	3
CAPS	<i>Sps</i>	2	SSR	<i>AB130</i>	3	RBIP	<i>2385-X56</i>	2
CAPS	<i>Tip</i>	2	SSR	<i>AB23</i>	5	RBIP	<i>281-X1</i>	5
Size	<i>Aldo</i>	3	SSR	<i>AC58</i>	3	RBIP	<i>281-X40</i>	3
Size	<i>Clpser</i>	2	SSR	<i>AC76b</i>	2	RBIP	<i>281-X44</i>	5
Size	<i>Egl1</i>	2	SSR	<i>AD134</i>	6	RBIP	<i>281-X5</i>	3
Size	<i>Ppgm</i>	3	SSR	<i>AD146</i>	5	RBIP	<i>399-9X</i>	2
Size	<i>PsAAP2</i>	2	SSR	<i>D21</i>	4	RBIP	<i>399-X131</i>	4
Size	<i>PsAAT1</i>	2				RBIP	<i>45-X31</i>	2
Size	<i>Sugtrans</i>	3				RBIP	<i>64-X14</i>	1*
Size	<i>Sut1</i>	2				RBIP	<i>64-X29</i>	2
Size	<i>Xyft</i>	3				RBIP	<i>64-X76</i>	3
STS	<i>M27</i>	5				RBIP	<i>95-X19</i>	2
STS	<i>P108</i>	2				RBIP	<i>95-X2</i>	3
STS	<i>P628</i>	2				RBIP	<i>95-X25</i>	1*
STS	<i>Q126</i>	2				RBIP	<i>95-X43</i>	3
STS	<i>sM2P5-234</i>	2				RBIP	<i>Birte-X16</i>	2
STS	<i>sN13-927</i>	1*				RBIP	<i>Birte-X34</i>	2
STS	<i>sO12-581</i>	2				RBIP	<i>Birte-X5</i>	4
STS	<i>sT11-800</i>	3						

*: alelos polimórficos en función de presencia / ausencia de producto de amplificación

En la Tabla IV.2 se muestran los resultados del análisis descriptivo de la variabilidad genética a nivel de *loci*, en cuanto a número observado de alelos, número efectivo de los mismos, porcentaje de polimorfismo de los *loci* e índice de Shannon considerando la clasificación taxonómica de las diferentes accesiones. Conviene matizar que del grupo de accesiones clasificada como *Pisum sativum* se han seleccionado solamente aquellas accesiones clasificadas por los bancos como *Pisum sativum* subsp. *sativum*.

Tabla IV.2. Parámetros descriptivos de diversidad de los *loci* a estudio en los distintos grupos

Grupo	N	n_a	n_e	I	% Polim
<i>P. fulvum</i>	3	1,80	1,66	0,47	59,76
<i>P. abyssinicum</i>	5	1,68	1,51	0,37	52,44
<i>P. elatius</i>	14	2,89	2,11	0,78	95,12
<i>P. humile</i>	2	1,57	1,53	0,37	53,66
<i>P. arvense</i>	4	1,99	1,74	0,55	79,27
<i>P. sativum</i>	8	3,46	1,91	0,72	100,00

N: número de accesiones analizados; n_a: número observado de alelos; n_e: número efectivo de alelos; I: índice de Shannon; % Polim: porcentaje de *loci* polimórficos

El número de alelos por *locus* observado resultó diferir en función del tipo de marcador (Tabla IV.3). En líneas generales los RBIP se mostraron como *loci* bialélicos. Esta predominancia de *loci* bialélicos coincide con lo descrito en la bibliografía (Jing *et al.*, 2005) como ocupado/no ocupado. No obstante, en un total de 14 RBIP los alelos detectados no coincidieron en número con lo descrito en la bibliografía al presentar más de dos alelos o, incluso, algunos de los RBIP mostraron otros alelos que no correspondían a los tamaños esperados.

Este típico carácter bialélico de los marcadores RBIP se menciona en el trabajo original en el que fueron descritos por primera vez (Flavell *et al.*, 1998), así como en trabajos posteriores (Jing *et al.*, 2005; 2012). De hecho, este carácter bialélico en función de presencia o ausencia de inserto es el que define habitualmente el método de anotación para RBIP en diversos estudios (Smýkal *et al.*, 2008a; 2008b; Jing *et al.*, 2010; 2012).

Sin embargo, Martin-Sanz *et al.* (2011) recogen toda la información obtenida a través de este tipo de marcadores, considerando todos los posibles alelos obtenidos, detallando la importancia de esta consideración en la discriminación entre genotipos y la distribución alélica en los diferentes taxones del género.

Estos alelos que en función de la bibliografía no se correspondían a los tamaños esperados para la presencia o ausencia de inserto aparecieron siempre con baja frecuencia en la colección estudiada, y asociados con accesiones no pertenecientes al taxón *P. sativum*. Por tanto, se optó por describir cada alelo

por su tamaño de amplificación, al igual que para el resto de marcadores moleculares, y no como se sugiere en la bibliografía como ocupado o no ocupado.

La totalidad de *loci* resultaron polimórficos para el grupo de *P. sativum*, siguiendo con valores elevados, destacando también con el 95% de los *loci* polimórficos el grupo de accesiones de *P. elatius*. En un nivel de polimorfismo alto, pero no tan elevado como los anteriores, se situó *P. arvense*, con valores próximos al 80%. Por último, los taxones *P. fulvum*, *P. humile* y *P. abyssinicum* no superaron el 60% de *loci* polimórficos, si bien no se descarta que este menor porcentaje pueda ser debido al bajo número de accesiones considerado en estos grupos.

El mayor número de alelos observados resultó ser 3,46 y se encontró en el grupo de *P. sativum*, seguido por *P. elatius*. Se observó un número inferior a 2 alelos observados en los grupos *P. arvense* y *P. fulvum*, siendo los valores más bajos los encontrados en *P. abyssinicum* y *P. humile* con 1,68 y 1,57 alelos observados respectivamente.

En cuanto al número efectivo de alelos, el mayor valor se obtuvo en el grupo de *P. elatius*, siendo el único grupo que presentó más de dos alelos efectivos. Los siguientes grupos fueron, en primer lugar *P. sativum*, y con valores similares se *P. arvense*. En este sentido, se comprobó el efecto de incluir las frecuencias alélicas en la estimación de la variabilidad, como es en el caso del parámetro descriptivo relativo al número efectivo de alelos, ya que *P. elatius* pasó a mostrar mayor variabilidad que *P. sativum*, a diferencia de los resultados obtenidos para los índices de variabilidad que prescindían de este factor (porcentaje de *loci* polimórficos y número observado de alelos). De nuevo, los grupos con menores valores fueron *P. fulvum*, *P. humile* y *P. abyssinicum*. No obstante, como en el caso del número observado de alelos, esta medida está fuertemente condicionada por el número de alelos por *locus* polimórfico, la proporción de *loci* polimórficos, y además por las frecuencias alélicas. Por tanto, aunque sí tiene en cuenta las frecuencias alélicas, los valores obtenidos no resultan totalmente comparables entre muestras o poblaciones cuando el número de individuos y/o alelos difiere en cada grupo, siendo en nuestro caso muy acusada dicha diferencia.

El índice de Shannon, como medida de diversidad entendida como la riqueza alélica dentro de cada grupo o diversidad alfa, permite estimar la variabilidad genética considerando el número de individuos por grupo, el número de grupos, el número total de individuos y la abundancia relativa de cada grupo. Así, este parámetro ha confirmado la presencia de una mayor variabilidad dentro de los grupos de *P. elatius* y *P. sativum* (0,78 y 0,72 respectivamente), mientras que la menor variabilidad se ha encontrado dentro de los grupos *P. humile* y *P. abyssinicum* (ambos con valor de 0,37). Sin embargo, en función de este parámetro, *P. fulvum*, presenta valores de variabilidad intermedia, comparativamente mayores a los detectados por otros parámetros que pudieran estar influenciados por el bajo número de accesiones (3) considerado en este taxón.

En la Tabla IV.3 se presentan los resultados relativos a los índices anteriormente descritos, pero considerando esta vez la información particular para cada tipo de marcador.

Tabla IV.3. Parámetros descriptivos de diversidad para cada tipo de *loci* a estudio en los distintos grupos

Grupo	Tipo marcador	n_a	n_e	I	% Polim
<i>P. fulvum</i>	RBIP	1,71	1,61	0,45	60,00
	GTM	1,62	1,45	0,37	46,88
	SSR	2,15	1,99	0,65	80,00
	<i>Globlal</i>	<i>1,80</i>	<i>1,66</i>	<i>0,47</i>	<i>59,76</i>
<i>P. abyssinicum</i>	RBIP	1,63	1,46	0,33	43,33
	GTM	1,56	1,40	0,32	56,25
	SSR	1,95	1,75	0,51	60,00
	<i>Globlal</i>	<i>1,68</i>	<i>1,51</i>	<i>0,37</i>	<i>52,44</i>
<i>P. elatius</i>	RBIP	2,73	1,90	0,70	93,33
	GTM	2,47	1,76	0,64	93,75
	SSR	3,80	2,96	1,12	100,00
	<i>Globlal</i>	<i>2,89</i>	<i>2,11</i>	<i>0,78</i>	<i>95,12</i>
<i>P. humile</i>	RBIP	1,53	1,48	0,35	50,00
	GTM	1,44	1,40	0,29	43,75
	SSR	1,85	1,80	0,55	75,00
	<i>Globlal</i>	<i>1,57</i>	<i>1,53</i>	<i>0,37</i>	<i>53,66</i>
<i>P. arvense</i>	RBIP	1,93	1,65	0,52	76,67
	GTM	1,91	1,69	0,52	78,12
	SSR	2,20	1,97	0,66	85,00
	<i>Globlal</i>	<i>1,99</i>	<i>1,74</i>	<i>0,55</i>	<i>79,27</i>
<i>P. sativum</i>	RBIP	3,20	1,50	0,48	100,00
	GTM	3,00	1,99	0,76	100,00
	SSR	4,60	2,39	1,00	100,00
	<i>Globlal</i>	<i>3,46</i>	<i>1,91</i>	<i>0,72</i>	<i>100,00</i>

n_a : número observado de alelos; n_e : número efectivo de alelos; I: índice de Shannon; % Polim: porcentaje de *loci* polimórficos

Los marcadores tipo SSR se han mostrado, para todos los parámetros descriptivos y grupos considerados, como los más variables dentro de la colección, siendo sus valores los más altos detectados en todos los casos. Sin embargo, la asociación de valores más bajos con algún tipo de marcador resultó dependiente del parámetro estudiado y del grupo analizado.

Así, el tipo de marcadores GTM presentó el menor número observado de alelos por *locus* para todos los grupos. Al considerar el parámetro relativo a número efectivo de alelos se observaron similares

resultados, salvo en los casos de los grupos *P. sativum* y *P. arvense* en los que fueron los RBIP los que presentaron los valores mínimos.

Para el índice de Shannon, la variabilidad detectada por los RBIP en *P. sativum* fue la menor de los tres tipos de marcador. Para el resto de taxones, salvo en *P. arvense* en el que los valores para GTM y RBIP fueron similares (0,52), los menores valores detectaron para los GTM. En relación a los valores obtenidos para el porcentaje de polimorfismo, todos los tipos de marcadores devolvieron el valor máximo para el grupo de *P. sativum*. En contraste, *P. humile* y *P. abyssinicum* sólo alcanzaron un 43% de *loci* polimórficos para GTM y RBIP respectivamente. Los RBIP mostraron los menores valores en los grupos que engloban a los taxones *P. abyssinicum*, *P. arvense* y *P. elatius*, mientras que los GTM los mostraron para *P. fulvum* y *P. humile*. El grupo *P. sativum* presentó el 100% de los *loci* en estado polimórfico, en contraste, *P. humile* y *P. abyssinicum* sólo alcanzaron un 43% de *loci* polimórficos para GTM y RBIP respectivamente.

El número de alelos observados por RBIP se estableció entre 1,53 y 3,20, resultado similar al encontrado por Smýkal *et al.* (2008a) de 2,69 alelos observados por RBIP. En referencia al número de alelos efectivos y al índice de Shannon, dicho trabajo presenta valores de 1,74 y 0,62 respectivamente, siendo estos resultados similares a los hallados en el presente trabajo (número efectivo de alelos: 1,46-1,90 e índice de Shannon: 0,33-0,70). Por último, Martin-Sanz *et al.* (2011) obtienen entre 2 y 4 alelos por *locus*, correspondiéndose al número de alelos máximo y mínimo detectado en nuestro trabajo. Por tanto, los resultados obtenidos en cuanto al número de variantes alélicas, su grado de polimorfismo y la variabilidad genética detectada por este tipo de marcadores, son consistentes con la información detallada en otros trabajos afines.

El carácter multialélico resultante del análisis mediante SSR era esperado, ya que numerosos trabajos anteriores describen a estos marcadores como altamente polimórficos (Tam *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Ijaz y Khan, 2009), incluyendo estudios realizados en guisante (Flavell *et al.*, 1998; Becher *et al.*, 2000; Baranger *et al.*, 2004; Tar'an *et al.*, 2005) en los que se demuestra su elevado polimorfismo, precisión, cobertura del genoma y codominancia, del mismo modo que se demuestra su robustez en guisante (Burstin *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2002; Loridon *et al.*, 2005).

Los SSR son marcadores ampliamente utilizados y han servido como herramienta en el estudio de diversidad del género *Pisum* en los trabajos mencionados y en otros más actuales (Smýkal, 2006; Smýkal *et al.*, 2008a; 2008b; Nasiri *et al.*, 2009; Sarikamiş *et al.*, 2010) demostrando su utilidad y versatilidad. En este sentido, el número observado de alelos llegó a superar los 4 alelos en el grupo *P. sativum* y se sitúa cercano a 3 alelos efectivos en el taxón *P. elatius*. Este taxón mostró en nuestro estudio un elevado índice de Shannon (1,12). El número de alelos observados por SSR se estableció entre 1,85 y 4,6, con lo que este resultado es similar al encontrado por Burstin *et al.* (2001) de 2,9 alelos en total y 3,6 alelos para los *loci* polimórficos. En cambio, es ligeramente inferior al encontrado por Baranger *et al.* (2004), en el cual

alcanzan un número medio de 5,6 alelos por SSR, aunque aclara la presencia de un 50% de alelos raros. Además, estos resultados son consistentes con otros trabajos similares realizados en especies autógamas como *Medicago* sp (Diwan *et al.*, 2000), cebada (Becker y Heun, 1995) o coco (Perera *et al.*, 2000).

En relación a la aplicación de marcadores basados en secuencias de genes, GTM, en estudios de diversidad el número de trabajos publicados es mucho más reducido. No obstante, Baranger *et al.* (2004) emplearon, entre otros, STS para el estudio de diversidad de guisante y detectaron un elevado número de alelos (3,60) sólo superado por los SSR. Estos resultados son ligeramente superiores a los encontrados en este trabajo (1,44-3,00), aunque también revelan un elevado porcentaje de alelos raros, hasta un 38%.

Los marcadores basados en secuencias génicas, GTM, han permitido determinar variabilidad genética presente en la muestra a estudio, aunque no han sido capaces de alcanzar los niveles del resto de marcadores moleculares empleados en este trabajo respecto a los diferentes taxones presentes en la muestra a estudio. Sin embargo, en referencia a la variabilidad estimada en los tres subgrupos dentro de *P. sativum*, han superado a los marcadores RBIP. En este sentido, parecen mostrarse como herramientas útiles en estimas de variabilidad cuando las accesiones son próximas entre sí a nivel taxonómico.

En resumen, los resultados obtenidos para cada tipo de marcador molecular son consistentes con los obtenidos por otros autores. La comparación entre los valores alcanzados para los parámetros analizados en relación al tipo de marcador molecular establece que los SSR son los marcadores con mayor número de variantes alélicas, mayor polimorfismo y un rango más amplio de variabilidad genética detectada, características definidas ya en anteriores trabajos. En líneas generales para todos los parámetros presentados, los SSR permiten establecer un mayor rango de variación en la variabilidad encontrada para cada grupo. Por el contrario, los RBIP resultaron ser los marcadores moleculares con un menor rango de variación dentro del taxón *P. sativum*, lo cual puede reducir la posibilidad de detectar y establecer diferencias entre posibles subgrupos de este taxón y dentro de ellos.

No obstante, si bien el grado de diversidad genética detectada por los RBIP dentro de cada taxón considerado ha resultado ser inferior a la detectada por los SSR, han resultado ser adecuados en el caso de estudios que engloben diferentes taxones o líneas de guisante poco relacionadas entre sí, tal y como también ha sido sugerido por otros autores (Smykal *et al.*, 2008a; Jing *et al.*, 2012). Los GTM han sido los marcadores que han presentado menor número medio de alelos, menor polimorfismo y un rango de variabilidad genética inferior al resto, si bien sus valores han sido superiores a los RBIP en todos los grupos de *P. sativum* (el taxón *P. sativum*, y los grupos de silvestres y ecotipos). Esta última apreciación hace de los GTM un tipo de marcadores moleculares potencialmente interesante en el estudio de líneas de *P. sativum* relacionadas entre sí, en concordancia con el trabajo de Konovalov *et al.* (2009) en referencia a los CAPS.

El agrupamiento de las accesiones dentro de grupos basados en la taxonomía permite detectar posibles *loci* o configuraciones alélicas fijados, característicos o propios de alguno o varios de esos grupos. Estas configuraciones pueden ser comunes para todas las accesiones dentro de un mismo grupo, específicas o propias sólo de un grupo, o compartida por unos pocos, o descartante en la medida que sea exclusiva de uno o varios grupos pero su ausencia en un determinado genotipo permita inferir con probabilidad alta su no pertenencia a un determinado grupo o taxón. Este tipo de información es de esta forma de gran utilidad en procesos de clasificación o de establecimiento de relaciones.

En nuestro caso, se han considerado aquellos *loci* fijados en un grupo determinado, considerando como tal aquellos para los que alguna variante alélica aparezca en el mismo con frecuencia igual a 1 (alelo típico del grupo taxonómico) o a 0 (alelo descartante del grupo taxonómico). Los mismos se presentan en la Tabla IV.4 en lo referente al número de *loci* con algún alelo fijado para cada uno de los grupos y los respectivos marcadores moleculares que los han mostrado.

Tabla IV.4. *Loci* fijados en un solo grupo

Grupo	RBIP	GTM	SSR	Total
<i>P. fulvum</i>	281-x5	<i>sT11-800</i> , <i>PSAS2</i>		3
<i>P. abyssinicum</i>	1006NR13	<i>Sps</i> , <i>Sbe</i>	A9, AA200, AB113	6
<i>P. elatius</i>				-
<i>P. humile</i>	399 9x	<i>Gbst2</i> , <i>Sugtrans</i> , <i>Xyft</i>	AA345, AB122, D21	7
<i>P. arvense</i>				-
<i>P. sativum</i>				-

Todos los alelos fijados encontrados lo han sido en los taxones *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. humile*, mientras que el resto de taxones mostraron diferentes variantes alélicas para el global de las accesiones que los integraban.

El taxón *P. humile* mostró la presencia del alelo *b* para seis de los *loci*, y el alelo *a* para *D21*. Todas las accesiones del grupo *P. abyssinicum* manifestaron el alelo *a* de los *loci* 1006NR13, *Sbe*, AA200 y AB113 y el alelo *b* de los *loci* *Sps* y A9. *P. fulvum* presentó tres *loci* fijados dentro del grupo que correspondieron al alelo *a* de *PSAS2* y los alelos *b* de 281-x5 y *sT11-800*. Para el caso concreto de los RBIP, *P. fulvum* mostró la ausencia de inserto del RBIP 281-x5 (correspondiente al producto de amplificación de 305 pb), mientras que *P. humile* mostró un producto de amplificación del marcador 399 9x de 126 pb correspondiente a la presencia de inserto. *P.abyssinicum* también mostró para todas sus accesiones presencia de inserto para el RBIP 1006NR13 al amplificar un producto de 151 pb .En la Tabla IV.5 se muestran los resultados relativos a índice de heterocigosidad y la distribución de la variabilidad entre los diferentes grupos taxonómicos.

Tabla IV.5. Índices de heterocigosidad y diferenciación inter e intra-grupal

Grupo	He	P _j	Índices de Fijación	
<i>P. fulvum</i>	0,382	0,168	P _T	0,306
<i>P. abyssinicum</i>	0,270	0,122	H _T	0,350
<i>P. elatius</i>	0,468	0,282	P _S	0,201
<i>P. humile</i>	0,350	0,165	D _{ST}	0,120
<i>P. arvense</i>	0,413	0,215	D _{ST'}	0,105
<i>P. sativum</i>	0,421	0,242	G _{ST}	0,343
Global	0,350	0,306	D _{ST} /P _S	0,522
Media intra	0,350	0,201	F _{ST'}	0,324

He: heterocigosidad; P_j: polimorfismo; H_T: heterocigosidad total esperada; H_S: heterocigosidad interna; P_T: polimorfismo total; P_S: polimorfismo intra-grupal; D_{ST}: polimorfismo inter-grupal; G_{ST}: coeficiente de variación

El grado de polimorfismo dentro de cada grupo taxonómico osciló entre el 12,2% y el 28,2%, correspondiendo los valores máximo y mínimo a los taxones *P. elatius* y *P. abyssinicum* respectivamente. El grado de polimorfismo de *P. humile* y *P. fulvum* fue bajo, y en ambos casos similar al de *P. abyssinicum*, mientras que *P. arvense* y *P. sativum* mostraron grados de polimorfismo más elevados y semejantes a *P. elatius*.

El grado de polimorfismo total, correspondiente a los seis taxones agrupados, alcanzó el 30,6%. El grado de polimorfismo inter-grupal llegó al 20,1%, indicando que hay una parte importante de esa variabilidad dentro de cada taxón.

En nuestra muestra el valor de G_{ST} resultó ser 0,343, que indica que el 34,3% de la variabilidad total se debe a la variabilidad entre taxones. La variabilidad intra-grupos resultó elevada, tal como se ha comentado previamente ya que el valor de P_S de 0,201, grado de polimorfismo intra-grupal, es próximo al valor de 0,306, correspondiente al polimorfismo total presente en la muestra evaluada. El valor del parámetro D_{ST}/P_S fue 0,522, lo cual implica que la mayoría de la variabilidad intra-grupal tiene un incidencia elevada en la variabilidad total.

Con el fin de profundizar en la distribución de la variabilidad se ha realizado un análisis mediante AMOVA (análisis de la varianza molecular), considerando los grupos basados en la taxonomía hasta ahora considerados y añadiendo una nueva jerarquía en el modelo en función del origen geográfico de las accesiones. De esta forma el modelo generado permite indagar en la importancia relativa sobre la variabilidad detectada de las diferencias entre los grupos taxonómicos, el origen geográfico dentro de taxon (considerando el continente de procedencia) y entre las distintas accesiones dentro de cada origen y grupo taxonómico. Los resultados se muestran en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Resultados de AMOVA para la colección global

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Varianza de los componentes	Porcentaje de variación
Taxones	5	261,401	2,081	19,599
Orígenes (taxón)	23	371,431	0,832	7,832
Accesiones (origen * taxón)	259	1957,679	7,705	72,569
Total		2590,510	10,617	100,000

El análisis AMOVA permitió establecer que la mayor fuente de variación residía entre las diferentes accesiones. El mayor porcentaje de la variabilidad genética (72,57%) correspondió a las diferencias en la fuente de variación accesiones jerarquizadas en orígenes y taxones, seguida de las diferencias entre taxones (19,59%) y por último a las diferencias entre orígenes dentro de cada taxón (7,83%).

Los resultados derivados del AMOVA sugieren que hay diferencias entre los taxones dentro del género *Pisum*, si bien hay una importante fuente de variabilidad dentro de ellos, que no parece haber sido explicada por el origen geográfico, al menos en lo que a distribución entre continentes se refiere. De esta forma, una clasificación en cuanto al origen geográfico no parece adecuada para profundizar en la estructura poblacional de la colección en estudio.

Los resultados estudio de las frecuencias alélicas de las accesiones que conforman cada taxón dentro de la población son consistentes con los presentados por otros autores (Vershinin *et al.*, 2003; Martin-Sanz *et al.*, 2011). El taxón con mayor número de alelos fijados (3 SSR, 3 GTM y 1 RBIP) fue *P. humile*. El taxón *P. abyssinicum* ha destacado por su limitada diversidad genética, según diversos autores (Ellis *et al.*, 1998; Pearce *et al.*, 2000; Vershinin *et al.*, 2003; Baranger *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2005; 2007; 2010; Smýkal *et al.*, 2011). Este taxón, caracterizado por ser silvestre y situarse taxonómicamente cercano a *P. elatius*, ha mostrado un elevado número de alelos fijados, lo cual probablemente se deba a un número de accesiones muy limitado. Esto implica que este resultado puede no ser significativo, pero si debe tenerse en cuenta en futuros estudios.

Los taxones *P. sativum* y *P. arvense* no han presentado alelos fijados para ninguno de los marcadores analizados en este estudio. En este sentido, y si asumimos la clasificación propuesta por Maxted y Ambrose (2000) en la que *arvense* es considerada una variedad dentro de la subespecie *P. sativum* subsp *sativum*, el taxón *P. sativum* no presenta bandas únicas y específicas de taxón, al igual que en los resultados presentados por Vershinin *et al.* (2003) tras su análisis mediante marcadores basados en elementos trasponibles.

Los parámetros relativos a índices de polimorfismo mostraron a *P. fulvum* y *P. abyssinicum* como los taxones con menor diversidad genética, frente a *P. elatius*, *P. sativum* o *P. arvense* que presentaban valores más elevados.

Esto es coherente con trabajos como el de Vershinin *et al.* (2003), que detalla valores de heterocigosidad para diferentes taxones, y en el caso de *P. abyssinicum* detectaron una heterocigosidad de 0,156, siendo éste el taxón con menor heterocigosidad, mientras que el taxón con mayor heterocigosidad resultó ser *P. elatius* (0,597). En nuestro estudio coincidieron ambos taxones como mínimo y máximo representantes de la heterocigosidad, si bien la diferencia encontrada no resultó tan amplia (0,270 frente a 0,468). La heterocigosidad esperada media encontrada en la colección global ha sido 0,440, valor muy parecido al encontrado en Martín-Sanz *et al.* (2011) dentro de la colección global analizada: 0,451.

Estos resultados concuerdan con la ausencia de relación entre grupos obtenidos mediante RBIP en Martín-Sanz *et al.* (2011) y el origen geográfico, o entre los grupos definidos mediante ISSR por Lázaro y Aguinagalde (2006) y regiones agro-climáticas originarias. Los resultados obtenidos sobre la distribución de la variabilidad muestran una estructura basada en taxones, indicando que el origen geográfico no parece ser claramente determinante de una posible estructuración de la variabilidad genética dentro de cada taxón. Por tanto, el paso siguiente plantea el estudio del posible patrón de relación entre las accesiones que integran cada taxón.

1. 2. Estructura de la población a nivel genético

1. 3. Aplicación de un método basado en distancias

En el [Anexo IV.2](#), se presenta el dendrograma basado en el proceso de agrupación Neighbour Joining con 1000 remuestreos utilizando para la matriz de distancias el índice de Link *et al.*, (1995). Dicho dendrograma no parece permitir una posible estructura en la colección más allá de las separaciones entre los taxones *P. sativum*, *P. abyssinicum* y *P. fulvum*. Sí se puede comentar que se observa una aparente tendencia, si bien muy débil, a agrupar las accesiones de *P. sativum* según el tipo de material (variedades comerciales, variedades locales, ecotipos, etc) y su origen geográfico, si bien esta débil tendencia es simplemente intuitiva, no siendo reflejo real de una definición clara de los grupos en nodos dentro del dendrograma, pues no se ha encontrado un patrón común que compartieran las accesiones integrantes de cada grupo formado en el árbol.

Esta dificultad en intentar extraer mayor información de la posible estructura de la colección en estudio puede estar motivada por el número de accesiones que la componen, pues dicho número determina la complejidad del análisis de diversidad e influye en el proceso de agrupación y la clasificación obtenida. En este sentido, la bibliografía sobre diversidad genética en guisante recoge análisis realizados de forma individualizada para cada accesión cuando el número de accesiones no es muy elevado. A modo de ejemplos hay diferentes autores que han publicado trabajos evaluando poblaciones con bajo número de accesiones, como pueden citarse Vershinin *et al.* (2003) con 52 accesiones, Jing *et al.* (2005) con las mismas 52 accesiones o Jing *et al.* (2007) con un total de 45 accesiones, sin que haya consenso entre ellos

en el método de estimación de distancias génicas entre accesiones, si bien todos utilizan Neighbour Joining como algoritmo en la obtención de los dendrogramas.

En este trabajo en el que el número de accesiones es superior a los trabajos anteriormente mencionados, se han encontrado dificultades en detectar posibles criterios para establecer jerarquías o agrupaciones, pues tan sólo se ha mostrado cierta separación en diferentes nodos de taxones como, *P. abyssinicum* o *P. fulvum*, y una tendencia muy débil a la agrupación de accesiones de *P. sativum* en base al tipo de material o su origen geográfico. Otros trabajos con mayor número de accesiones de guisante en las colecciones evaluadas incluyen un agrupamiento previo de las mismas, basándose principalmente en la taxonomía del género *Pisum*, para poder establecer distancias y relaciones entre los grupos. Este es el caso de Kosterin y Bogdanova (2008) con 89 accesiones, Nasiri *et al.* (2009) con 77 accesiones, Jing *et al.* (2010) con un total de 3020 accesiones o la ampliación de este último a 4538 accesiones analizada en Jing *et al.* (2012).

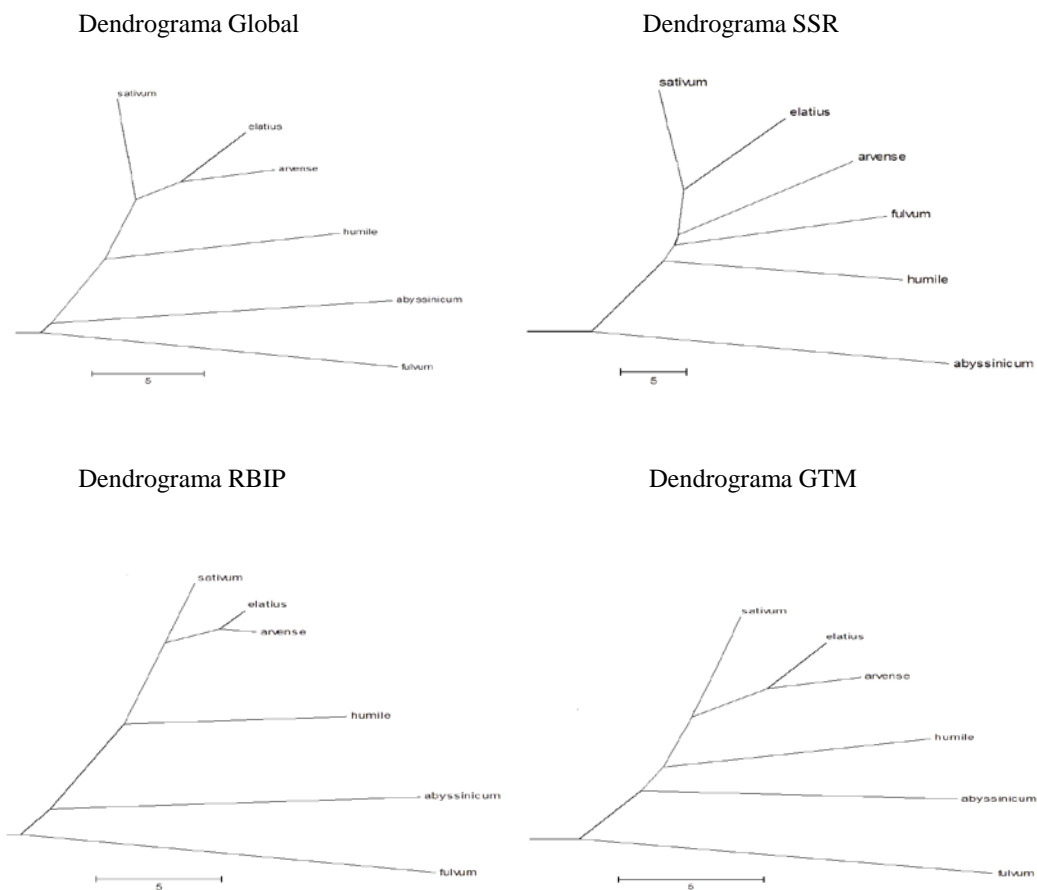


Figura IV.1. Dendrogramas de distancias génicas entre grupos para cada tipo de marcadores

En función de ello, y a la vista de los resultados obtenidos hasta el momento y la bibliografía revisada, se decidió establecer como criterio de jerarquización o clasificación previo a la profundización en la variabilidad la pertenencia de las diferentes accesiones a los diferentes taxones dentro del género *Pisum*.

Así, para intentar profundizar en la relación entre los distintos grupos taxonómicos, se han considerado de nuevo los ocho grupos de accesiones en función de los seis taxones hasta ahora utilizados, realizando un estudio de agrupación y en función de la metodología UPGMA, utilizando como distancia el índice de identidad de Nei (1972) y obteniendo cuatro dendrogramas (Figura IV.1), correspondientes a los datos globales, y a los obtenidos para cada tipo de marcador particular, RBIP, SSR y GTM respectivamente.

Los grupos más relacionados con el taxón *P. sativum* han sido *P. elatius* y *P. arvense*, si bien la relación entre ellos depende del tipo de marcador molecular. Así, se observa una unión previa de *P. elatius* con *P. arvense* antes de unirse a *P. sativum* en el dendrograma global y en los basados en la información de los RBIP y los GTM. Sin embargo, en el caso del dendrograma de SSR, se unen previamente *P. elatius* y *P. sativum*, formando un nodo conjunto al que se une posteriormente el taxón *P. arvense*.

Los dendrogramas global, RBIP y GTM fueron también similares al considerar las relaciones con los otros taxones, uniéndose al grupo anterior primero *P. humile*, después *P. abyssinicum* y por último *P. fulvum*. Estas uniones se presentan con distancia genética relativamente alta en comparación con la longitud del resto de ramas de los dendrogramas, implicando un distanciamiento genético elevado de estos taxones con respecto a *P. sativum*, *P. elatius* y *P. arvense*.

Sin embargo, el dendrograma obtenido mediante SSR se ha mostrado claramente diferente al resto, pues no tan sólo *P. elatius* ha aparecido más próximo a *P. sativum* y no a *P. arvense* como se ha indicado anteriormente, sino que *P. fulvum*, el taxón que en el resto de dendrogramas aparece como más alejado de la agrupación entre *P. sativum*, *arvense* y *elatius*, aparece en este caso como el taxón más próximo, siendo *P. abyssinicum* el que presentó el mayor distanciamiento con el resto de taxones.

En una interpretación clásica para árboles filogenéticos con raíz como los presentados, y observando el dendrograma total y los particulares para RBIP y GTM, se podría establecer que la primera divergencia a partir de un hipotético ancestro común se produjo estableciendo dos linajes diferentes: Uno de ellos sería el que definiese a la especie *P. fulvum* y el otro que derivaría posteriormente en el resto del género. Esto concordaría con las publicaciones que, como en el caso de

Ben Ze'ev y Zohary (1973) definen a *P. fulvum* como la especie más divergente dentro del género *Pisum*, y con aquellas que consideran realmente la única existencia de dos especies, *P. fulvum* y *P. sativum*, como integrantes del género, y que podrían constituir los dos primeros linajes escindidos.

Con posterioridad, del linaje de *P. sativum* se produciría una nueva escisión que derivaría en *P. abyssinicum*, que seguiría una evolución diferente al resto de los inicialmente englobados en el linaje de *P. sativum*. Esta disposición *P. abyssinicum*, es coherente tanto con las publicaciones que definen este taxón como especie dentro del género, como con las que lo consideran una subespecie dentro de *sativum*, pues

el grado de especiación no puede deducirse exclusivamente a partir de los árboles filogenéticos obtenidos, simplemente se aprecia una diferenciación clara entre *fulvum*, el taxón más divergente, *abysinicum* y *sativum*. Sin embargo, la distancia relativamente próxima entre la separación del linaje *abysinicum* con el primer evento que derivó en *fulvum*, considerado en casi todas las publicaciones consultadas como una especie indudablemente distinta, así como la longitud de las ramas del árbol, pueden hacer pensar que realmente *P. abysinicum* puede ser lo suficientemente divergente de *P. sativum* para ser considerado una especie distinta, como ya propusieron Ellis et al. (1998) y Pearce et al (2000) también a partir de aproximaciones moleculares. Este resultado estaría de esta forma en coherencia con la clasificación taxonómica aparentemente más consensuada descrita por Maxted y Ambrose (2000).

Considerando el escaso grado de diferenciación obtenido en el estudio de variabilidad previo para *P. abysinicum*, y la posible especiación a partir de la escisión del linaje originaria, se puede sustentar la hipótesis planteada por Vershinin *et al.* (2003) sobre el origen de este taxón, que procedería de un número reducido de ancestros o progenitores, probablemente casi exclusivamente de formas primitivas de *P. fulvum*, con un proceso evolutivo posterior relativamente homogéneo para esta especie que implicaría la baja variabilidad interna actual observada.

La separación de *P. abyssinicum* y *P. fulvum*, entre ellos y con respecto a otros taxones, es clara y aparece reflejada en la mayoría de los trabajos basados en el género *Pisum* (Knox y Ellis, 2001; Polans y Saar, 2000; Vershinin *et al.*, 2003; Kosterin y Bogdanova, 2008; Nasiri *et al.*, 2009, Jing *et al.*, 2010; 2012; Martin-Sanz *et al.*, 2011). Sin embargo, la clasificación a partir de ese punto dentro de la especie *sativum* no está clara, pues los distintos trabajos concluyen agrupaciones diferentes y dependientes de los taxones analizados.

En coherencia con esta falta de consenso, nuestros resultados no son del todo concordantes con, por ejemplo, la taxonomía propuesta por Maxted y Ambrose (2000). Así, dentro de la especie *P. sativum*, estos autores postulan dos posibles subespecies, *P.s. sativum* y *P.s. elatius*, La primera englobaría taxonómicamente a las variedades *sativum* y *arvense* y la segunda a las variedades *elatius*, *brevipedunculatum* (de la cual no se ha incluido representación en nuestro estudio) y *pumilio* (recogidas en nuestro estudio como *P. humile*). En nuestro caso, y de nuevo considerando el dendrograma total y los relativos a RBIP y GTM, se habría producido una escisión previa que derivaría en *P. humile*, y con posterioridad se produciría la separación del linaje restante en *sativum*, *elatius* y *arvense*, estando estos dos últimos más relacionados entre sí que con *sativum*. Esa escisión previa que derivaría en *P. humile* estaría en coherencia con los estudios que, como el de Ben Ze'ev y Zohary (1973), establecen el origen de los actuales guisantes cultivados en alguna forma primitiva de *P. humile*.

Al plantear una posible clasificación taxonómica comparable a la propuesta por Maxted y Ambrose (2000), se podría confirmar que los cuatro taxones conformarían efectivamente la especie *sativum*, si bien esta se dividiría en 2 o 3 subespecies, dependiendo de la interpretación que se hiciese. En primer lugar,

humile quedaría como subespecie única dentro del conglomerado *elatius* propuesto por Maxted y Ambrose. En segundo lugar, se podría considerar una segunda subespecie como *sativum*, incluyendo las variedades *sativum*, *elatius* y *arvense*, lo que diferiría al incluirse parte de la originaria propuesta para la subespecie *elatius* ahora en la subespecie *sativum*. Otra posible opción sería el considerar a *sativum* como subespecie propia y una tercera a *elatius*, conservando la nomenclatura de Maxted y Ambrose, en la cual ya no se incluiría *humile* como ya se ha indicado, e incluiría ahora tanto a la variedad *elatius* como a la *arvense*, originariamente incluida dentro de la subespecie *sativum*.

Con independencia de si a partir de los dendrogramas obtenidos pudieran establecerse dos o tres subespecies dentro de *sativum*, la clasificación en cinco posibles linajes presentada por el dendrograma global y los obtenidos a partir de RBIP y GTM (*P. abyssinicum*, *P. fulvum*, *P. humile*, *P. elatius* y *P. sativum*) es coherente con lo establecido en Knox y Ellis (2001) y Martín-Sanz *et al.* (2011), aunque la metodología de agrupación pueda diferir levemente entre los distintos estudios. Asimismo, en la mayoría de los dendrogramas asociados a trabajos precedentes, a excepción de Kosterin y Bogdanova (2008) y Jing *et al.* (2010), muestran una mayor similitud entre *P. sativum* y *P. elatius* que con el resto de taxones, lo cual también se observa en nuestro estudio, considerando que en esos trabajos no se incluyen accesiones específicas de *P. humile* ni de *P. arvense*. Tan sólo el estudio realizado por Nasiri *et al.* (2009) incluye dentro de su estudio al taxón *P. arvense*. Sin embargo, en este caso sitúa dicho taxón más próximo a *P. fulvum* y no a *P. elatius*, en oposición a lo que muestran nuestros resultados hasta aquí discutidos. Esta divergencia observada entre lo definido utilizando RBIP y GTM con el trabajo de Nasiri *et al.* (2009), puede abrir la discusión relativa a la también divergente información que se emana del dendrograma obtenido utilizando SSR. Es destacable que el dendrograma global y los obtenidos mediante RBIP y GTM muestren distribuciones de los taxones semejantes, mientras que, el dendrograma obtenido a partir de SSR ha resultado ser diferente.

Así, por ejemplo, a partir del dendrograma SSR se podría interpretar que el linaje que primero se habría producido sería el que derivase finalmente en el actual *P. abyssinicum*, corroborando de nuevo su posible entidad como especie única propuesta por ejemplo por Knox y Ellis (2001). O también *P. arvense*, que en este caso se ha situado más cercano a *P. fulvum*, esta vez ya en coherencia con lo descrito por Nasiri *et al.* (2009).

Otra consideración interesante a partir del dendrograma SSR es que, *P. fulvum*, el único taxón que prácticamente por unanimidad en toda la bibliografía consultada se considera como especie independiente dentro del género *Pisum*, no podría ser propuesta como tal sin antes considerar como posible especie a *P. humile*, pues la separación del linaje que finalmente derivaría en este último taxón se ha resuelto como previa a la de *P. fulvum* en este dendrograma. Esta divergencia observada en los resultados dependiente del tipo de marcadores considerados está en concordancia con lo obtenido en otros trabajos previos. A modo de ejemplo, Smýkal *et al.* (2008a), no detectaron correlación entre los valores de distancia genética

derivados de los datos de los marcadores SSR y RBIP, proponiendo que lo que ocurre realmente es que estos dos tipos de marcadores proporcionan información de diferentes fracciones de diversidad genética en el germoplasma muestreado

Este tipo de información aparentemente diferente en cuanto a la distribución de la variabilidad, así como sus consecuencias a la hora de las conclusiones que puedan establecerse al respecto en cuestiones de filogenia o taxonomía, debe ser indudablemente tenida en cuenta. Así, lo primero que se debe considerar es que los grados de diferenciación observados pueden deberse a las diferentes regiones del genoma que evalúa cada tipo de marcador: Tanto SSR como RBIP son, por lo general, marcadores moleculares cuya diana son secuencias del genoma no asociadas a genes, no transcritas, mientras que los GTM se basan en la amplificación de secuencias génicas, por tanto transcritas.

En este contexto, tanto SSR como RBIP podrían considerarse como marcadores asociados a *loci* con expresión de alelos neutros, es decir no seleccionables o no seleccionados durante el proceso evolutivo, salvo que estén ligados a genes que pudieran ser sometidos a selección, en cuyo caso pudiera existir algún grado de influencia en la concepción de su neutralidad. Por su parte, los GTM al estar asociados a secuencias transcritas si pudieran estar sometidos en el proceso evolutivo a mecanismos de selección, influyentes en la fijación de alelos específicos dependientes de las condiciones ambientales o en la distribución de sus frecuencias, por lo cual serían alelos no neutros. El hecho de que cada tipo de marcador pudiera estar influenciado por la naturaleza neutra o no neutra de los alelos que resuelve ya es un indicativo de los posibles diferenciales observados, producto de la fracción de variabilidad que cada uno puede explicar.

Por otra parte, la generación de variabilidad durante el proceso evolutivo y de especiación se basa en la sucesión de eventos mutacionales, por lo que para inferir la influencia de cada tipo de marcador en cuanto a la información que pueden aportar al respecto, se debe tener en cuenta la tasa de mutación que puede estimarse para cada caso. Así, a partir de la bibliografía consultada, los SSR amplifican regiones cuya tasa de mutación en guisante se ha estimado en $4,76 \times 10^{-3}$ por *locus* y generación (Cieslarová *et al.*, 2011). En el caso de la tasa de inserción de los retrotransposones en los que se basa la detección de polimorfismo en los RBIP se estima que es aproximadamente 5×10^{-7} por inserción y generación (Jing *et al.*, 2005). La tasa de mutación en nucleótidos pertenecientes a un exón, causante del tipo de polimorfismos detectable por los marcadores del tipo GTM, se ha estimado en 7×10^{-9} por sustitución por sitio y generación (Jing *et al.*, 2005).

De esta forma, los *loci* detectados en función de cada tipo de marcador presentarán distintos grados de conservación, estando a priori más conservados los *loci* asociados a tasas mutacionales bajas, a priori las relativas a GTM en nuestro caso, y apareciendo como más variables aquellos asociados a tasas más altas, en nuestro caso los SSR. Esta tendencia parece haberse visto confirmada en nuestro estudio tal y como se expuso en el capítulo correspondiente.

Si bien para el establecimiento de relaciones filogenéticas pudiera considerarse que es deseable el contar con la mayor cantidad posible de elementos variables y la mayor variabilidad posible en cada elemento, existen ciertas limitaciones prácticas a ser consideradas. Así, un excesivo nivel de variabilidad en cada uno de varios elementos, en este caso marcadores particulares, para los cuales no pueda establecerse la sucesión genealógica de eventos mutacionales (qué alelos se generaron antes y de cual procede cada uno), conllevará a una buena clasificación o agrupación en cuanto a las diferencias observadas, pero esa clasificación no tiene por qué estar forzosamente asociada, en cuanto a relación entre grupos definidos, con una genealogía provocada por la evolución. De esta forma, los SSR podrían presentar este problema con mayor probabilidad que los RBIP o los GTM.

Por otra parte, aquellos marcadores que identifican regiones genómicas sujetas a tasas mutacionales elevadas, como pudieran ser los marcadores de tipo SSR, tienen una mayor probabilidad de interpretaciones erróneas motivadas por fenómenos de homoplasia (Smýkal *et al.*, 2011; Ellis, 2011), no existiendo la garantía de que la mera detección de productos de amplificación con el mismo tamaño implique realmente secuencias idénticas, con lo que la asunción habitual en SSR de corresponder tamaños iguales con alelos iguales implica posibles errores en la interpretación de la diversidad genética así como en la elaboración de árboles filogenéticos.

A la vista de todos estos factores, naturaleza de la diana de cada tipo de marcador, grado de neutralidad alélica sujeta a posible influencia de mecanismos de selección, tasa y sucesión de eventos mutacionales, grado de conservación de las secuencias o probabilidad de ocurrencia de fenómenos de homoplasia, es evidente que cada tipo de marcador puede aportar información diferente en trabajos relativos a reconstrucción de filogenias, estudios de variabilidad o jerarquización de colecciones.

En el caso que nos ocupa, y en concordancia con lo recomendado para el caso del género *Pisum* por otros autores (Jing *et al.*, 2005; Smýkal *et al.*, 2008a; 2008b), se puede concluir que la combinación de dos o más tipos de marcadores, siempre es más informativa que de forma individualizada, si bien aquellos con tasas mutacionales menos frecuentes son más válidos para determinar relaciones entre linajes ancestrales en estudios de filogenia, como es el caso de los RBIP. Este tipo de marcadores permitiría asimismo establecer clasificaciones sin influencia teórica de una hipotética presión selectiva ambiental entre linajes o estirpes durante el proceso evolutivo, debido a su carácter neutro. Por último, aportarían una ventaja subyacente frente a marcadores tipo GTM o SSR por ejemplo, y es la posibilidad de establecer el orden de sucesión de eventos mutacionales y su reconstrucción, pues en este caso siempre el alelo mutante es el detectable con presencia del inserto con motivo retrotransposon, siendo el alelo silvestre, u original, en el que se detecta su ausencia.

Los GTM, por su parte, permitirían el establecimiento de estirpes o linajes ancestrales debido a su bajo índice mutacional, incluso menor que el estimado para RBIP en función de la bibliografía consultada. También pueden incluir una información de interés por su posible carácter no neutro, influible por tanto

por la selección, mecanismo final conducente hacia la especiación, si bien esa naturaleza teórica de no neutralidad no siempre se cumple debido a que la presión de selección que pueda afectar a las frecuencias alélicas no influye en todos los genes.

Por último, y asumiendo la probabilidad de errores motivados por homoplasia, los marcadores de naturaleza neutra con tasas mutacionales altas facilitarían no tanto las reconstrucciones filogénicas o las relaciones entre distintos rangos taxonómicos, como la resolución en la discriminación entre accesiones muy relacionadas.

Por tanto, se considera que la agrupación de los taxones queda mejor reflejada en función de los dendrogramas obtenidos mediante los RBIP y los GTM, siendo coherente y muy similar el resultado producido por ambos métodos.

En función de la tasa de mutación relativamente elevada de los SSR, se puede asumir que parte de los eventos de creación de nuevos alelos sucedieron previo a los procesos evolutivos de separación entre estirpes o linajes, y que parte de ellos pudieron suceder con posterioridad. En el primer caso, la clara separación de *P. abyssinicum* implica un muy bajo grado de alelos SSR compartidos con el resto de taxones, lo que podría ser indicativo de que su divergencia fue previa a la sucesión de la mayor parte de eventos mutacionales, no confirmado por los dendrogramas GTM y RBIP, o a que la base genética incluida en sus primeras líneas ancestrales fuese muy estrecha, siendo pocos los contribuyentes originales, y con un proceso evolutivo posterior para esta especie con un alto grado de independencia de las demás, hipótesis en apariencia más plausible y en coherencia con lo sugerido por otros autores (Vershinin *et al.*, 2003).

Por otra parte, la proximidad relativa entre los demás taxones, incluyendo al propio *fulvum* intercalado con taxones considerados en las clasificaciones clásicas dentro del complejo *sativum*, y con relaciones entre ellos relativamente diferentes a las aportadas por los RBIP o los SSR, podría ser un indicativo de que, caso de haberse producido parte de los fenómenos mutacionales de forma previa a la divergencia entre linajes, el fondo genético originario común habría sido relativamente amplio, con un número alto de líneas ancestrales comunes, y se habría conservado parcialmente esa variabilidad dentro de las distintas estirpes, lo cual iría en concordancia con la dificultad histórica en la toma de decisiones relativa a la consensuación de la taxonomía interna del género *Pisum*. Sin embargo, la hipótesis más plausible, no excluyente de la primera, y concordante con lo sugerido por Jing *et al.* 2007, es que el proceso evolutivo del género *Pisum*, posterior a la especiación, salvo para el caso de *P. abyssinicum* que habría tenido un cierto grado de independencia o aislamiento del resto de taxones, no habría sido aislado para cada taxón, sino que hubiera habido cierto grado de interacción y flujo genético entre ellas, implicando cruzamientos y recombinaciones genéticas entre taxones. Este tipo de fenómenos también se han detectado en otras especies con alogamia altamente restringida, como por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* (Nordborg *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007).

Como comentario final, y vinculado a las metodologías de trabajo, lo aquí observado está en concordancia con lo concluido por Jing *et al.* (2007), en cuanto a que la estructura del género *Pisum* considerando su diversidad genética puede quedar representada de forma inadecuada por la simple elaboración de árbol filogenéticos sin considerar la naturaleza intrínseca de cada tipo de información de partida. Así, por ejemplo, estos autores establecieron que el concepto de una distancia genética simple entre dos líneas de guisante puede ser una aproximación pobre de la realidad dependiendo del objetivo buscado: estructuración filogenética, discriminación entre accesiones próximas, etc.

1.4. Estudio de la estructura. Aplicación de un método basado en modelos paramétricos

Ante la dificultad de profundizar en la estructura genética presente en la colección en estudio siguiendo las metodologías hasta ahora utilizadas, se presentan a continuación los resultados obtenidos por la aplicación del método bayesiano de agrupamiento mediante el algoritmo del programa STRUCTURE, basado en modelos paramétricos que asumen la existencia de grupos que pueden diferenciarse por los patrones de frecuencias alélicas para cada *locus*. Por tanto, esta metodología permite identificar poblaciones de genotipos, basados en su similitud genética. Este procedimiento ha sido previamente utilizado por ejemplo en estudios de agrupación de líneas híbridas en maíz (Remington *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2004), arroz (Garris *et al.*, 2003), trigo (Chao *et al.*, 2007) o cebada (Pandey *et al.*, 2006; Morrell y Clegg, 2007; Yahiaoui *et al.*, 2008), entre otros cultivos, habiéndose utilizado también en varios estudios de diversidad genética en el género *Pisum* (Smýkal *et al.*, 2008 y Jing *et al.*, 2010; 2012).

Aplicación del método de modelos paramétricos a partir del global de los marcadores moleculares

La Figura IV.2 muestra los resultados obtenidos, considerando el parámetro ΔK , para el número probable de grupos (K) que forma la estructura básica de la colección de trabajo, en función de la información proporcionada por el global de los marcadores moleculares empleados en este estudio. La gráfica resultante mostró un pico claramente definido, correspondiente a $K=7$, indicando que la colección puede estructurarse en siete grupos.

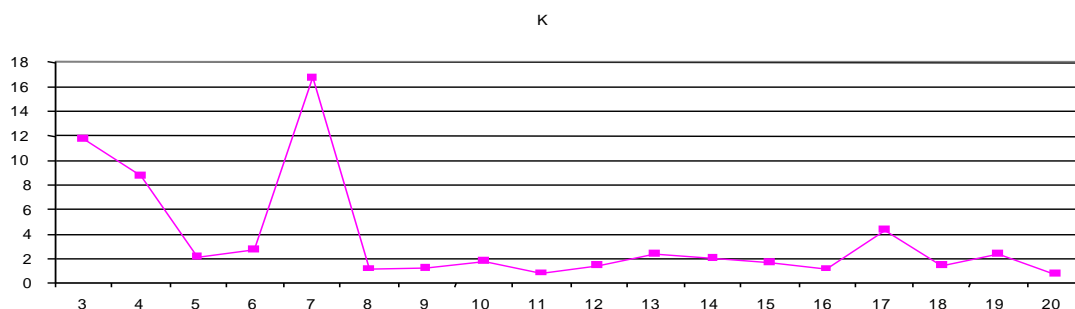


Figura IV.2. Análisis ad hoc de ΔK para el global de los marcadores

Tabla IV.7. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos considerando K=7

K	F _{ST} 1	F _{ST} 2	F _{ST} 3	F _{ST} 4	F _{ST} 5	F _{ST} 6	F _{ST} 7
7	0,28	0,61	0,26	0,42	0,29	0,38	0,61

La Figura IV.3 muestra la distribución de las accesiones en relación a esos posibles grupos. El grado de información genética compartida entre las diferentes poblaciones de cada grupo viene determinado por F_{ST}, tal como muestra la Tabla IV.7.

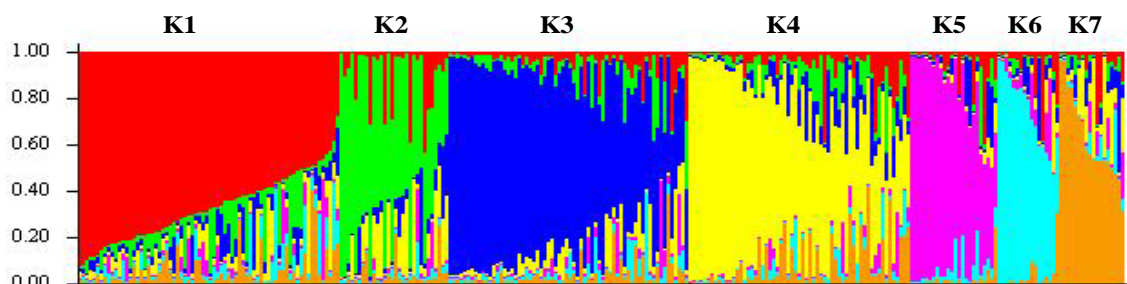


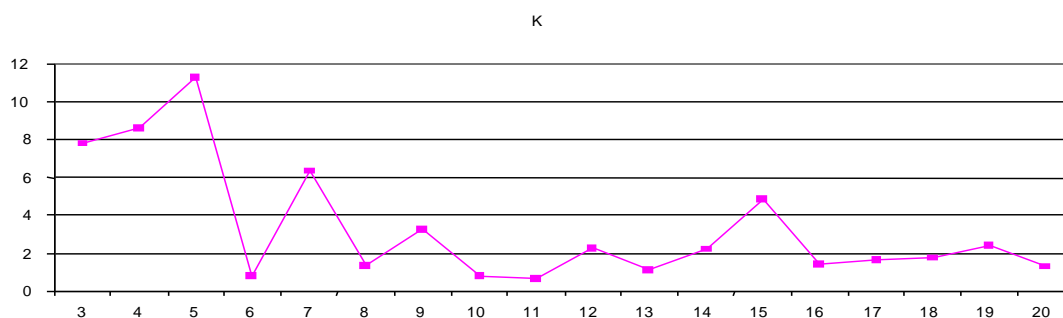
Figura IV.3. Gráfico de la estructura en 7 grupos para el global de los marcadores

En base al mayor valor de F_{ST}, 0,61, el grupo K7 presentó el mayor grado de diferenciación. Este grupo está compuesto principalmente por accesiones de flor morada. Con un grado de diferenciación semejante, K2 agrupó accesiones correspondientes a variedades locales y cultivares de origen predominantemente europeo. Si seguimos el criterio del grado de diferenciación entre grupos, K4 con 0,42, agrupó a variedades comerciales y cultivares que comparten características de flor blanca y siembra predominantemente primaveral. Con similar diferenciación K6, 0,38, era un grupo de accesiones de origen asiático entre las que se encontraban accesiones que en los datos de pasaporte originales estaban clasificadas como *P. elatius* y *P. asiaticum*.

Los grupos con mayor similitud genética resultaron: K3 (0,26) que agrupó mayoritariamente cultivares; K1 (0,28) que contenía a las variedades locales y ecotipos españoles, así como líneas silvestres de origen asiático; por último, K5 (0,29) agrupaba al 50% de accesiones de *P. elatius*, todos los *P. abyssinicum*, y 2 de las 3 accesiones clasificadas como *P. fulvum*.

Método basado en modelos paramétricos para el global de los marcadores definiendo el origen de las muestras

Al incluir los datos de pasaporte en el análisis (POPINFO), la estructura de la colección total cambió, el número de grupos detectado fue K=5, si bien también apareció un pico en K=7.

Figura IV.4. Análisis *ad hoc* de ΔK para el global de los marcadores con información (POPINFO)Tabla IV.8. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando $K=5$ y $K=7$

K	F_{ST} 1	F_{ST} 2	F_{ST} 3	F_{ST} 4	F_{ST} 5	F_{ST} 6	F_{ST} 7
5	0,31	0,32	0,31	0,41	0,42	-	-
7	0,36	0,75	0,47	0,39	0,33	0,81	0,31

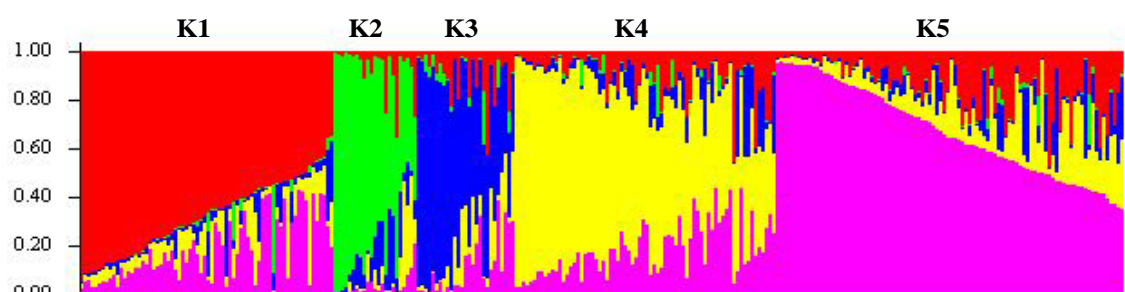


Figura IV.5. Gráfico de la estructura en 5 grupos para el global de los marcadores con información previa

Al analizar la estructura con cinco grupos (Figura IV.5) se encontró una clara distribución en la cual el grado de diferenciación se igualaba en torno a valores de 0,31 a 0,41 para todos los grupos. Los grupos con un leve grado de diferenciación mayor correspondieron a K5, que englobaba a variedades comerciales, y K4, que agrupaba a las variedades locales españolas y ecotipos. Con un grado de diferenciación ligeramente menor apareció K1, que concentraba a todos los cultivares. K2 correspondió a un grupo que incluye accesiones de otros taxones: *P. abyssinicum*, *P. fulvum* y parte de *P. elatius*. Por último, K3 agrupó al resto de *P. elatius* junto con accesiones silvestres y otras clasificadas como *P. asiaticum*.

La estructura en siete grupos (Figura IV.6) permitió separar grupos considerando el color de la flor y su origen geográfico. Así, el grupo K6, con un número de accesiones muy limitado y un grado de diferenciación muy elevado ($F_{ST}=0,81$), englobó accesiones clasificadas como *P. sativum* de flor morada con origen europeo y africano junto con accesiones pertenecientes a los taxones *P. jomardii* y *P. elatius*. El siguiente grupo, K2 (0,75), reúne accesiones diversas pero todas con flor morada.

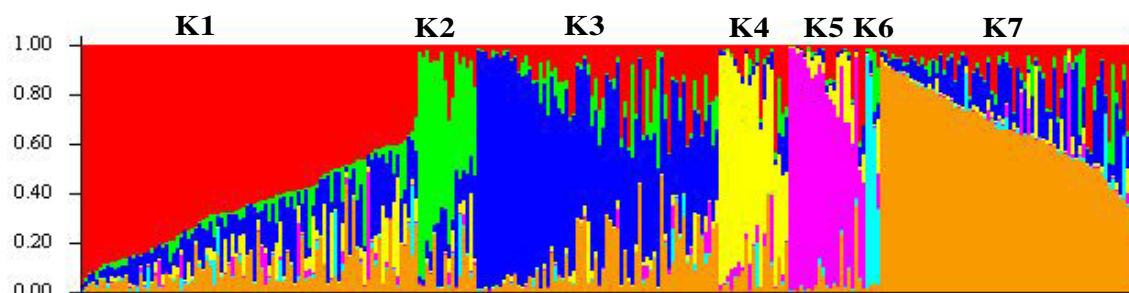


Figura IV.6. Gráfico de la estructura en 7 grupos para el global de los marcadores con información previa

El resto de grupos mostraron valores F_{ST} mucho más bajos. Con un grado de diferenciación menor (0,47), K3, agrupó a las variedades comerciales. El primer grupo, K1, con menor grado de diferenciación, agrupa a las variedades locales y silvestres. El último grupo, K7, representó a los cultivares. Por último, se situaron los dos grupos que englobaban las diferentes especies y subespecies, K4 y K5, volviendo a quedar separados los taxones *P. abyssinicum*, *P. fulvum*, *P. asiaticum* y parte de las accesiones clasificadas como *P. elatius*.

En los análisis realizados considerando la globalidad de la información de los marcadores utilizados, en todos los casos los grupos representados por los taxones no incluidos como *P. sativum* se mostraron como los grupos con menor variabilidad genética, si bien los taxones *P. abyssinicum* y *P. fulvum* se incluyeron dentro del mismo grupo, junto con parte de las accesiones pertenecientes al taxón *P. elatius*. El resto de accesiones de *P. elatius* se agruparon en otro grupo, también con elevada similitud, junto con accesiones de origen asiático y otras clasificadas como *P. asiaticum* o *P. jomardii*.

La principal diferencia cuando se incluyó información relativa a datos de pasaporte fue la separación interna del taxón *P. sativum*. Esta información adicional ha permitido separar, con mayor diferenciación génica, las variedades comerciales de las variedades locales y ecotipos. A su vez, el material cultivado, mostró una clara tendencia a separarse en grupos según el color de la flor.

Este análisis global ha permitido establecer como criterios de jerarquía genética dentro del taxón *P. sativum* al tipo de material y una asociación con un carácter morfológico, el color de la flor. No se ha encontrado un patrón de jerarquía claro en base al origen geográfico, en concordancia con nuestros propios resultados a partir del análisis AMOVA y lo descrito por otros autores (Martín-Sanz *et al.*, 2011; Lázaro y Aguinagalde, 2006).

Aplicación del método de modelos paramétricos a partir de los marcadores moleculares tipo RBIP

Al analizar la estructura de la colección global en relación a los RBIP, el análisis del número de grupos presentó una estructura en 9 grupos tal y como se muestra en la Figura IV.7.

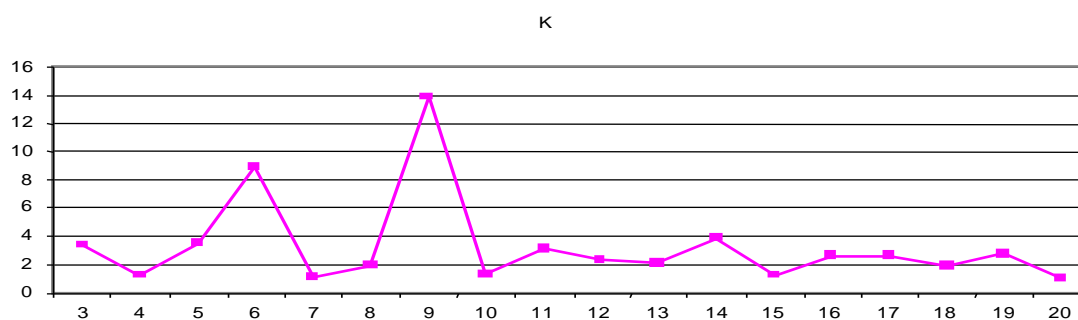


Figura IV.7. Análisis *ad hoc* de ΔK para los marcadores RBIP

La Tabla IV.9 muestra los valores F_{ST} obtenidos para cada uno de los grupos para el caso de nueve grupos.

Tabla IV.9. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando $K=9$

K	$F_{ST} 1$	$F_{ST} 2$	$F_{ST} 3$	$F_{ST} 4$	$F_{ST} 5$	$F_{ST} 6$	$F_{ST} 7$	$F_{ST} 8$	$F_{ST} 9$
9	0,58	0,71	0,77	0,89	0,31	0,67	0,70	0,54	0,30

La Figura IV.8 muestra la distribución de la colección en una estructura de nueve grupos. Los grupos que presentaron un mayor grado de diferenciación fueron K2, K3 y K4. El último, K4, con un grado de diferenciación muy elevado, 0,89, engloba, entre otras, a accesiones de flor morada y silvestres, aunque no se apreció un denominador común en entre ellas.

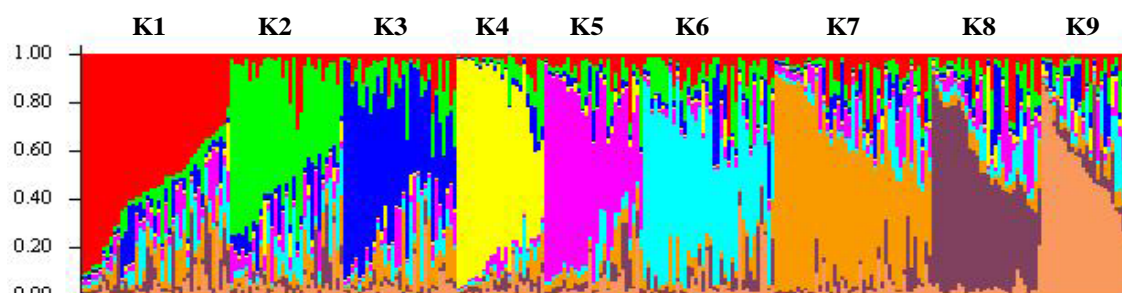


Figura IV.8. Gráfico de la estructura en 9 grupos para los marcadores RBIP

Tanto K2 como K3 han incluido cultivares cuya mayor diferencia resultó ser el origen geográfico. Así, K2 presenta mayoritariamente accesiones europeas y asiáticas de flor blanca, mientras que K3 representa cultivares americanos o africanos fundamentalmente. Sin embargo, K7, con un grado de diferenciación de 0,70, también agrupaba cultivares de diferente origen geográfico.

Los grupos con mayor grado de similitud genética con otros grupos, K5 y K9, corresponden a grupos que engloban diferentes especies y subespecies, separando a aquellas accesiones de origen asiático del resto procedentes de otras regiones geográficas.

Método basado en modelos paramétricos para RBIP definiendo el origen de las muestras

El análisis para determinar el número de grupos en el que queda estructurada la colección a estudio indicó que K=6 parecía ser la estructura más estable.

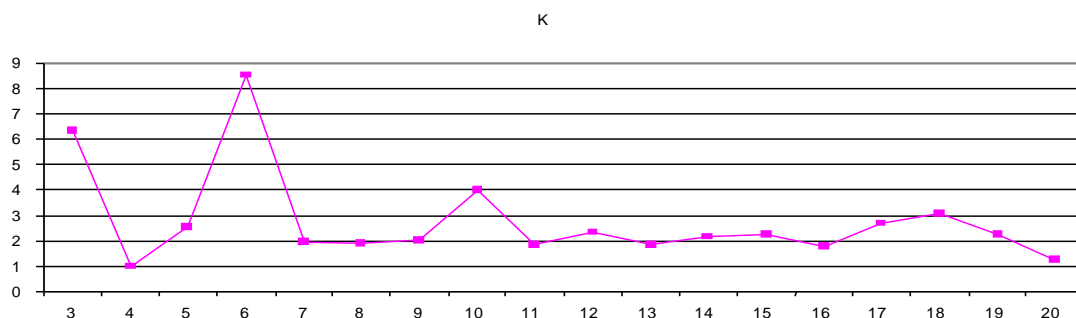


Figura IV.9. Análisis *ad hoc* de ΔK para los marcadores RBIP con información previa

La Tabla IV.10 detalla los valores de diferenciación genética mostrados en cada una de los seis grupos detectados.

Tabla IV.10. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=6

K	F _{ST} 1	F _{ST} 2	F _{ST} 3	F _{ST} 4	F _{ST} 5	F _{ST} 6
6	0,66	0,49	0,23	0,71	0,68	0,64

Tal y como muestra la Figura IV.11 la estructura de la colección dividida en seis grupos. K1 correspondió con el grupo con mayor número de accesiones, seguido por K4 y K5, mientras que K2, K3 y K6 reunieron una menor cantidad de accesiones dentro de ellos.

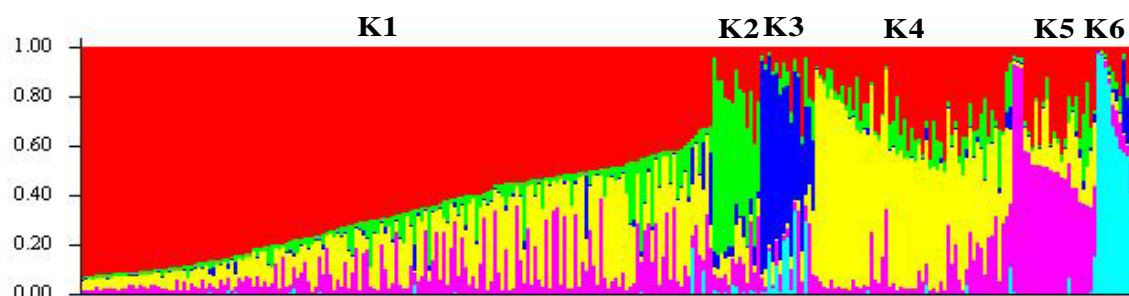


Figura IV.10. Gráfico de la estructura en 6 grupos para los marcadores RBIP con información previa

Esta estructura separa en grupos en función de especies y subespecies. Así, K3 con el menor grado de diferenciación genética (0,23) agrupaba a *P. fulvum* junto con el 50% de las accesiones *P. elatius*. K2, con un valor F_{ST} de 0,49, en el que se situaban el taxón *P. asiaticum* con algunos *P. elatius* y otras accesiones de origen asiático. Por su parte, K6, reúne a todos los *P. abyssinicum* con una pequeña representación de *P. elatius*. Sin embargo, el resto de grupos, con un grado mayor de diferenciación, no mostraron un claro patrón de diferenciación, aunque se mostraba una tendencia de las variedades locales a agruparse en K5 y a las comerciales en K1.

Los resultados obtenidos en el análisis inicial empleando sólo RBIP mostraron nuevamente como grupos con menor grado de diferenciación a los grupos formados por los taxones no *P. sativum*, al igual que ocurría en el análisis global. No obstante, a diferencia del análisis con el total de los marcadores, los RBIP permitieron establecer como poblaciones diferenciadas a las accesiones pertenecientes a *P. sativum* en función del tipo de material, y en segundo lugar, con tendencia a agruparse en función de su origen geográfico y sus caracteres morfológicos.

Al introducir en el análisis los datos de pasaporte la estructura de la colección global se vio modificada. De este modo, se obtuvo la separación en grupos independientes de los taxones *P. fulvum* y *P. abyssinicum*, mientras que las accesiones dentro de *P. elatius* se repartieron entre ambos grupos y en un tercero representado por el taxón *P. asiaticum* junto con otras accesiones de origen asiático.

La distribución diseminada de las accesiones de *P. elatius* a lo largo de diferentes poblaciones concuerda con los resultados obtenidos por Vershinin *et al.* (2003), en los que este taxón se mostró ampliamente distribuido, que concluyen que parte de las líneas pertenecientes a este taxón provendrían realmente del cruzamiento entre accesiones de *P. sativum* y *P. humile*, también en concordancia con los dendrogramas obtenidos en nuestro estudio que sitúan a *P. elatius* en una posición intermedia entre dichos taxones, *P. sativum* y *P. humile*.

La situación de *P. abyssinicum* como grupo aislado del resto implica que, bajo este tipo de análisis basado en modelos paramétricos a partir de marcadores RBIP, las diferencias génicas mostradas por este taxón son suficientes para separarlo del resto. A esta misma conclusión se ha llegado a partir de caracteres morfológicos (Govorov, 1937) o a partir de de marcadores basados en transposones y retrotransposones (Vershinin *et al.*, 2003).

Por tanto, estos marcadores basados en transposones permiten la separación de los diferentes taxones en grupos individuales a nivel de las dos especies separadas del taxón *P. sativum* tal y como sugieren Ellis *et al.* (1998) y la clasificación descrita por Maxted y Ambrose (2000): *P. fulvum* y *P. abyssinicum*.

En relación al grado de diferenciación obtenido para cada una de los grupos, *P. fulvum* representa el grupo con menor grado de diferenciación dentro de la colección, mientras que en este caso *P. abyssinicum* muestra un valor de diferenciación mucho más elevado, resultando similar al descrito en los grupos que engloban al taxón *P. sativum*. El siguiente grupo con menor valor de diferenciación mostrado, se correspondió con la población que agrupaba a parte de las accesiones *P. elatius* junto con otras de origen asiático y/o clasificadas como *P. asiaticum*. Los elevados grados de similitud genética mostrados por ambos grupos están en concordancia con la hipótesis planteada por diversos autores (Govorov, 1937; Blixt, 1972; Ben ze'ev y Zohary, 1973; Zohary, 1996), en la que se relaciona a *P. fulvum* y *P. abyssinicum* con linajes ancestrales del género.

A nivel interno del taxón *P. sativum*, este tipo de análisis mediante marcadores RBIP ha permitido esbozar una clasificación basada en el tipo de material o, incluso, en función de su origen geográfico, sin embargo, dicha tendencia se ha seguido mostrando difusa incluso tras incluir la información taxonómica en el análisis.

Aplicación del método de modelos paramétricos a partir de los marcadores moleculares tipo SSR

Los resultados obtenidos en el estudio a partir de los marcadores SSR determinaron que la estructura de la colección total se define en cinco grupos, tal y como se muestra en la Figura IV.11.

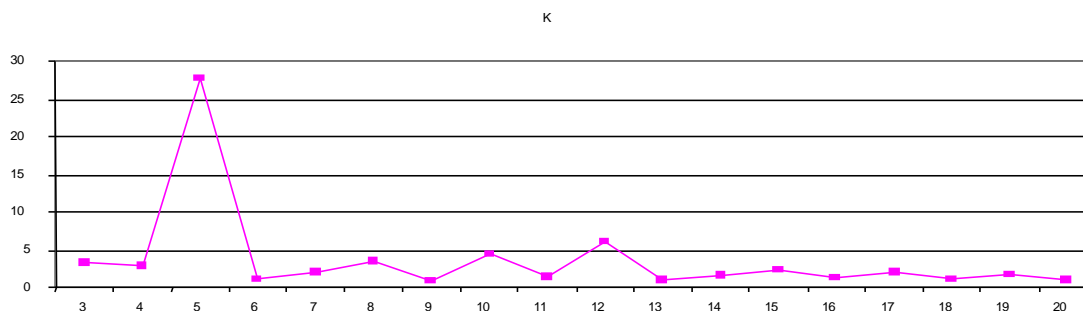


Figura IV.11. Análisis *ad hoc* de ΔK para los marcadores SSR

La distribución en estos 5 grupos presentó un número similar de accesiones en cada uno de ellos (Figura IV.12), a diferencia del análisis mediante RBIP. Sin embargo, los valores de diferenciación genética detectados a través de los SSR son más elevados que en caso de RBIP, tal y como se muestra en la Tabla IV.11.

Tabla IV.11. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando $K=5$

K	$F_{ST} 1$	$F_{ST} 2$	$F_{ST} 3$	$F_{ST} 4$	$F_{ST} 5$
5	0,39	0,50	0,13	0,37	0,54

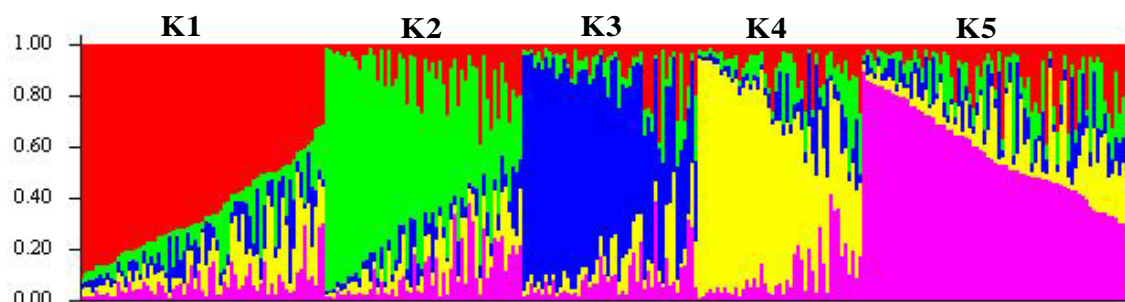


Figura IV.12. Gráfico de la estructura en 5 grupos para los marcadores SSR

Entre los 5 grupos destacó K3, por su baja diferenciación genética (0,13) en comparación con los demás. Este grupo reunía a la mayoría de especies, subespecies y también un pequeño grupo de variedades locales, así como algunos de los ecotipos, accesiones silvestres y otros cultivares de origen

predominantemente asiático, los cuales ya aparecían relacionados a las accesiones del taxón *P. asiaticum*.

El grupo K2 englobaba en su mayor parte a las variedades comerciales, K1 a los cultivares y, por último, K4 y K5 incluían a variedades locales y algunos cultivares, diferenciándose potencialmente en el color de la flor. K4 agrupó líneas de flor morada mientras que K5 eran, en su mayoría, guisantes de flor blanca.

Método basado en modelos paramétricos para SSR definiendo el origen de las muestras

La Figura IV.13 muestra un pico definido en K=3 y otros picos secundarios con un mayor número de grupos, 8 y 12. La división en tres grupos resultaba poco informativa, mientras que la consideración de un número alto de grupos repercute en un exceso de complejidad al intentar buscar un patrón de diferenciación entre los grupos establecidos. Por tanto, se ha considerado una estructura en ocho grupos, pues al comparar los valores F_{ST} (Tabla IV.12) y revisar la asignación de accesiones dentro de cada grupo, se comprobó que la subdivisión en ocho grupos mostraba el patrón de distribución que aportaba mayor información de forma comprensible y racional.

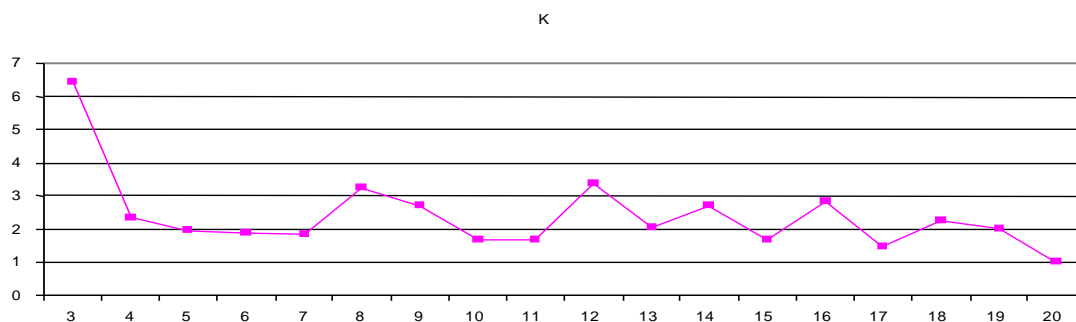


Figura IV.13. Análisis *ad hoc* de ΔK para los marcadores SSR con información previa

Tabla IV.12. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando K=8

K	$F_{ST} 1$	$F_{ST} 2$	$F_{ST} 3$	$F_{ST} 4$	$F_{ST} 5$	$F_{ST} 6$	$F_{ST} 7$	$F_{ST} 8$
8	0,70	0,22	0,45	0,42	0,57	0,64	0,88	0,53

Al analizar cómo se estructuraba la colección al dividirse en ocho grupos (Figura IV.14) se comprobó la separación en taxones, de forma que el grupo con mayor nivel de similitud genética, K2 (0,22), agrupaba a la mayoría de *P. elatius* y *P. arvense*. Por su parte, las accesiones de *P. abyssinicum* se incluyeron en K6, junto a accesiones de origen asiático, aunque algunas de estas últimas se agruparon en K8. El grupo K1 estaba constituido por variedades locales, K5 por las variedades comerciales y los cultivares en K3. En K7 las accesiones no presentaron alguna característica común apreciable. El grupo K4, con mayor número de accesiones, mostró un patrón según el cual a medida que se incorporó información característica de otros grupos se incorporaban accesiones de nuevos orígenes geográficos,

empezando por las accesiones con un claro origen europeo, luego asiáticas para incorporar, finalmente, las accesiones de origen americano, las cuales poseían un menor grado de pertenencia al grupo.

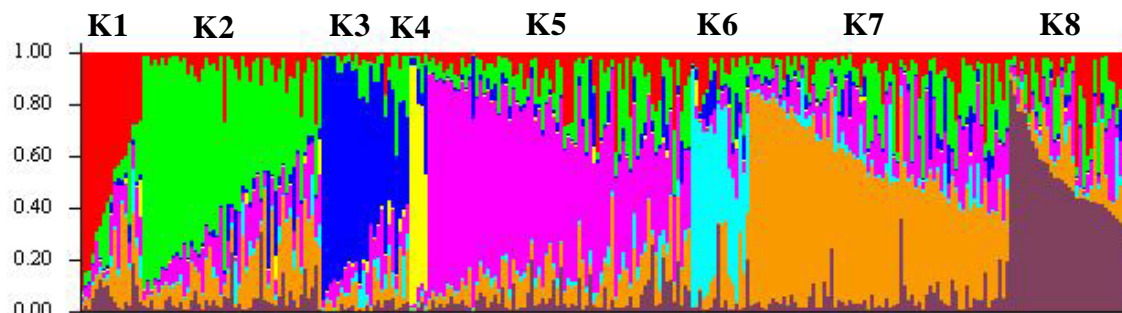


Figura IV.14. Gráfico de la estructura en 8 grupos para los marcadores SSR con información previa

El análisis realizado a partir los SSR presentó a los taxones no *P. sativum* con escasa diferenciación genética. Sin embargo, este tipo de marcadores necesitó la inclusión de los datos de pasaporte para establecer diferencias a nivel de grupo entre los diferentes taxones. Al añadir esta información adicional separó, al igual que con RBIP, al taxón *P. abyssinicum* como grupo independiente, mientras que agrupaba conjuntamente a los taxones *P. fulvum*, *P. arvense* y *P. elatius* dentro de un mismo grupo y obtenía un tercero compuesto por accesiones de origen asiático e incluyendo al taxón *P. asiaticum*. La obtención de este tercer grupo caracterizado por su origen asiático podría corresponderse con el sub-grupo obtenido por Jing *et al.* (2010; 2012) caracterizado por la presencia de tipos descritos como cultivar “Afghanistan”, ya que coincide el origen geográfico. Así como, la separación en un grupo aislado de accesiones originarias de Afganistán descrito en Baranger *et al.* (2004). Sin embargo, estas correspondencias han quedado pendientes de confirmación. La agrupación conjunta de los taxones *P. fulvum*, *P. arvense* y *P. elatius* ha sido mostrada en un trabajo previo basado también en marcadores SSR enfocado al estudio de la diversidad genética en las especies silvestres de género *Pisum* (Nasiri *et al.*, 2009).

Este tipo de marcadores ha destacado por su mayor capacidad de resolución en la estructura de la muestra a nivel interno del taxón *P. sativum*. Los SSR han permitido separar las accesiones dentro del taxón *P. sativum* atendiendo a diferentes criterios, como por ejemplo el tipo de material. Aunque en este sentido, las agrupaciones con respecto al tipo, y en concreto de cultivares, no resultaron totalmente definidas. Al incluir información sobre el pasaporte de cada línea en el análisis, los criterios de separación entre líneas se vieron ampliados incluyendo características morfológicas, como el color de la flor, al igual que la estructura resultante mostró una tendencia en función de la distribución geográfica.

La estructuración genética intraespecífica en función del tipo de material ha sido encontrada en especies cultivadas como cebada (Liu *et al.*, 2001) o judía (Métais *et al.*, 2012). Asimismo, en guisante este tipo de criterios han permitido la clasificación interna a la especie *P. sativum* en función de su diversidad genética (Saamec y Našinec, 1995; Samec *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998; Simioniuc *et al.*, 2002; Baranger *et al.*, 2004; Tar'an *et al.*, 2005).

El nivel de resolución intra-especie mostrado por los marcadores SSR en *P. sativum* ha permitido la discriminación de variedades en estudios previos (Smýkal *et al.*, 2008a), frente a una menor capacidad de discriminación a este nivel mostrada por los RBIP.

Aplicación del método de modelos paramétricos a partir de los marcadores moleculares tipo GTM

En este caso, la Figura IV.15 muestra, dos picos que aparecieron bien definidos, correspondientes a $K=3$ y $K=10$, siendo la altura de ambos picos semejante y por tanto ambas estructuras estarían igualmente justificadas. No obstante, la organización en 10 grupos resultó más informativa tras el análisis de su estructura.

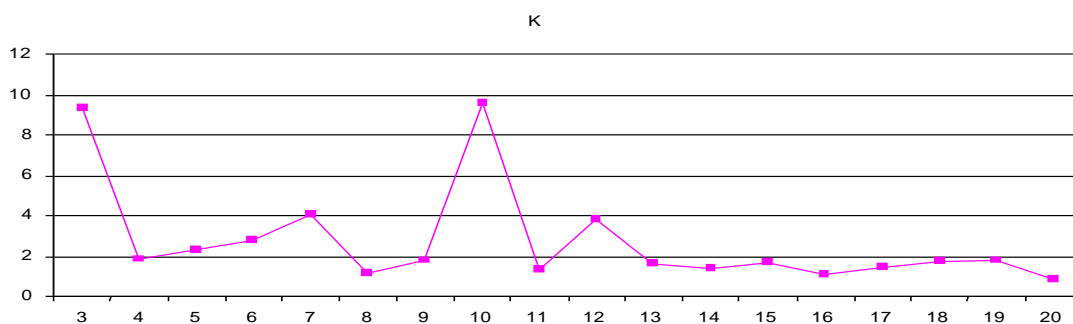


Figura IV.15. Análisis *ad hoc* de ΔK para los marcadores GTM

En la Tabla IV.13 se pueden comparar los diferentes valores de diferenciación obtenidos para cada uno de los tipos de estructura de la muestra.

Tabla IV.13. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando $K=10$

K	$F_{ST} 1$	$F_{ST} 2$	$F_{ST} 3$	$F_{ST} 4$	$F_{ST} 5$	$F_{ST} 6$	$F_{ST} 7$	$F_{ST} 8$	$F_{ST} 9$	$F_{ST} 10$
10	0,57	0,72	0,60	0,42	0,55	0,38	0,62	0,34	0,59	0,34

Los marcadores GTM tendieron a agrupar a todas las especies y subespecies relacionadas en un grupo ($K5$), pero volvió a aparecer la separación con las accesiones del taxón *P. asiaticum*, algunos *P. elatius*, accesiones silvestres y de origen asiático, como se ha visto para los RBIP y en el caso del análisis global. En este caso también se incluyeron algunas de las variedades locales en el mismo grupo ($K9$). El resto de las variedades locales se distribuyeron en varios grupos $K3$, $K6$ y $K7$. Las variedades comerciales se agruparon en $K1$. En $K2$ se situaron cultivares y variedades comerciales de flor morada. En $K4$, $K8$ y $K10$ se agruparon los cultivares, predominando en $K4$ los de origen asiático, en $K8$ los de origen europeo y americano. Por su parte, $K10$ representaba un agrupamiento de cultivares de diferente origen geográfico.

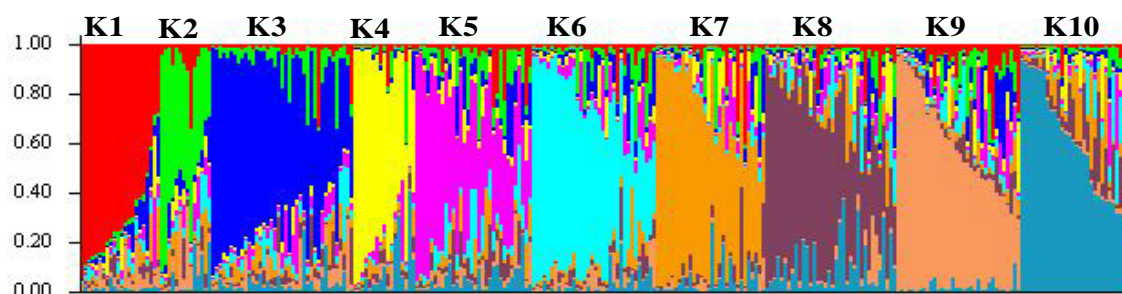


Figura IV.16. Gráfico de la estructura en 10 grupos para los marcadores GTM

Método basado en modelos paramétricos para GTM definiendo el origen de las muestras

El número de grupos que surgió al dar información sobre el origen de las accesiones parecía ser de cinco, si bien el pico a siete grupos también poseía una altura suficiente como para ser tenido en cuenta en su estudio (Figura IV.17).

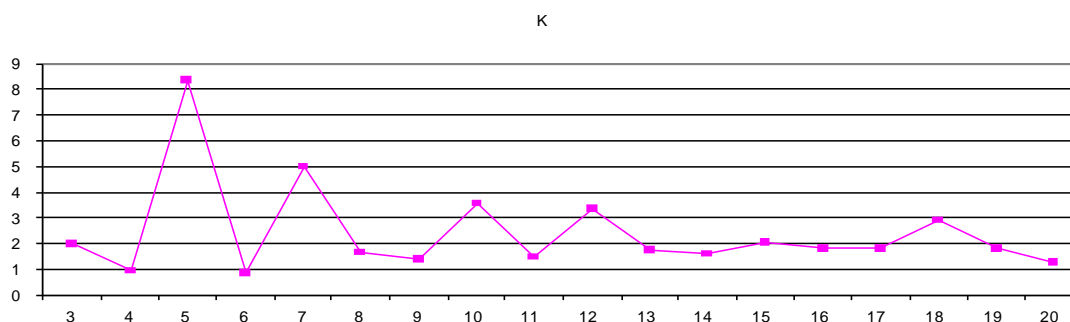


Figura IV.17. Análisis *ad hoc* de ΔK para los marcadores GTM con información previa

La Tabla IV.14 resume los valores F_{ST} de cada uno de los grupos según una estructura de 5 o 7 grupos, ambos con valores de diferenciación similares.

Tabla IV.14. Valores de diferenciación genética para cada uno de los grupos cuando $K=5$ y $K=7$

K	$F_{ST} 1$	$F_{ST} 2$	$F_{ST} 3$	$F_{ST} 4$	$F_{ST} 5$	$F_{ST} 6$	$F_{ST} 7$
5	0,30	0,39	0,36	0,20	0,37	-	-
7	0,58	0,39	0,28	0,41	0,41	0,76	0,48

En este caso, la agrupación parece responder a ciertos criterios geográficos, así, K1 corresponde en su mayor parte con cultivares de origen europeo y asiático, junto con alguna accesión americana u oceánica. En K2 se agruparon la mayoría de las variedades comerciales junto con algunas accesiones principalmente europeas. K4 resultó como el grupo con menor grado de diferenciación (0,20), donde se situaron las variedades locales junto con algunas accesiones silvestres de origen asiático. Por último, al igual que con los SSR, este tipo de marcadores no permitió la separación de las diferentes especies y subespecies sino que quedaron agrupados en el mismo grupo, junto con otras accesiones silvestres y cultivares nuevamente de origen asiático (Figura IV.18).

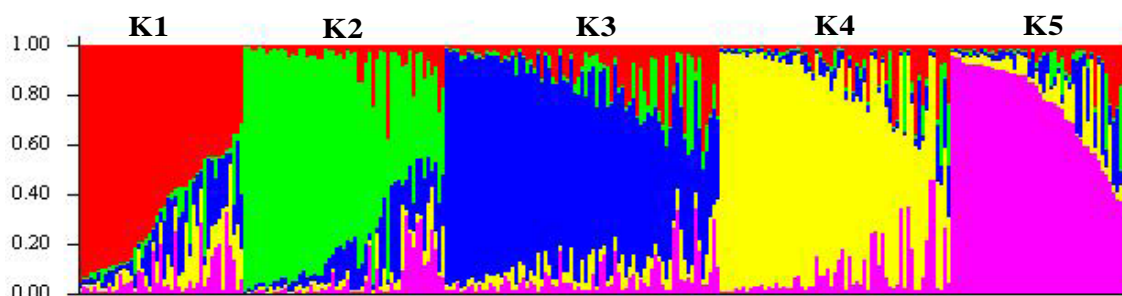


Figura IV.18. Gráfico de la estructura en 5 grupos para los marcadores GTM con información previa

La estructura resultante de la división en siete grupos, tal como muestra la Figura IV.19, determinó nuevamente la agrupación de todas las especies y subespecies no pertenecientes al taxón *P. sativum* en un solo grupo (K7). Las variedades locales se agruparon en K1 y K2, diferenciándose ambas en que K1 reunía variedades locales de flor blanca y semilla irregular, mientras que en K2 aparecían las variedades locales junto con especies silvestres de flor morada junto con otros taxones, como *P. elatius*. Los cultivares y variedades comerciales de flor morada y origen europeo se situaron en K6; entre K4 y K5 se repartieron el resto de los cultivares, apareciendo el resto de las variedades comerciales en K3.

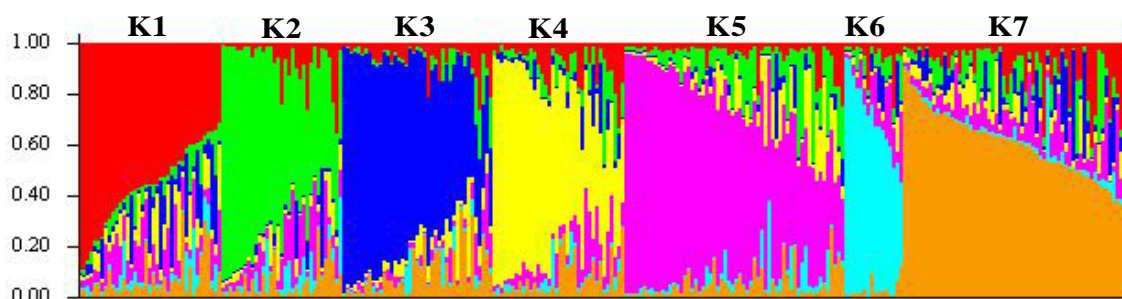


Figura IV.19. Gráfico de la estructura en 7 grupos para los marcadores GTM con información previa

La estructura de la muestra obtenida mediante marcadores GTM ha sido diferente a las obtenidas mediante el resto de marcadores o en el análisis global. En el análisis inicial de la estructura, a nivel de separación de taxones tan sólo la estructura en 10 grupos resultó capaz de establecer separación entre los mismos. Esta separación se estableció reuniendo en un grupo a los taxones *P. abyssinicum* y *P. fulvum* junto con parte de las cesiones *P. elatius*, mientras que el resto de accesiones de este último taxón aparecieron en un segundo grupo caracterizado, al igual que en el caso de los SSR, por accesiones de origen asiático (*P. asiaticum* y otras líneas silvestres). La incorporación de datos de pasaporte no permitió separar tampoco los diferentes taxones. En relación a estos taxones no *P. sativum*, es destacable además, que sólo en el análisis mediante GTM, los valores de similitud genética mostrados por los grupos que los incluyen son elevados, mostrando un grado de diferenciación similar al obtenido por los grupos *P. sativum*.

A nivel intra-especie, el empleo de GTMs permitió separar en grupos diferenciados las variedades comerciales, las variedades locales y los cultivares, llegando a establecer cierta separación en función del

origen geográfico. Este grado de diferenciación se vio acentuado al incluir en el análisis los datos de pasaporte de las accesiones que conformaban la muestra a estudio. Con esta información se estableció separación entre los materiales cultivados según amplias regiones geográficas, mostrando tendencia a agrupar accesiones europeas y asiáticas juntas, y accesiones de origen americano junto con las de origen africano. Los datos de pasaporte también favorecieron la separación de accesiones considerando caracteres morfológicos como el color de la flor o la forma de la semilla. Bajo estas condiciones de análisis de la estructura destaca que los grupos con un mayor grado de diferenciación fueron aquellos compuestos por accesiones de flor morada, junto con los de accesiones con flor blanca y semilla irregular. Por su parte, los grupos con menor diferenciación genética resultaron ser aquellos que agrupaban bien accesiones de origen europeo o bien variedades locales.

En resumen, todos los análisis han mostrado una clara separación de las accesiones *P. sativum* del resto de taxones. Del mismo modo, se ha tendido a separar las variedades comerciales, las variedades locales y los materiales clasificados como cultivares. Sin embargo, dependiendo del tipo del tipo de marcador y del análisis realizado, estos grupos se pueden subdividir bajo diferentes criterios.

En referencia a los taxones no *P. sativum*, se separan claramente *P. fulvum* y *P. abyssinicum* de otros taxones como *P. asiaticum* y *P. jomardii*, mientras que *P. elatius* muestra tendencia a repartirse entre ambos grupos. La separación entre *P. fulvum* y *P. abyssinicum* sólo se ha detectado mediante RBIP, mientras que los marcadores tipo SSR y GTM han favorecido la separación de los taxones de origen claramente asiático.

Para todos los análisis, al aumentar el número de grupos en los que se subdivide la muestra global, se ha mostrado una tendencia clara a la separación de accesiones de guisante de flor morada, y, en más de un caso, se sugiere cierta tendencia de agrupación según origen geográfico. Los grupos que engloban a las accesiones de flor morada han presentado los mayores valores de diferenciación, al contrario que los grupos de accesiones no *P. sativum* en los que el grado de similitud genética ha resultado ser notable. Se ha observado que el análisis global y mediante RBIP muestra mayor tendencia a agrupar según la clasificación taxonómica, mientras que SSR permitieron clasificar en función del origen geográfico, aunque también se observó una tendencia a separar geográficamente las accesiones mediante GTM, aunque éstos últimos marcadores formaban grupos más claros en función del tipo de accesión.

El color de la flor, como carácter morfológico cualitativo, ha tenido importancia en el análisis de diversidad desarrollado por Baranger *et al.* (2004) y Smýkal *et al.* (2008b). Ambos trabajos encuentran elevada correlación entre la agrupación de las accesiones y este carácter morfológico, entre otros. Nuestro estudio también ha encontrado relación entre la diversidad genética y el color de la flor, pues los análisis

realizados mediante SSR y GTM parecen encontrar una estructura genética relacionada al separar los materiales cultivados según este carácter morfológico.

El grado de diferenciación también se ha visto influido por el tipo de marcador empleado en el análisis y en función del grupo evaluado. De este modo los RBIP y los SSR han establecido los taxones no *P. sativum* como los grupos con menor diferenciación genética, y esto también se ha mantenido en el análisis conjunto de marcadores, mientras que el análisis mediante GTM ha mostrado a estos grupos con un mayor grado de diferenciación, estimando que el mayor grado de similitud genética residía en grupos muy restringidos de accesiones cultivadas con características muy concretas como el color de flor o la forma de la semilla.

Este cambio en los grados de diferenciación estimados puede deberse a las diferentes regiones del genoma que evalúa cada tipo de marcador. Así los SSR y los RBIP son marcadores moleculares cuya diana son secuencias no transcritas del genoma, mientras que los GTM se basan en la amplificación de secuencias génicas, y por tanto, regiones transcritas del genoma de guisante. Además, la tasa de mutación en dichas regiones así como su selección ha sido diferente. En este sentido, los SSR amplifican regiones cuya tasa de mutación en guisante se ha estimado en $4,76 \times 10^{-3}$ por *locus* por generación (Cieslarová *et al.*, 2011), mientras que la tasa de inserción de los retrotransposones en los que se basan los RBIP es aproximadamente 5×10^{-7} por inserción por generación (Jing *et al.*, 2005) y la tasa de mutación sinónima en nucleótidos pertenecientes a un exón se aproxima a 7×10^{-9} por sustitución por sitio y por año (Jing *et al.*, 2005). En el caso de secuencias génicas, la tasa de mutación también se ve influenciada por el tipo de material evaluado, tal y como se ha demostrado en especies como maíz (Tenaillon *et al.*, 2001) o cebada (Caldwell *et al.*, 2006). En el caso concreto del guisante, la tasa de mutación por par de bases en variedades locales duplica a la de cultivares, siendo esta última casi seis veces menor que la tasa de mutación mostrada en líneas silvestres (Jing *et al.*, 2007).

Las diferencias en las tasas de mutación que afectan a los distintos tipos de marcadores afectan al tipo de diversidad y la medida obtenida. De tal forma que una tasa de mutación elevada, como la mostrada por los SSR puede provocar fenómenos de homoplasia (Smýkal *et al.*, 2011; Ellis, 2011) de forma que tamaños de amplificación iguales no correspondan al mismo producto de amplificación, lo que implicaría asumir similitudes genéticas no existentes. Por tanto, los fenómenos de homoplasia asociados a los SSR podrían provocar errores en la interpretación de la diversidad genética así como en la elaboración de árboles filogenéticos. Mientras que mutaciones mucho menos frecuentes son empleadas para determinar relaciones entre linajes ancestrales, como en el caso de RBIP (Jing *et al.*, 2005; Smýkal *et al.*, 2008a). No obstante, hay que tener en cuenta que las tasas de mutación pueden ser diferentes en las líneas evaluadas y, por tanto, estar midiendo en diferentes escalas la variabilidad genética de una muestra. En este sentido, los GTM permitirían establecer relaciones de diversidad genética así como la medida de la variabilidad

entre accesiones con similar tasa de mutación, ya que si no las relaciones entre accesiones podrían verse distorsionadas.

Los resultados presentados son consistentes con los obtenidos por Smýkal *et al.* (2008b). En su trabajo sugieren que la combinación de dos tipos de marcadores, SSR y RBIP, es más informativa que de forma individualizada. La aproximación mediante RBIP es más precisa para estudios de filogenia en un germoplasma amplio, mientras que la aproximación mediante SSR permitiría obtener una discriminación de alta resolución entre accesiones muy relacionadas. Por tanto, dependiendo del tipo de marcadores utilizados para el análisis estadístico la estructura de la colección puede diferir, favoreciendo la información taxonómica la interpretación de los resultados. En líneas generales los criterios influyentes en la jerarquización genética detectados han sido la información taxonómica, el tipo de material, su origen geográfico y el color de flor.

Con respecto a la estructura de la colección, los resultados obtenidos son consistentes con los presentados por otros autores en cuanto a la agrupación de taxones, como es el caso de Kosterin y Bogdanova (2008), pero presentan diferencias con respecto a los resultados obtenidos por trabajos más recientes Jing *et al.* (2010) o Martin-Sanz *et al.* (2011) en referencia a las relaciones de *P. elatius* con el resto de taxones. Las diferencias en el agrupamiento de taxones y accesiones es común en el estudio de diversidad del género *Pisum*, de tal forma que actualmente aún no está clara la organización taxonómica del género y hay diversas teorías sobre las relaciones entre las diferentes accesiones dentro de la especie *P. sativum*.

En una comparación individual, los trabajos presentados por Jing *et al.*, (2010; 2012) representan el mayor esfuerzo realizado hasta la actualidad en cuanto a número de accesiones evaluadas, lo cual hace de sus trabajos un referente a tener en cuenta. No obstante, el primer trabajo analiza la diversidad genética obtenida mediante RBIP, un solo tipo de marcador molecular, de modo que la información puede encontrarse sesgada. En este sentido, los resultados obtenidos en nuestra muestra a partir de los RBIP y con la información adicional son consistentes con sus teorías, ya que *P. abyssinicum* se sitúa en un grupo diferente y con mayor grado de diferenciación que *P. fulvum*, el cual presenta un elevado grado de similitud genética, mientras que *P. elatius* se encuentra repartido entre ambos grupos. El segundo trabajo (Jing *et al.*, 2012) añade un mayor número de accesiones procedentes de nuevas colecciones e incluye otro tipo de marcadores, SSAP, también basados en retrotransposones. Los resultados de este segundo trabajo confirman en su mayor parte los obtenidos mediante RBIP. Nuestros resultados coinciden con lo sugerido por los autores del trabajo (Jing *et al.*, 2010) y Vershinin *et al.* (2003) con respecto a *P. fulvum* como el taxón más ancestral, y a *P. abyssinicum* como taxón formado a partir del cruce de *P. fulvum* y otro taxón silvestre, *P. elatius*.

Variabilidad genética entre grupos definidos

En base a los resultados obtenidos en los análisis previos se estructuró de nuevo la colección a estudio en varios grupos, en función de su clasificación taxonómica concreta incluyendo subespecies, variedades y otros taxones propuestos en la bibliografía. El taxón *P. sativum* se subdividió en *P. sativum* subsp *sativum*, cultivares, variedades comerciales y locales, además de ecotipos y silvestres como se presentaba al inicio de los análisis. Otro carácter a tener en cuenta en la agrupación, que ha surgido en sucesivas ocasiones durante la aplicación del método basado en modelos, ha sido el color de la flor con lo que también se han dividido las accesiones en función de este carácter. Por último, se ha apreciado la agrupación según origen geográfico, siendo llamativo el caso de las accesiones de origen asiático, por tanto también se ha incluido este parámetro en el momento de estructurar la colección total.

Como resultado de los nuevos factores de división se definieron un total de 33 grupos dentro de la muestra, tal y como se detallan en la Tabla IV.15.

Tabla IV.15. Nuevos grupos dentro de la muestra total

Nombre del grupo		Nombre del grupo	
1	<i>P. abyssinicum</i>	18	<i>P. sativum</i> cultivar flor morada Asia
2	<i>P. arvense</i>	19	<i>P. sativum</i> cultivar flor morada Europa
3	<i>P. asiaticum</i>	20	<i>P. sativum</i> cultivar flor morada Oceanía
4	<i>P. elatius</i> Asia	21	<i>P. sativum</i> ecotipo América
5	<i>P. elatius</i> resto	22	<i>P. sativum</i> ecotipo Asia
6	<i>P. fulvum</i>	23	<i>P. sativum</i> ecotipo España
7	<i>P. humile</i>	24	<i>P. sativum</i> ecotipo Europa
8	<i>P. jomardii</i>	25	<i>P. sativum</i> local España
9	<i>P. sativum</i> variedades comerciales	26	<i>P. sativum</i> local resto
10	<i>P. sativum</i> cultivar flor blanca América	27	<i>P. sativum</i> subsp <i>sativum</i> flor blanca
11	<i>P. sativum</i> cultivar flor blanca Asia	28	<i>P. sativum</i> subsp <i>sativum</i> flor morada
12	<i>P. sativum</i> cultivar flor blanca España	29	<i>P. sativum</i> varios
13	<i>P. sativum</i> cultivar flor blanca África	30	<i>P. sativum</i> silvestre África
14	<i>P. sativum</i> cultivar flor blanca Europa	31	<i>P. sativum</i> silvestre Asia
15	<i>P. sativum</i> cultivar flor blanca Oceanía	32	<i>P. sativum</i> silvestre España
16	<i>P. sativum</i> cultivar flor morada América	33	<i>P. sativum</i> silvestre resto
17	<i>P. sativum</i> cultivar flor morada África		

Debido a la nueva reestructuración de la colección a estudio se planteó observar nuevamente la variabilidad genética de la muestra en base a métodos descriptivos y un nuevo análisis de distancias genéticas para comprobar la agrupación de las accesiones y las relaciones entre las mismas.

El programa STRUCTURE ha permitido establecer o intuir la presencia de varios grupos como posibles conformantes de la estructura genética de la colección en estudio, pero el programa carece de ajuste en la descripción de la relación entre grupos (Kalinowski, 2010). Debido a esto, autores como Smýkal *et al.* (2008a) y Jing *et al.* (2010; 2012) han recurrido a otro tipo de análisis que permita establecer relaciones entre los grupos encontrados y confirmar sus teorías. En este sentido, todas las accesiones de la muestra a estudio se agruparon atendiendo a los resultados obtenidos a partir del programa STRUCTURE, de forma similar al procedimiento seguido por Jing *et al.* (2010) en cuanto a seguir los criterios de separación obtenidos mediante el programa STRUCTURE, obteniendo para la muestra a estudio un total de 33 grupos.

Los análisis efectuados sobre estos 33 grupos se realizaron con el global de la información obtenida para los tres tipos de marcadores moleculares, esperando obtener el mayor grado de información posible a todos los niveles de diferenciación. El uso de diferente tipos de marcadores moleculares en el análisis de diversidad de guisante ya ha sido realizado por otros autores como Tar'an *et al.* (2005) con RAPD, ISSR y SSR, Baranger *et al.* (2004) con isoenzimas, proteínas de almacenamiento, RAPD y EST o Smýkal *et al.* (2008a) con SSR y RBIP.

Análisis de variabilidad genética en la estructura poblacional

En la Figura I.20 se muestran gráficamente los resultados obtenidos, para los grupos establecidos anteriormente, en lo referente al número de alelos detectados en relación a los *loci* y la heterocigosidad esperada. Se puede observar cómo determinados grupos presentaron gran riqueza en relación al número de variantes alélicas, como es el caso de las variedades locales o los dos grupos correspondientes al taxón *P. elatius*. Otros grupos, al contrario, poseían una mayor estabilidad en cuanto al número de variantes alélicas, como es el caso de algunos grupos de flor morada, presentando un número inferior de alelos por *locus*. Por último, se encontraron grupos con un número muy reducido de alelos para cada uno de los *loci*, tendiendo a predominar tan sólo una variante alélica en todo el grupo. Éste fue el caso de *P. jomardii* o los ecotipos asiáticos y americanos.

Del mismo modo que con el número de alelos por *locus*, la heterocigosidad esperada detectada para cada uno de los grupos variaba dependiendo del grupo a estudio (Figura IV.21). Los grupos que incluían los diferentes ecotipos y accesiones silvestres o semi-silvestres presentaron los menores valores de heterocigosidad dentro de cada *locus*, al contrario que los grupos que englobaban al taxón *P. elatius*, en los que se mostraban valores elevados de heterocigosidad esperada. Con heterocigosidad elevada también se mostraron los grupos de variedades locales, seguidos por los cultivares de flor blanca y, seguidamente, los cultivares de flor morada.

Además, este tipo de representación gráfica permitió comprobar la variabilidad presente dentro de cada grupo con respecto a cada *locus*. Teniendo en cuenta que el orden de marcadores en ambos análisis

fue primero los RBIP, seguidos de los GTM y, por último, los SSR, se observó nuevamente que la mayor variabilidad se encontraba dentro de los *loci* correspondientes SSR (los valores más elevados para cada uno de los parámetros tienden a observarse en la parte derecha de los gráficos, correspondiente a este tipo de marcadores), seguido de los GTM y siendo los RBIP los que menores parámetros de variabilidad han presentado.

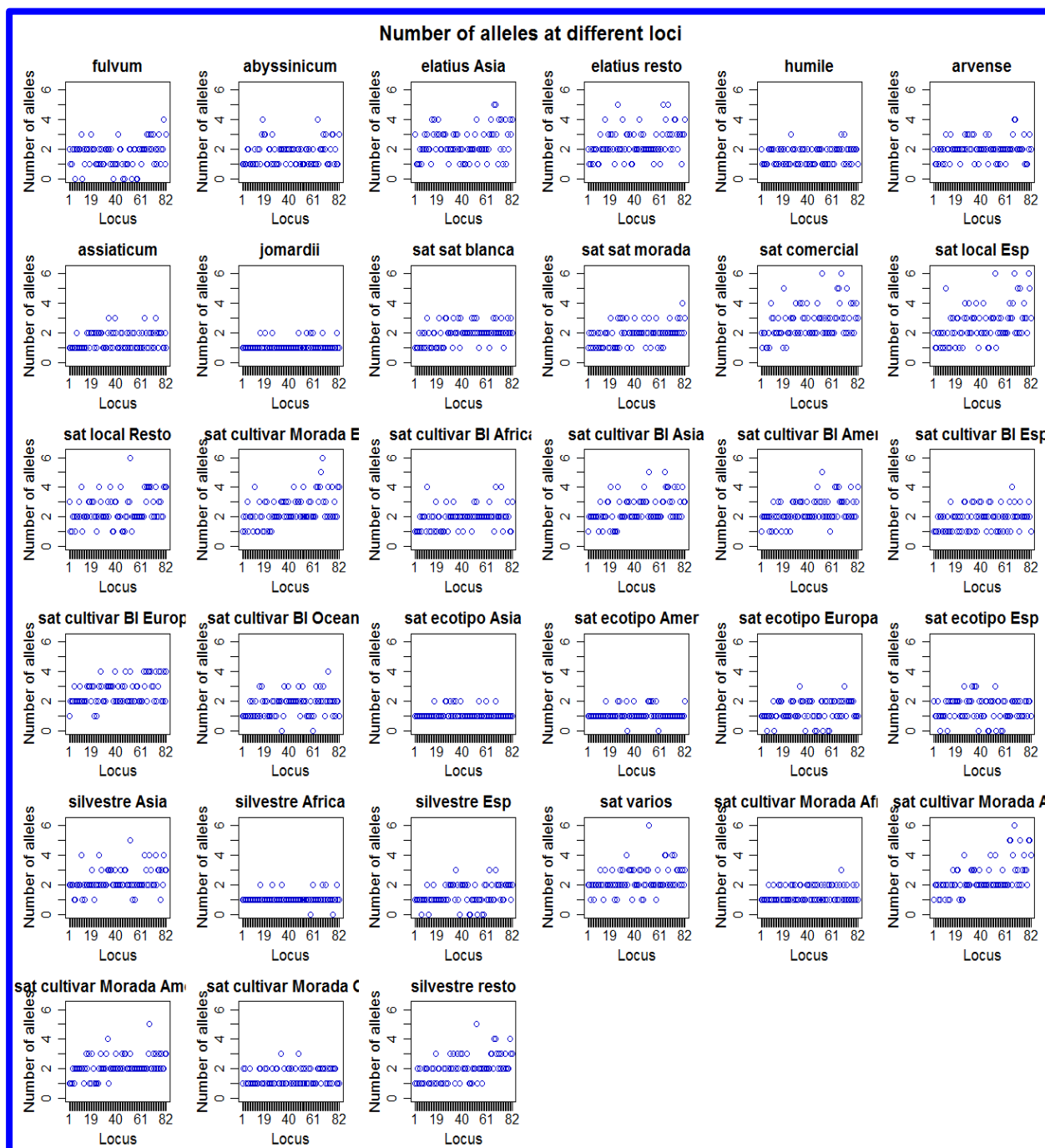


Figura IV.20. Representación gráfica del número de alelos en relación a los *loci* analizados obtenido para cada uno de los grupos definidos

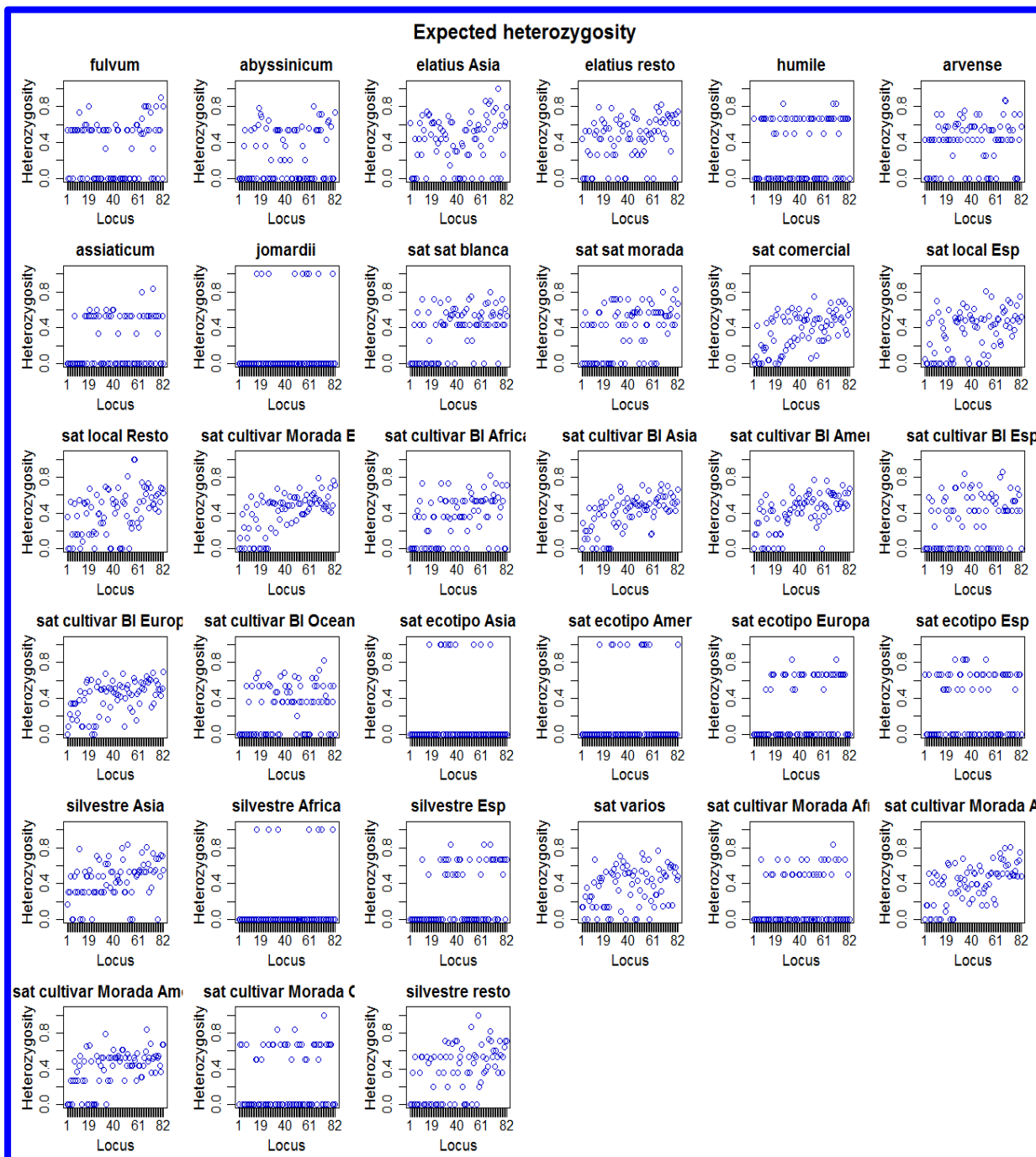


Figura IV.21. Representación gráfica de la heterocigosis esperada para cada *locus* en cada uno de los grupos definidos

1. 5. Estudio de la diversidad genética: agrupación y ordenación

Análisis factorial

En una aproximación para definir las relaciones entre los grupos definidos se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA). La medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) fue de 0,46, valor en el límite de los valores recomendados por Kaiser, Meyer y Olkin, por lo que el proceso de reducción de variables pudiera no presentar una resolución limitada. Sin embargo, el test de

esfericidad de Bartlett permitió asumir la existencia de correlaciones significativas entre las variables originales, por lo que el modelo factorial puede resultar adecuado.

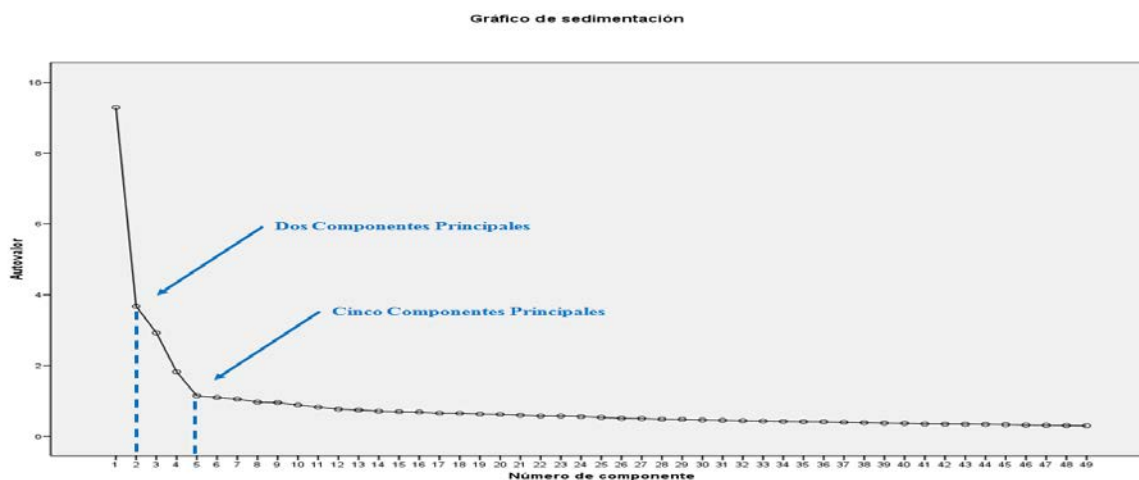


Figura IV.22. Representación gráfica de sedimentación correspondiente al número de componentes obtenida en PCA frente al autovalor propio de cada componente

En este sentido, los resultados del modelo mostraron que la información contenida en 233 *loci* o variables, podía ser explicada al 95% por la combinación de dichas variables en 106 componentes principales. Del total de estas 106 componentes principales sólo las 25 primeras explicaban de forma individual más del 1% de la varianza, y tan solo a las cuatro primeras correspondían valores explicativos superiores al 5%. Al aplicar el criterio de Kaiser (1960) se vuelve a destacar el relativamente reducido número de componentes representativas de la información, ya que son las 7 primeras componentes las que presentaban autovalores superiores a 1. Este criterio tiende a sobrestimar el número de componentes principales (Zwick y Velicer, 1986; Fabrigar *et al.*, 1999). Si se aplica el test de *scree* propuesto por Catell (1960) (Figura IV.24), son 2 o 5 las componentes que parecerían adecuadas. En contra de lo comentado para el anterior criterio, método tiende a subestimar el número de componentes a retener (Jackson, 1993; Férré, 1995; Peres-Neto *et al.*, 2005).

La primera componente principal obtenida, PC1, representó por sí sola el 16,81% de la varianza explicada, mientras que las siguientes componentes principales explicaron porcentajes de varianza menores al 10% (PC2: 6,65%, PC3: 5,29%). En cualquier caso, el total de la varianza retenida no parece demasiado elevado como para garantizar la detección de patrones distribución de las accesiones de la colección.

Asimismo, las comunalidades presentaron valores bajos (datos no mostrados), indicando que las variables podían no encontrarse bien representadas en el espacio de los factores.

Para facilitar la interpretación de los resultados en este tipo de casos en los que la distribución espacial pueda no ser clara, se recurre a la rotación, de tal manera que se mantenga la comunalidad y el porcentaje de varianza explicada por el modelo, aunque no por cada eje.

En este sentido se realizaron dos representaciones, ambas con rotación bidimensional *Varimax*, en la que se representaron todas las líneas de guisante evaluadas según su clasificación taxonómica en la primera representación (Figura IV.23, y en función su origen geográfico y el tipo de cultivo con el que se corresponden en la segunda representación³ (Figura IV.24).

La distribución de los diferentes taxones, mostrada en la Figura IV.23, separó claramente en función de PC1 a *P. fulvum* (con valores negativos), de *P. abyssinicum* (con valores positivos) Con respecto a este eje, para el resto de grupos se observó que sus accesiones se distribuyeron en dos grupos claros, cada uno aparentemente asociado a uno de los dos taxones anteriormente mencionados, si bien las accesiones de *P. arvense* y *P. humile* tendieron a situarse más próximas a *P. abyssinicum*. Las accesiones pertenecientes al taxón *P. elatius* se distribuyeron indistintamente en ambas nubes de puntos. En referencia al segundo eje representado, PC2, no parece detectarse un patrón claro de distribución.

La representación bidimensional de las dos primeras componentes (Figura IV.24) con respecto al tipo y origen de cada accesión de guisante muestra que a lo largo de PC1 se tienden a distribuirse con valores negativos, las variedades locales y los ecotipos. Las accesiones más próximas al origen son predominantemente accesiones silvestres. Los materiales cultivados y un gran porcentaje de variedades comerciales se situaron en valores positivos de esta componente principal. Con respecto a la PC2, se detectó una tendencia a separar las accesiones silvestres de los cultivares de flor blanca quedando mezcladas entre ambos grupos las accesiones de cultivar con flor morada. En cuanto a la distribución en función del origen geográfico, se observa cómo las accesiones de origen oceánico se agrupan en valores positivos de ambas componentes, las accesiones de origen africano aparecen distribuidas en valores positivos de la CP1, pero con valores negativos de la CP1. Los materiales cultivados procedentes de Europa y América muestran una diversidad mayor, al distribuirse más ampliamente en valores positivos de CP1 a lo largo de la CP2.

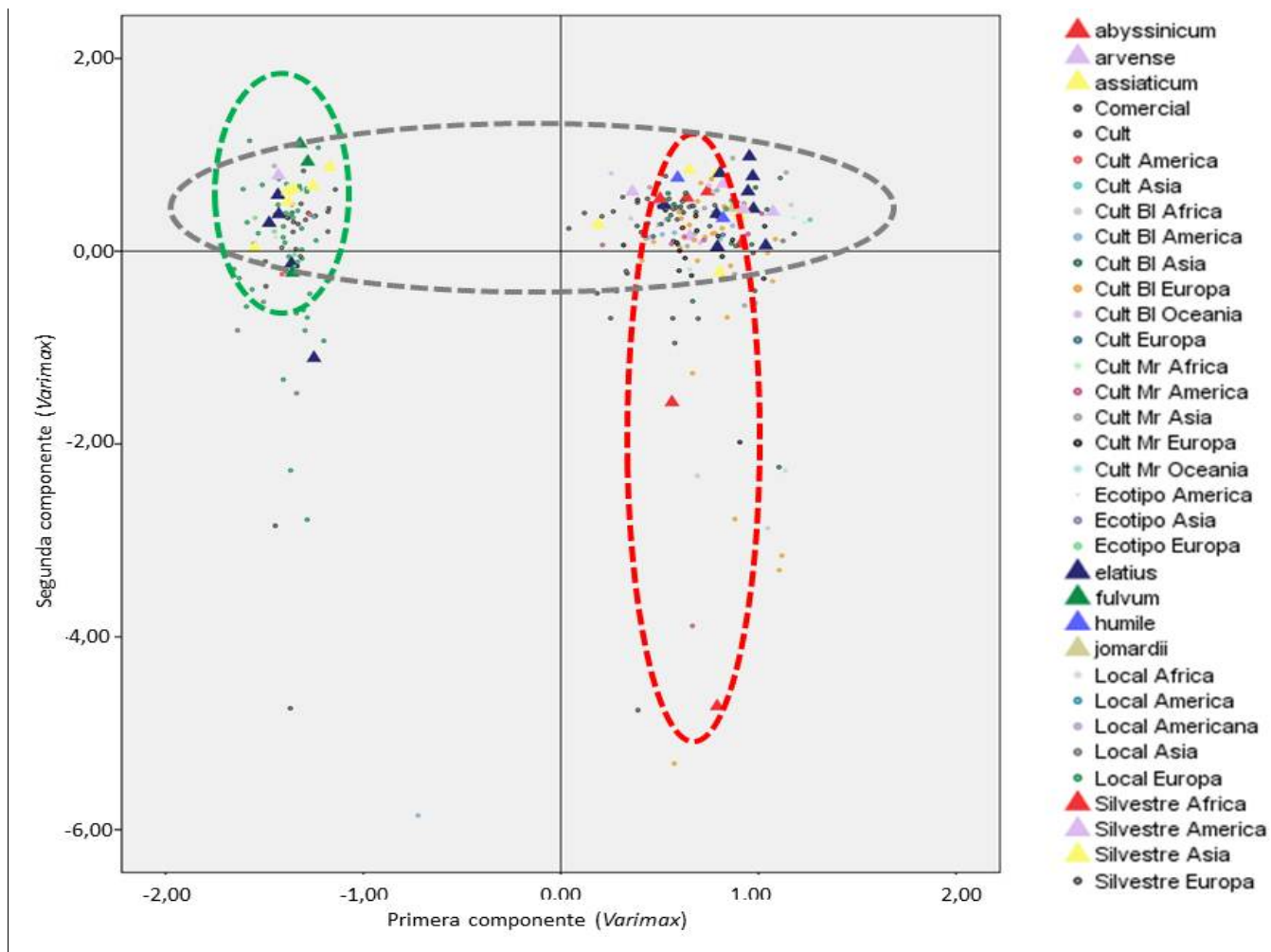


Figura IV.23. Representación bidimensional con rotación *Varimax* de las dos primeras componentes principales del análisis factorial según grupo taxonómico

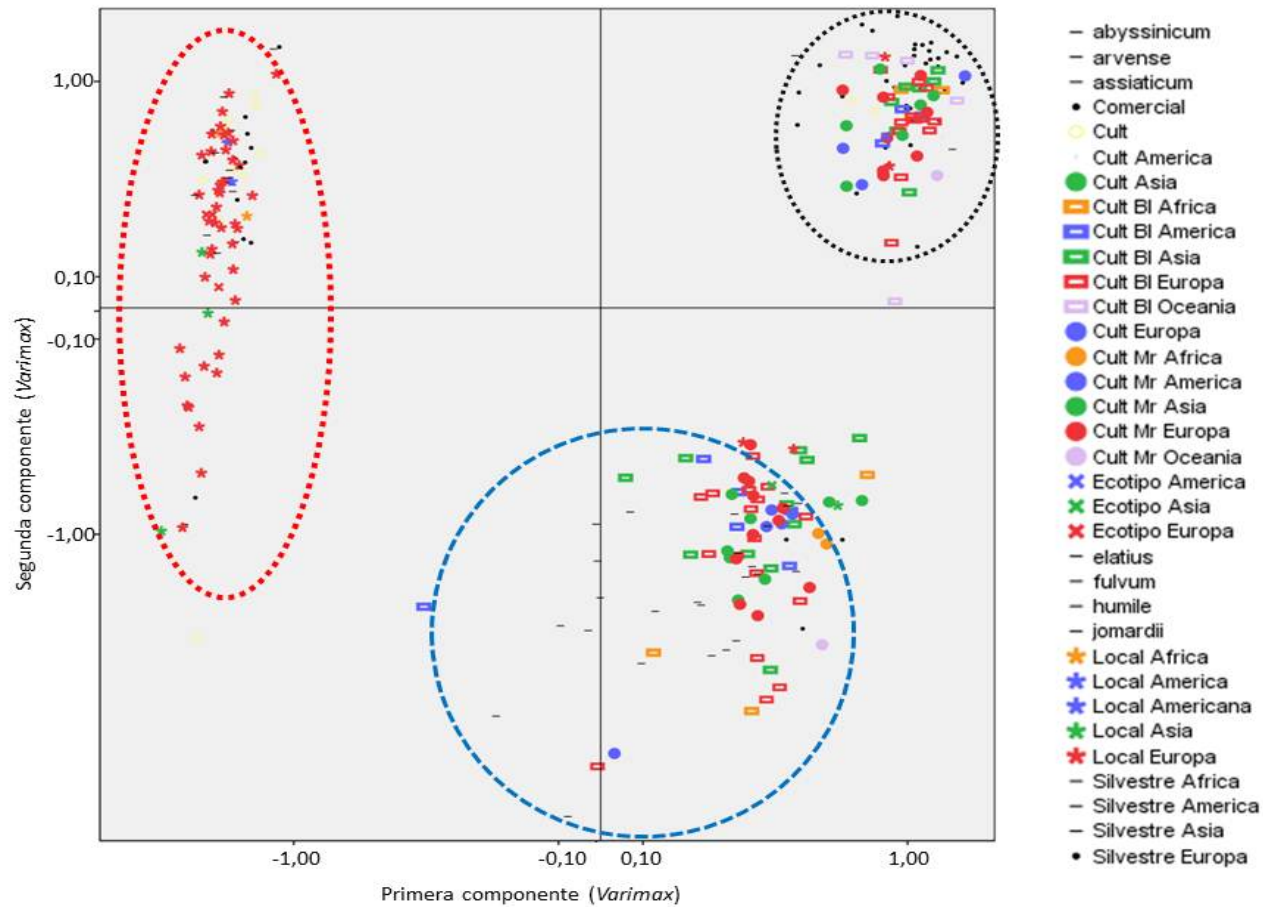


Figura IV.24. Representación bidimensional con rotación *Varimax* de las dos primeras componentes principales del análisis factorial según tipos de cultivo y origen geográfico

La CP1 ha sido más informativa, sin embargo, y aunque en la CP2 agruparse todas las accesiones en valores positivos, se observaron una serie de accesiones que se separan de esa tendencia, algunas muy acusadamente. Si bien no se puede decir nada concreto de esas accesiones, sí podría plantearse que puedan representar fuentes de variabilidad diferentes a la globalidad de la colección, con el consiguiente interés que podría suponer en continuar explorando sobre ellas en estudios posteriores. Por tanto, el análisis de componentes principales ha permitido separar claramente los taxones *P. abyssinicum* y *P. fulvum* entre sí, estableciendo relaciones de proximidad entre los *P. arvense* y *P. humile* con *P. abyssinicum*. Asimismo, se ha mostrado una tendencia a una estructuración en tres grandes grupos según el tipo de material: variedades locales, variedades silvestres y un grupo de variedades comerciales y cultivares. También parece haberse detectado una cierta diferenciación entre parte de las accesiones de orígenes europeo y asiático del resto de materiales, una aparente influencia en la estructura motivada por asociación con el color de la flor. Por último, se han detectado una serie de accesiones que parecen englobar una variabilidad relativamente divergente a la de la globalidad de la colección, al menos en lo referente a las posibles implicaciones sobre la variabilidad aportadas por la proyección en el segundo eje en la Figura.

La separación de los taxones es consistente con trabajos anteriores (Jing et al., 2010; 2012; Martin-Sanz et al., 2011), en los cuales se demuestra la separación entre *P. fulvum* y *P. abyssinicum*, mientras que *P. elatius* presenta una mayor distribución en la variabilidad que encierra. Sin embargo, a diferencia de esos trabajos, en nuestro caso este tipo de análisis ha permitido establecer cierta influencia en la estructura genética dentro del género *P. sativum*, que si bien no de forma estricta o contundente, sí parece al menos tener cierta influencia por factores vinculados al origen geográfico en cuanto a continente de procedencia, el tipo de accesión en cuanto a su carácter silvestre, de variedad local o cultivar y en cuanto a su asociación con ciertas características morfológicas como es el color de la flor.

Clasificación jerárquica y agrupación basada en UPGMA

Como complemento al análisis anterior, y considerando que el método de agrupamiento basado en modelos ha demostrado que el estadístico F puede resultar útil a la hora de establecer relaciones a nivel de distancia genética entre los grupos mediante la determinación de F_{ST} , se muestra un resumen gráfico de este análisis en la Figura IV.25. El estadístico F como estima de la diversidad genética y en concreto el parámetro F_{ST} como medida de el grado de diferenciación génica entre los grupos, en función de sus frecuencias alélicas, puede permitir establecer las diferencias y similitudes entre los grupos considerados dentro de la colección.

En la Figura IV.25 se ha representado representa el valor de F_{ST} en distintas tonalidades de azul, de forma que los tonos más claros indican mayor similitud génica entre grupos los más oscuros mayor distancia entre ellos.

Dentro de la colección, se observa una región centrada en la zona inferior, correspondiente a variedades cultivadas y de flor predominantemente blanca, en la que predominaron tonos más claros de azul, lo que indica un mayor grado de similitud génica entre los grupos.

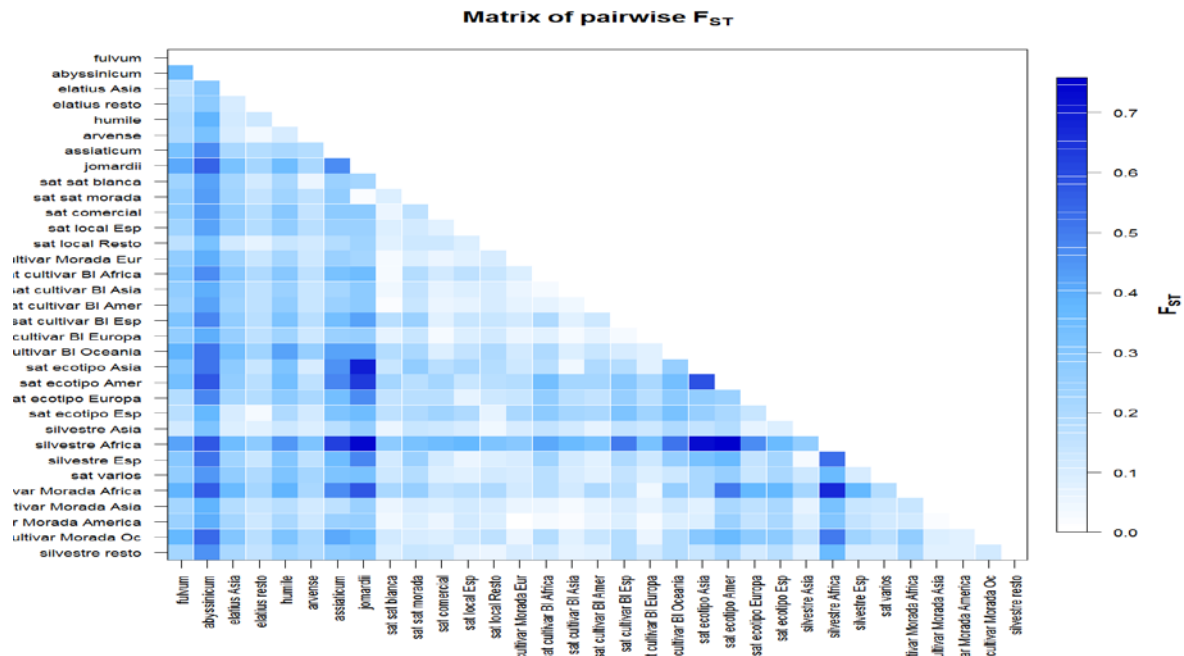


Figura IV.25. Matriz de emparejamiento en base a distancias F_{ST}

La zona en la que se focalizaron los tonos más oscuros, es decir mayor distanciamiento genético entre grupos, fue la compuesta por los diferentes taxones pertenecientes al género, pero que no correspondían a *P. sativum*, tal y como se puede observar en los grupos situados a la izquierda de la Figura IV.25. .

Si se focaliza en grupos individuales, en función de la tonalidad global asociada los materiales más divergentes de la colección global parecen ser los grupos de *P. abyssinicum*, *P. asiaticum*, *P. jomardii* y los materiales silvestres procedentes de África, difiriendo también entre ellos de forma notable cuando se les compara entre ellos.

Por último, la zona situada más a la derecha recogía a ecotipos, accesiones silvestres o semi-silvestres junto con otras accesiones cuya característica común era presentar flor de coloración morada. Esta última zona presentó unos niveles intermedios de diferenciación génica con respecto a los demás grupos.

En resumen, se observó un amplio rango de diferenciación génica entre los grupos pudiendo establecer diferentes grados de separación y pudiendo utilizar estas diferencias para obtener una representación gráfica en forma de dendrograma que permitiera visualizar los posibles agrupamientos.

Al igual que en el análisis inicial de la estructura de la colección total a nivel genético basado en distancias ([Apartado IV.1.3](#)), se analizaron de nuevo las distancias entre grupos en función de los

marcadores moleculares de forma global. También se analizaron los dendrogramas obtenidos a partir del cálculo de la distancia de Nei y el agrupamiento UPGMA, en función de la matriz de distancias obtenida para cada caso, que se muestran en el [Anexo IV.3](#). El dendrograma obtenido a partir del conjunto de los marcadores moleculares, Figura IV.26, muestra cómo se estableció la agrupación de los diferentes grupos dentro del taxón *P. sativum* en un solo nudo, mientras que los diferentes taxones del género y los ecotipos se incorporaron sucesivamente, formando nuevos nodos, al árbol filogenético mostrando una relación con *P. sativum* distanciada a nivel genético.

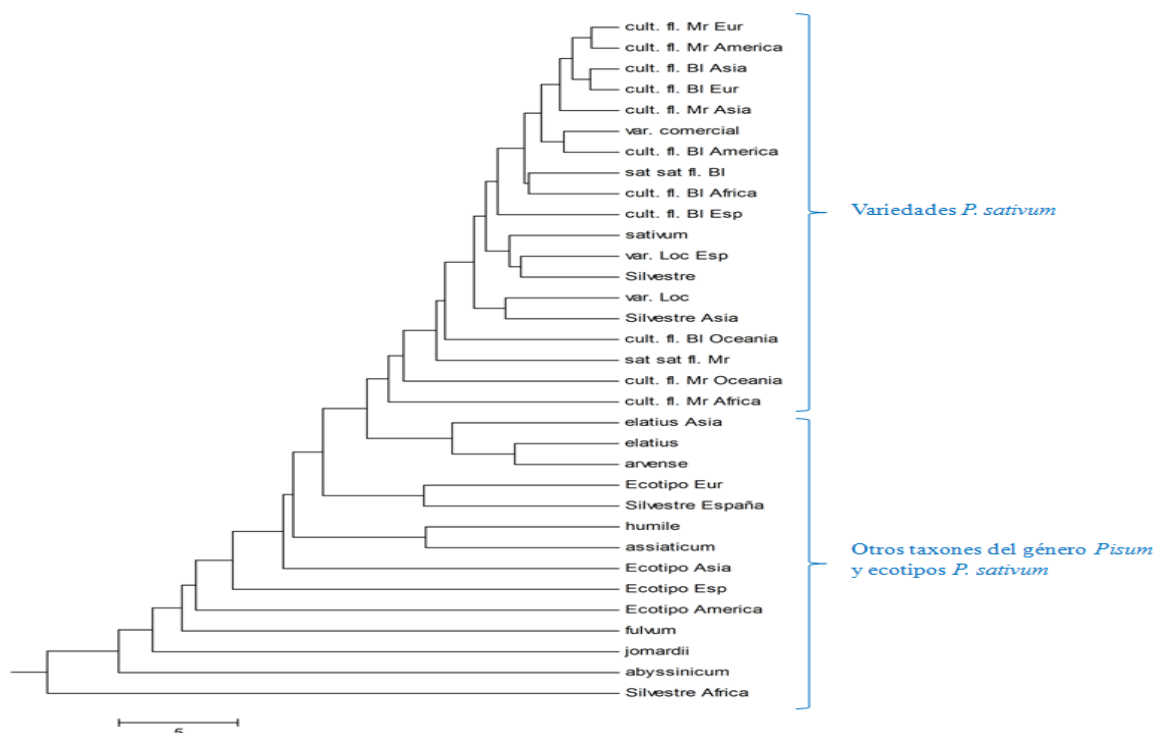


Figura IV.26. Dendrograma basado en distancias F_{ST} para los grupos definidos en la colección

Los dendrogramas basados en la agrupación jerárquica mediante el algoritmo UPGMA tienden al encadenamiento de las ramas y si se presentan, como es este caso, multiniveles puede sugerir una relación que realmente es inexistente. Las agrupaciones mediante este método pueden resultar incorrectas desde el punto de vista de que las uniones en nodos dependen de los nodos y las ramas formados anteriormente. Estos condicionantes hacen que el método basado en UPGMA requiera, en el caso de datos con gran heterogeneidad, la subdivisión en grupos más comprensibles o incluso requieran de análisis confirmatorios. La aplicación de este método de agrupación a nuestra colección de germoplasma ha resultado en una agrupación excesivamente sencilla que tan sólo permite diferenciar a nivel taxonómico. Los resultados obtenidos mediante UPGMA no permiten obtener conclusiones claras de las relaciones existentes dentro del taxón *P. sativum*, sugiriendo la necesidad de otros análisis de tipo confirmatorio. Lo que demuestra la limitación de este análisis cuando las relaciones entre grupos son complejas.

El cálculo previo del parámetro F_{ST} como medida de la diferenciación genética entre los 33 grupos establecidos mostró como grupos más diferenciados entre sí a los ecotipos y las accesiones silvestres entre sí en función de su origen geográfico, quedando claramente más diferenciadas las accesiones silvestres de origen asiático. Por el contrario, los materiales cultivados eran altamente similares independientemente de su origen y sólo aumentan su diferenciación en función del color de la flor. El grupo correspondiente a *P. abyssinicum* mostró mayor grado de diferenciación con el resto de grupos que *P. fulvum*. Los taxones *P. jomardii* y *P. asiaticum* también se mostraron diferenciados del resto.

Este parámetro permitió confirmar el mayor grado de diferenciación de *P. abyssinicum* dentro del género y, en menor grado, el de *P. fulvum*, tal y como se ha mostrado en resultados previos ambos taxones se muestran independientes de *P. sativum*. Este parámetro sostiene la diferenciación de otros taxones menos reconocidos como son *P. asiaticum* y *P. jomardii*. Además, a nivel interno del taxón *P. sativum*, la clasificación bajo criterios de tipo de material y color de flor permite establecer grados de diferenciación en función del origen geográfico, así como establece diferencias claras entre las accesiones silvestres y los ecotipos, internas y con el resto de accesiones que componen este taxón.

Las numerosas referencias a la aplicación de este tipo de métodos de clasificación jerárquica basados en el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) lo sitúan como uno de los métodos más extendidos como herramienta de clasificación y agrupación. Sin embargo, también son conocidas sus limitaciones ya que asume una misma tasa de mutación dentro de cada accesión evaluada lo que puede provocar que la topología creada puede sea errónea (Michener y Sokal, 1957). Además, el orden dentro del dendrograma depende del orden en el cual los datos son introducidos (Bayer, 1985; Sneath and Sokal 1973; Podani, 1994; Kovach 1993). Por tanto, aunque este tipo de método es ampliamente utilizado para la determinación de relaciones genéticas entre poblaciones, dichas relaciones pueden no ajustarse a la realidad (Highton, 1993; Datta y Datta, 2003; 2006; Khan *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011; Mar *et al.*, 2011). En base a estas evidencias y teniendo en cuenta las diferencias en los resultados obtenidos mediante los dendrogramas frente a los resultados tras la aplicación de métodos bayesianos, se puede concluir que, en el caso concreto de la muestra evaluada en este estudio, los métodos basados en distancias permiten una primera visualización de la distribución de accesiones en grupos dentro de la muestra pero, que la complejidad en las relaciones entre grupos sugieren que es necesario la aplicación de un método más informativo, como el método bayesiano, para acercarse más a la distribución de la diversidad genética entre grupos y su composición.

Un análisis comparativo de los resultados obtenidos en el cálculo del parámetro F_{ST} y el dendrograma se observa claramente una pérdida de la información previa existente a nivel de diferenciación entre los grupos establecidos dentro de la muestra. El dendrograma establece una separación entre los taxones no *P. sativum* de *P. sativum*. Sin embargo los ecotipos aparecen mezclados dentro de los taxones relacionados con *P. sativum*, mientras que las líneas silvestres aparecen distribuidas en ambos grupos. Dentro del

grupo correspondiente a *P. sativum* si se observa una tendencia de agrupación en función del color de la flor pero no en relación al origen geográfico. Por tanto, las relaciones de similitud genética han quedado reducidas con respecto a los análisis mostrados previamente, impidiendo observar la estructura de la muestra presentada anteriormente.

Además, hay que tener en cuenta que, el dendrograma ha sido obtenido a partir de la distancia de Nei para el global de marcadores, y que dicho tipo de dendrograma asume tasas de evolución idénticas. Por tanto, este tipo de representaciones no se ajusta para este estudio, en primer lugar porque los marcadores empleados presentan diferentes tasas de mutación, lo que afectaría la construcción del árbol e impediría optar por el algoritmo UPGMA. En segundo lugar, la obtención de matrices de distancia y la construcción de árboles filogenéticos reduce la información inicial y crea topologías poco fiables en casos como nuestra muestra, cuyas relaciones se han mostrado complejas.

Ordenación mediante escalamiento multidimensional

El análisis en coordenadas principales (PCoA) es un tipo de escalamiento multidimensional que permite visualizar similitud o distancia entre muestras. El PCoA permite realizar un análisis confirmatorio de los resultados obtenidos en el dendrograma anterior y establecer una comparativa entre ambos métodos en el estudio de las relaciones entre grupos.

En la Figura IV.27 se muestra el PCoA obtenido para dos dimensiones en función de la matriz de distancias calculada en base al índice F_{ST} en relación a los grupos definidos en la muestra a estudio.

El análisis en coordenadas principales, PCoA, obtenido a partir de la matriz de distancias según el índice F , permitió obtener una representación gráfica en la que los grupos se dispusieron en dos dimensiones obtenidas en el análisis estadístico.

A diferencia de los dendrogramas, PCoA permitió la representación gráfica sin la limitación de una agrupación por pares, lo que puede alterar la estructura de las relaciones entre los grupos. Los resultados mostraron cómo se separaban claramente los diferentes taxones dentro del género *Pisum*, de forma que los taxones relacionados con *P. sativum* se situaban a lo largo de la dimensión 1 en valores positivos. *P. abyssinicum* y *P. fulvum* correspondieron a los grupos situados en los valores positivos más extremos de la dimensión 1 y se situaron claramente en extremos opuestos de la dimensión 2.

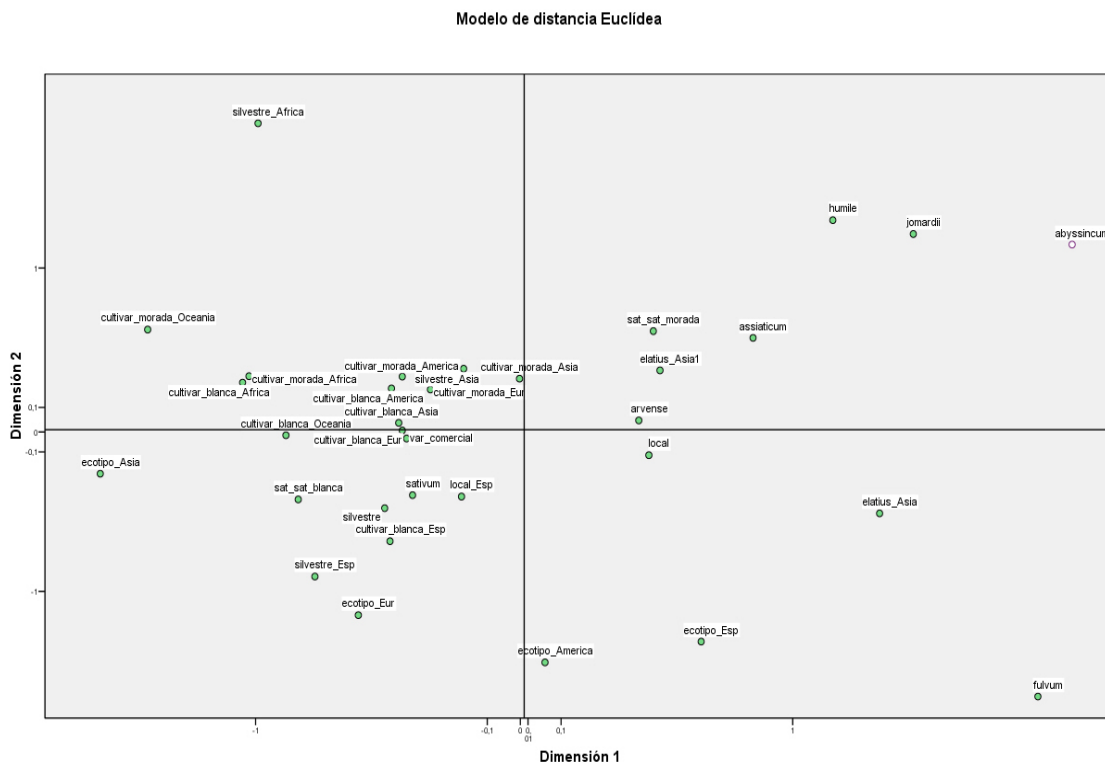


Figura IV.27. Representación de los grupos en las dos dimensiones obtenidas mediante PCoA en base al índice F_{ST}

El cuadrante que correspondía a valores positivos para ambas dimensiones mostró al taxón *P. abyssinicum* como grupo más alejado del eje, no obstante en dicho cuadrante se situaron más o menos cerca otros taxones como *P. humile*, *P. jomardii*, *P. assiaticum* y *P. arvense*. *P. elatius* se encontró dentro de los valores positivos de la dimensión 1, sin embargo el grupo de accesiones de origen asiático se situaron en valores positivos de la dimensión 2, mientras que el resto de líneas de *P. elatius* se situaron más cercano a *P. fulvum*.

Dentro de los valores negativos de la dimensión 1 se pudo observar la tendencia al agrupamiento de los diferentes tipos de accesiones dentro de *P. sativum*. En valores positivos de la dimensión 2 se localizaron los cultivares de flor morada y seguidamente, con valores positivos pero ligeramente inferiores, se situaron las accesiones con flor blanca. En el cuadrante con valores negativos para la dimensión dos se localizaron las variedades locales, aunque de nuevo había separación de los grupos de locales a lo largo de la dimensión 1. Con valores más negativos se situaron las accesiones silvestres y según se desplazaba hacia valores positivos de la dimensión 1 aparecían los diferentes ecotipos.

A nivel de origen geográfico se observó una mayor similitud, para todos los tipos de cultivo, entre las accesiones de origen asiático, europeo y americano. Ligeramente más distanciados a nivel genético se encontraron los grupos con accesiones de origen africano y, por último, probablemente debido a un aislamiento geográfico, los grupos con mayor distancia genética respecto al resto fueron los procedentes de Oceanía.

El escalamiento multidimensional no reduce las variables ni la información como PCA y cada agrupación es independiente a diferencia del método UPGMA, permite establecer la distribución de los grupos definidos en una muestra en las dimensiones seleccionadas. La aplicación de este tipo de análisis se fundamenta en otro trabajo de diversidad genética realizado en guisante (Smykal *et al.*, 2008a).

Los resultados obtenidos mostraron como principal criterio de separación en el espacio bidimensional la pertenencia a diferentes taxones, del mismo modo que se pudo apreciar la distribución separada de las accesiones de *P. sativum* de diferentes tipos, así como la distribución en función del color de la flor. Se detectó una tendencia de distribución de los cultivares en función de su origen geográfico, sin embargo esta distribución estaba subyugada al resto de criterios de separación.

Por tanto, los múltiples análisis realizados, confirmados por el escalamiento multidimensional, muestran la clara separación de los taxones *P. abyssinicum* y *P. fulvum*, la distribución entre ambos de *P. elatius*, la presencia de *P. jomardii* y *P. asiaticum* como taxones independientes relacionados con origen asiático y más cercanos a los taxones anteriores que a *P. sativum*. Dentro de *P. sativum*, los grupos más divergentes son los ecotipos, las accesiones silvestres y las variedades locales. Dentro de los cultivares y las variedades comerciales hay una distribución en función de caracteres morfológicos, concretamente el color de la flor y, en función de esta primera distribución, se separan en varios núcleos geográficos: Asia-Europa-América, África y Oceanía.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo en referencia al estudio de la variabilidad genética y el análisis de la genética de poblaciones en el género *Pisum* han abarcado diferentes aspectos de la variabilidad y la diversidad genética. Del mismo modo, la metodología aplicada en referencia al análisis individual de cada tipo de marcador, el análisis global y la aplicación de diferentes métodos estadísticos han permitido realizar una comparativa global entre marcadores y a nivel de estudio de la estructura de la muestra. Los resultados obtenidos han permitido confirmar la estructura en taxones dentro del género *Pisum*, así como establecer con base genética criterios de separación de carácter agronómico y fenotípico a nivel interno del taxón *P. sativum*.

El análisis global de la variabilidad genética encontrada en este trabajo está marcado por los elevados valores de variabilidad dentro del género *Pisum*, como especie alógama, y su distribución predominantemente entre grupos.

Todos los análisis realizados confirman la separación de los taxones *P. abyssinicum* y *P. fulvum* como los taxones más alejados dentro del género (Polans y Saar, 2000; Knox y Ellis, 2001; Vershinin *et al.*, 2003; Kosterin y Bogdanova, 2008; Nasiri *et al.*, 2009; Jing *et al.*, 2010 y Martin-Sanz *et al.*, 2011), así

como la posición intermedia de *P. elatius* y *P. humile* sugiere como correcta la afirmación de Ellis *et al.*, (1998) que los considera a ambos como el eje central para la domesticación dentro del género.

A nivel taxonómico, este trabajo aporta la distinción entre los taxones basada en el origen asiático de los mismos frente a otros. De esta forma, taxones como *P. asiaticum* o *P. jomardii* se sitúan cercanos a accesiones *P. elatius* con el mismo origen asiático y claramente distanciadas genéticamente de otros taxones.

Además, la clasificación a nivel genético del taxón *P. sativum* ha mostrado una falta de concordancia en una estructura basada únicamente en el origen geográfico. Los análisis realizados han permitido determinar la importancia del tipo de cada accesión de guisante en su variabilidad, quedando en segundo plano el origen geográfico, aún por detrás de caracteres morfológicos como el color de la flor.

Por último, a nivel de marcadores moleculares los resultados reflejan la diferente variabilidad mediada por cada tipo de marcador en función de la secuencia amplificada. En este sentido, nuestros resultados sustentan la idea del empleo de RBIP para estudios filogenéticos a nivel del género *Pisum*, mientras que los marcadores SSR y GTM resultan más útiles a nivel de especie. No obstante, los análisis globales demuestran que la utilización conjunta de varios tipos de marcadores ofrece una información más completa a nivel tanto de variabilidad y diversidad genéticas como en el estudio de la genética de poblaciones.

2. Mapeo genético y análisis de QTL de caracteres agronómicos y asociados a tolerancia a heladas

2. 1. Mapas de ligamiento

Mapa de ligamiento de la población “ZP-1366 x Cheyenne”

La selección de marcadores se realizó a partir de los resultados obtenidos para los parentales dentro del estudio de diversidad. Partiendo de un total de 73 marcadores moleculares y 3 caracteres morfológicos, 9 marcadores moleculares no ofrecieron ratios de segregación óptimos en base a los resultados del estadístico χ^2 y fueron eliminados previamente al proceso de construcción del mapa de ligamiento, por tanto el 87,67% de los marcadores analizados obtuvieron los ratios de segregación esperados. Tras la construcción del mapa de ligamiento a partir de los 64 marcadores moleculares y los 3 caracteres morfológicos (*A*, *Af* y *Le*), 5 marcadores no pudieron ser anclados al mapa al no mostrar ligamiento con otros marcadores. Se construyó un mapa de ligamiento con el 92,54% de los marcadores que mostraron ratios de segregación óptimos.

El mapa de ligamiento de guisante construido a partir de la progenie del cruzamiento de “Cheyenne” x “ZP-1366”, PopESP, se muestra en el Figura IV.28. El mapa obtenido consistió en 9 grupos de ligamiento, siete (LG1-LG7) correspondientes a los grupos de ligamiento definidos en trabajos anteriormente publicados (Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006) a partir del mapa consenso, correspondiendo los números romanos a los grupos de ligamiento descritos por Weeden *et al.*, (1996; 1998). Otros dos grupos de ligamiento se incluyeron en el mapa sin identificar (LGa y LGb) al no encontrar correspondencia con alguno de los siete grupos de ligamiento ya definidos. La longitud total del mapa fue 1187,9 cM.

En total el mapa obtenido constó de un total de 59 *loci*: 4 caracteres morfológicos, y 55 correspondientes a marcadores moleculares. Entre los 55 marcadores moleculares situados dentro de este mapa de ligamiento, se han anclado un total de 45 SSR, 6 RBIP, 2 CAP, 1 Size y 1 STS.

Mapa de Ligamiento Cheyenne x ZP-1366

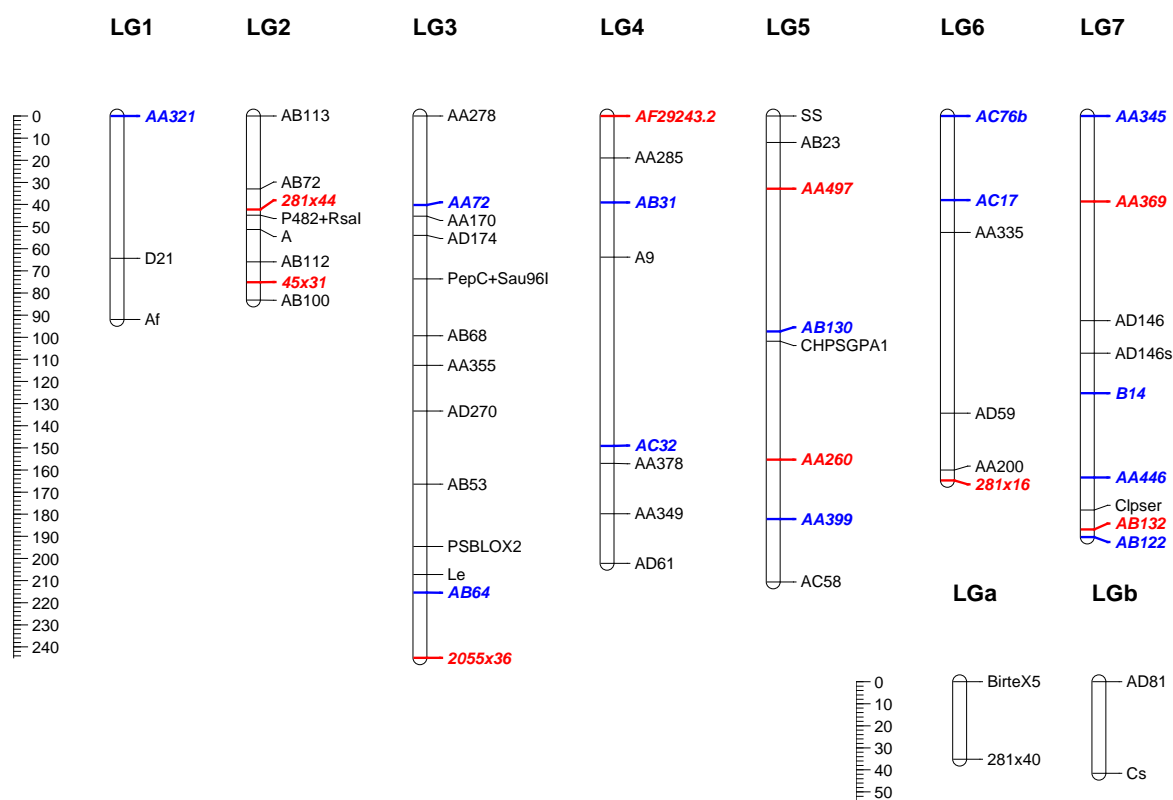


Figura IV.28. Mapa de ligamiento de la población PopESP

Dentro del mapa, los *loci* anclados al grupo de ligamiento LG1 incluyeron a un marcador clásico, *Af* y dos SSR, *AA321* y *D21*. Tanto *AA321* como *Af* permitieron determinar que este grupo se correspondía con el LGI definido por previamente en otros trabajos (Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006), mientras que *D21* confirmaba su situación en este grupo de ligamiento, ya que había sido mapeado previamente en una de las poblaciones analizadas por Loridon *et al.* (2005) pero no se ha encontrado más referencias acerca de su posición.

En el grupo de ligamiento 2, un marcador clásico, *A*, junto con otros marcadores moleculares como *AB100* o el STS *P482*, situados en mapas previos, permitieron determinar la correspondencia de este grupo con LGII. Además se pudieron anclar dos nuevos marcadores, ambos RBIP: *45x31* y *281x44*. El caso de *AB113* es similar al de *AA321*, ya que se mapeo en la Pop3 de Loridon *et al.* (2005) situándose en este grupo de ligamiento, sin embargo no se han encontrado más referencias.

El grupo de ligamiento LG3 se correspondió con LGIII a través de los marcadores moleculares *AB53* o *AD174*. Ambos SSR ya habían sido mapeados en las tres poblaciones estudiadas por Loridon *et al.* (2005) y en el mapa construido por Aubert *et al.* (2006). Se ancló por primera vez el *locus* *2055x36*.

El mapa obtenido en este trabajo confirma las posiciones descritas para los marcadores *AA72* en Pop3, *AB68* y *PSBLOX2* en Pop1 definidas en los trabajos de Loridon *et al.* (2005) y de Aubert *et al.* (2006). En este último trabajo, tanto para los dos últimos marcadores mencionados (*AB68* y *PSBLOX2*), como para *AA355*, las posiciones relativas coinciden, aunque en para este último marcador los autores encontraron distorsión en su segregación. En el presente trabajo la segregación encontrada para este marcador *AA355* en la población PopESP no mostró distorsión, permitiendo corroborar su posición dentro de este grupo de ligamiento. Otro caso a mencionar es *AB64*, que si bien se ha descrito su posición dentro de LGIII en los mapas publicados por los autores antes mencionados, en el caso de Loridon *et al.*, (2005), aparece anclado al LGIV en una de las poblaciones.

Los microsatélites *A9* y *AD61* mapeados en varias poblaciones por otros autores permitieron identificar a LG4 con LGIV y así anclar por primera vez a *AF29243.2* en este grupo de ligamiento. De nuevo los resultados obtenidos para marcadores como *AA378*, *AB31* y *AA349* están en la línea de los obtenidos por otros autores en alguna de sus poblaciones analizadas. En cuanto a *AA285*, resultó mostrar distorsión en su segregación, tanto en los datos mostrados por Aubert *et al.* (2006) como en la Pop1 analizada en Loridon *et al.* (2005). En nuestro trabajo la distorsión de la segregación no fue significativa, al igual que en las poblaciones Pop2 y Pop3 de Loridon *et al.* (2005).

Nuevamente dos microsatélites, *AB23* y *AC58*, permitieron relacionar a LG5 con LGV, incluyéndose en este grupo *AA260*, *AA497* y *CHPSGPA1*, no mapeados previamente. Igualmente permitió anclar a *AB130*, el cual ya había sido fue localizado en este LGV, pero mostrando una desviación de su segregación significativa en trabajos previos.

Un caso especial es el SSR AA399, ya que este marcador fue anclado en dos poblaciones dentro del grupo de ligamiento LGV, tal y como corresponde al LG5 mostrado en la Figura IV.30. Sin embargo, en una de las poblaciones de estudio en Lorida *et al.* (2005) fue situado en el grupo de ligamiento VII. Nuestros resultados confirmarían la hipótesis sobre su localización en el LGV entre los marcadores AA260 y AC58, a 26,9 cM y 28,4 cM, respectivamente, distancia similar (30,2 cM) a la encontrada entre AC58 y AA399 en Aubert *et al.* (2006).

El grupo de ligamiento LGVI se correspondió con LG6 a través de los marcadores AA335 y AD59. En este grupo de ligamiento se ancló por primera vez el marcador 281x16, mientras que los marcadores AC17, mapeado en Pop3, y AC76b, mapeado en Pop2, de Lorida *et al.* (2005) se anclaron en este trabajo en posiciones similares.

Por último, el grupo de ligamiento LGVII fue establecido a partir de LG7 mediante AD146, y se situaron en el mismo AA369 y AB132. Este último SSR, al igual que AA497 en LGV, mostró una correcta segregación en Pop3 pero no fue anclado a ningún grupo de ligamiento por Lorida *et al.* (2005). Estos mismos autores situaron en este grupo de ligamiento los SSR AA345, AA446, AB122 y B14, todos ellos a partir de una de las tres poblaciones dentro de su análisis, Pop3, y nuestros resultados confirman sus posiciones.

En cuanto a LGa y LGb, el primero contenía dos RBIP que no permitieron su relación con ningún grupo de ligamiento previo. Por su parte, LGb muestra el ligamiento entre un SSR y un marcador clásico previamente anclados a LGII. El microsatélite AD81 ha sido mapeado previamente en la población Pop3 de Lorida *et al.* (2005) y situado en el grupo de ligamiento II de su mapa consenso, mientras que Cs aparece ligado a este mismo grupo en varias publicaciones (Ellis *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1997; Weeden *et al.*, 1998). Sin embargo, Cs no ha podido situarse dentro del mapa correspondiente a PopESP por falta de marcadores puente que permitan localizarlos dentro del orden de marcadores correspondientes a LGII. Este marcador formaría parte del LGII aunque no se ha podido anclar de forma directa a dicho grupo de ligamiento, de forma que LGb se correspondería con un segmento de LGII: LG2b.

Del total de los 59 marcadores anclados al mapa, 13 SSR ya habían sido anclados por otros autores (Lorida *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006) a los mismos grupos de ligamiento a los que se muestran en este trabajo. Sin embargo, no habían sido situados en la composición final de su trabajo ya que sólo los consiguieron anclar en una de las tres poblaciones evaluadas. Los marcadores en esta situación y la localización de los mismos en relación a nuestros resultados se muestran en azul en la Figura IV.30. Se pudieron anclar otros 9 marcadores moleculares al mapa de ligamiento en este cruzamiento que no habían sido anclados anteriormente. De estos 9 marcadores, se anclaron 4 RBIP y 5 SSR tal como se muestran destacados en rojo en la Figura IV.30. El resto de marcadores moleculares, 37, ya han sido anclados en diversos mapas publicados previamente.

Mapa de ligamiento de la población “Terese x Champagne”

En base a los resultados obtenidos para los parentales Terese y Champagne dentro del estudio de diversidad se seleccionaron un total de 48 marcadores moleculares y 4 caracteres morfológicos (*A*, *Af*, *Cs* y *PI*). El 98,08% de los marcadores seleccionados segregaron correctamente y fueron incluidos en la construcción del mapa de ligamiento. Todos los marcadores analizados para su mapeo fueron anclados a alguno de los grupos de ligamiento obtenidos durante la construcción del mapa.

El mapa de ligamiento obtenido para PopFRA se muestra en la Figura IV.29. En azul se destacan los marcadores que no han sido situados en ningún mapa de ligamiento publicado, pero de los que hay referencia sobre su posible ubicación en trabajos preliminares realizados por otros autores. En rojo se indican los marcadores anclados por primera vez a algún grupo de ligamiento y situados en el mapa según los resultados obtenidos para esta población concreta. La longitud total de este mapa es de 1379 cM a lo largo de los cuáles se sitúan un total de 47 marcadores; 43 de ellos moleculares y 4 rasgos morfológicos.

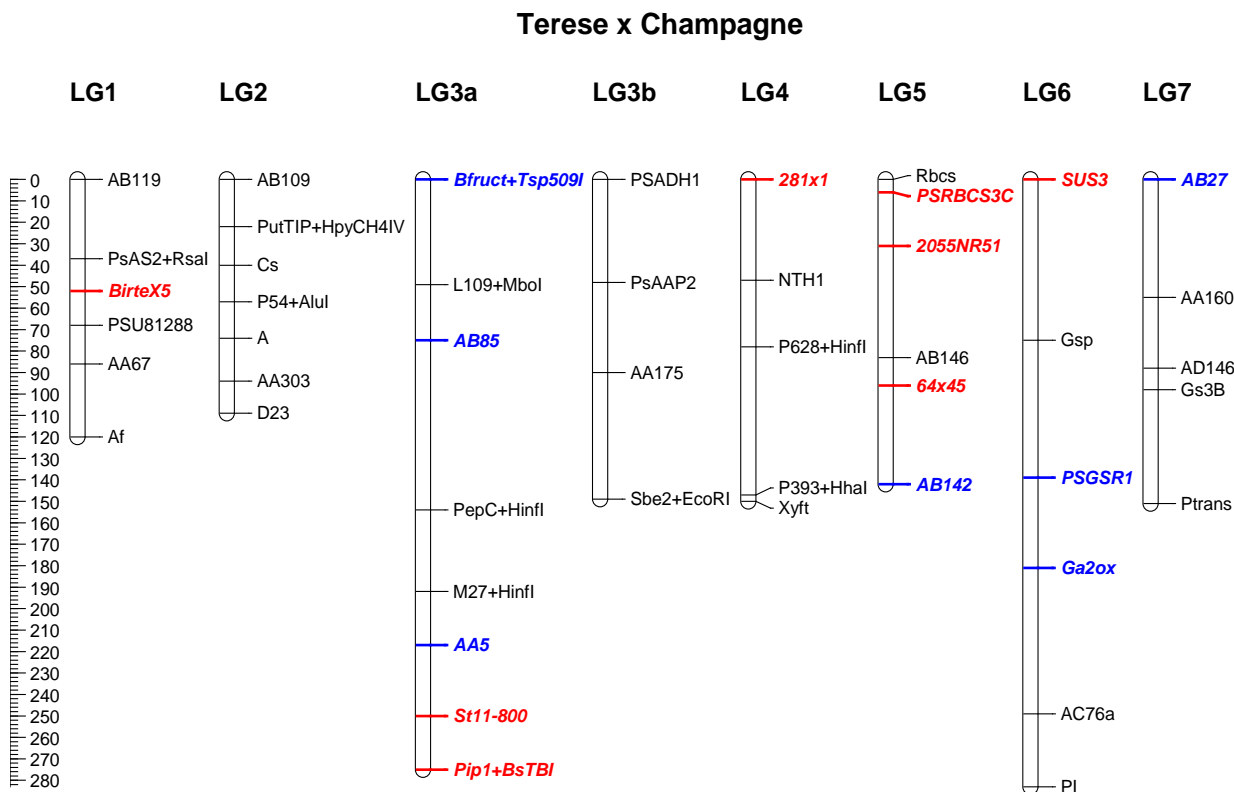


Figura IV.29. Mapa de ligamiento de la población PopFRA

El microsatélite *PSU81288* junto con el marcador morfológico *Af* permitieron establecer que LG1 se correspondía con LG1. En este grupo de ligamiento aparece integrado el RBIP *BirteX5*, permitiendo situar por primera vez este RBIP dentro del mapa genético de guisante, y a su vez, establecer la correspondencia entre LGa de PopESP con LG1 y anclar también en el mapa a un segundo RBIP, *281x40*. Ambos se situaron en una posición relativa gracias a *Af* que, al mapear en ambas poblaciones, ejerció un papel como

marcador puente.

El grupo de ligamiento LG2 se estableció como LGII a través de los marcadores clásicos *A* y *Cs* junto con el microsatélite *D23*, empleados como marcadores puente.

LG3a y LG3b, a partir de *PepC* para el primer grupo y *AA175* para el segundo, fueron relacionados con el LGIII. Por primera vez se ha situado en este grupo de ligamiento el CAP *Pip1* y se confirmó la localización de *AA5*, mapeado en Pop3 de Loridon *et al.* (2005) aunque con distorsión en su segregación. El microsatélite *AB85* fue mapeado sólo en una de las tres poblaciones evaluadas por los mismos autores (Loridon *et al.*, 2005), y también ha sido anclado en nuestro mapa. Por último, *Bfruct*, que mostraba distorsión en su segregación en los trabajos de Aubert *et al.* (2006), y que fue incluido en el mapa publicado por Deulvot *et al.* (2010), ha sido anclado en nuestra población PopFRA dentro de LG3a. Otro marcador anclado en este mapa ha sido el STS *sT11-800*, en el mismo grupo de ligamiento que el mencionado Timmerman-Vaughan *et al.* (1993).

El grupo LGIV fue establecido a partir del STS *P393*, previamente anclado a este grupo de ligamiento por varios autores (Gilpin *et al.*, 1997; Weeden *et al.*, 1998; Deulvot *et al.*, 2010), y presente en LG4, al igual que el RBIP *281x1*, de forma que se sitúa este marcador por primera vez en el mapa de guisante.

A través de *Rbcs* se identificó a LG5 como LGV y se anclaron los RBIP *2055NR51* y *64x45*, del mismo modo que se comprobó la correspondencia de *AB142* y *AB146* con las posiciones obtenidas en la población Pop3 de Loridon *et al.* (2005). Se confirmó también la posición de *PSRBCS3C* mencionada por Pilet-Nayel (comunicación personal en Loridon *et al.*, 2005).

Los marcadores *Gsp* y *PI* permitieron identificar a LG6 como LGVI y, aunque no se incorporó ningún marcador nuevo, se pudo confirmar que *Ga2ox*, que mostraba distorsión en su segregación según Aubert *et al.* (2006), segregaba correctamente en PopFRA y se situaba en el mismo LGVI, tal y como confirman también los resultados de Deulvot *et al.* (2010). El caso del SSR *PSGSRI* es similar al de *PSADH1* en LGIII, ya que se localiza en LGVI según Pilet-Nayel (comunicación personal en Loridon *et al.*, 2005) pero no se han encontrado referencias posteriores.

Finalmente se estableció que LG7 correspondía a LGVII gracias a la presencia de *AA160* y *AD146* en este grupo de ligamiento. En este grupo no se ancló ningún marcador nuevo aunque, nuevamente, *AB27* se correspondía con un SSR mapeado en Pop3 e incluido en el mapa consenso publicado por Loridon *et al.* (2005) pero del que no se encontraron más referencias.

En esta población se han obtenido un total de 8 grupos de ligamiento. Al comparar el conjunto de marcadores que constituía cada grupo de ligamiento obtenido con otros mapas publicados con anterioridad (Gilpin *et al.*, 1997; Weeden *et al.*, 1998; Kaló *et al.*, 2004; Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006; Deulvot *et al.*, 2010) se han podido corresponder con los 7 grupos de ligamiento definidos para

esta especie y, en los cuales los grupos de ligamiento LG3a y LG3b corresponden con dos regiones diferentes del LGIII.

En este caso se confirman los resultados de mapeo de trabajos previos para un total siete marcadores: cinco SSR, un Size (*Ga2ox*) y un CAP (*Bfruct*) situándolos en el mapa de ligamiento correspondiente a PopFRA. Se han anclado por primera vez ocho marcadores: 4 RBIP (*BirteX5* en LG1, *281x1* en LG4 y *2055NR51* junto con *64x45* en LG5), 1 SSR (*PSRBCS3C* en LG5) y 3 GTM (*sT11-800* y *Pip* en LG3 y *SUS3* en LG6).

Mapa de ligamiento de la población “Medora x Melrose”

Al igual que en las dos poblaciones anteriores los marcadores utilizados para mapear la población PopUSA fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos para los parentales, Medora y Melrose, durante el estudio de diversidad genética realizado previamente. En total se seleccionaron 68 marcadores moleculares y 3 rasgos morfológicos (*A*, *Af* y *Le*). Tras el análisis de la segregación de los ratios se comprobó que 7 de ellos presentaban distorsión en su segregación y, por tanto, fueron eliminados del estudio de ligamiento. La construcción del mapa se realizó en base al 90,14% de los marcadores seleccionados previamente.

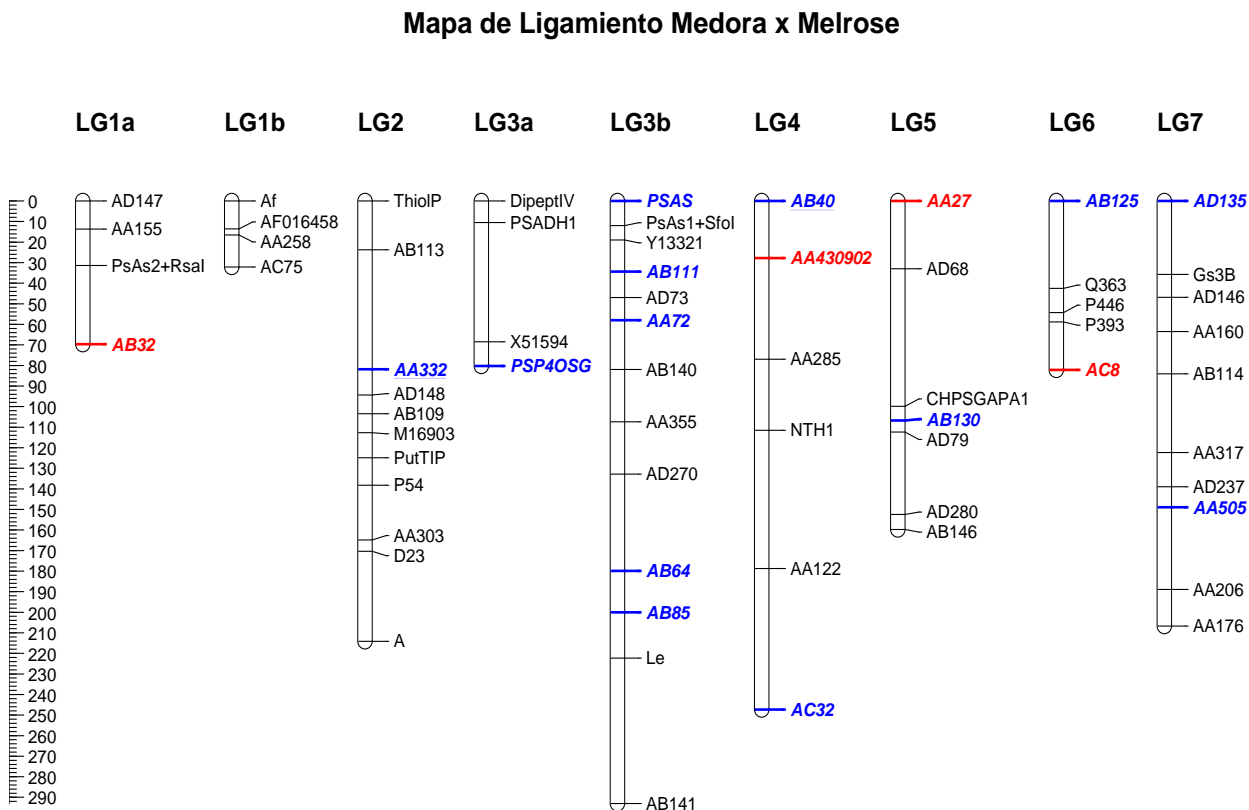


Figura IV.30. Mapa de ligamiento de la población PopUSA

En la Figura IV.30 se muestra el último de los mapas de ligamiento, obtenido a partir de la población

PopUSA. La longitud del mapa es 1385,2 cM y contiene 64 marcadores, 3 de ellos correspondientes a rasgos morfológicos. Nuevamente, los marcadores, en este caso todos SSR, resaltados en azul corresponden a marcadores moleculares previamente anclados a los grupos de ligamiento mostrados en nuestros resultados, pero no presentados en ningún mapa publicado previamente. Estos SSR cuya posición ha sido confirmada en este trabajo son un total de 13, aunque cuatro de ellos ya han sido mapeados en alguna de las otras dos poblaciones analizadas en nuestro estudio. La construcción del mapa sobre los datos de PopUSA ha permitido anclar cuatro SSR que no se muestran en otros mapas ya publicados y que se destacan en rojo en la Figura IV.30.

En este caso los marcadores *AD147* y *Af* se emplearon como puente para identificar LG1a y LG1b como las regiones superior e inferior de LGI respectivamente. Esta identificación permitió anclar por primera vez a *AB32* en la región superior de LGI.

El grupo de ligamiento LG2 se identificó como LGII gracias a los marcadores *A* y *D23*. El marcador *AA303*, que había sido previamente mapeado en PopFRA, volvió a ser incluido en este grupo de ligamiento en PopUSA confirmando los resultados obtenidos en el mapa de ligamiento correspondiente a PopFRA. Del mismo modo, los microsatélites *AA332* y *AD148* que, tanto para la Pop2 de Lorigon *et al.* (2005) como en el mapa descrito por Aubert *et al.* (2006), mostraron distorsión en su segregación, fueron localizados en posiciones similares dentro de este mismo grupo de ligamiento en nuestro estudio, sin presentar distorsión y confirmando la posición descrita para *AD148* en Fondevilla *et al.* (2011b).

Los grupos LG3a y LG3b fueron asignados como regiones diferentes dentro de LGIII a través de los marcadores puente *DipeptIV* y *Le* respectivamente. En este grupo de ligamiento no se han anclado por primera vez marcadores, aunque si se ha confirmado la situación de *AB111* y *AB141* con respecto a Pop3 en Lorigon *et al.* (2005), *AA72* y *AB85* mapeados en la misma población y ya confirmados por los resultados en las poblaciones PopESP y PopFRA de este trabajo, respectivamente.

Otros dos SSR (*PSAS* y *PSP4OSG*) corresponden a marcadores referenciados en Lorigon *et al.* (2005) como mapeados en este mismo grupo LGIII según Pilet-Nayel (comunicación personal en Lorigon *et al.*, 2005). El caso de distorsión en la segregación en *AA355* y la asignación a otros grupos de ligamiento para *AB64* mencionados en el apartado referente al mapa para PopESP ([Apartado IV.2.1.1](#)) vuelven a mostrar en esta población correcta segregación y con un LOD > 3 en su ligamiento.

El marcador *AA122* permitió establecer la correspondencia entre LG4 y LGIV. El SSR *AA430902* fue anclado por primera vez al mapa de guisante en este grupo de ligamiento, mientras que *AA285* mostró ratios de segregación correctos en esta población a diferencia de los ratios obtenidos según Lorigon *et al.* (2005) y Aubert *et al.* (2006).

En este grupo de ligamiento aparece el microsatélite *AB40*, el cual había sido previamente mapeado

por Loridon *et al.* (2005) y Aubert *et al.* (2006), coincidiendo en ambos casos con su situación en LGII en vez de LGIV. Sin embargo, a pesar de la discrepancia que pudiera parecer existente entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores, hay que señalar que Loridon *et al.* (2005) sitúan en el mapa consenso este marcador en LGII pero con respecto a su población de mapeo Pop3 el mismo marcador mapeó en LGVII. Por tanto, la posición de este marcador presenta discrepancias a lo largo de la bibliografía revisada y las poblaciones analizadas.

Los microsatélites incluidos en LGV por Aubert *et al.* (2006), *AB146* y *AD280*, sirvieron de puente para identificar a LG5 como LGV y así anclar por primera vez otro microsatélite: *AA27*. Asimismo se logró confirmar el anclaje del SSR *CHPSGAP1* a este grupo, obtenido en el mapa correspondiente a PopESP. En cuanto a la distorsión en la segregación mostrada por *AB130* y *AD79* en las publicaciones mencionadas previamente, ambos marcadores mostraron correctas segregaciones en la población PopUSA evaluada en este trabajo.

El grupo LG6 se correspondió con LGVI a través de los STS *P446* y *Q141*, y permitió anclar al SSR *AC8*, que si bien había sido seleccionado por Loridon *et al.* (2005), no había podido asignarse a ningún grupo de ligamiento. Una nueva discrepancia apareció en este caso, en la cual *Q363* había sido previamente asignado a LGIA/II por Aubert *et al.* (2006) y del que no se han encontrado otras referencias bibliográficas.

El último grupo, LG7, fue identificado gracias a la presencia de *AA160* y *AD146*. Este último SSR ya había sido mapeado en las poblaciones PopESP y PopFRA de este estudio. Los microsatélites *AA317* y *AA505* mostraron la segregación esperada dentro de la población PopUSA, a diferencia de la distorsión encontrada en las poblaciones a estudio de otras publicaciones (Loridon *et al.*, 2005y Aubert *et al.*, 2006). Los microsatélites *AA176* y *AD135* han sido mapeados en alguna de las tres poblaciones mapeadas por Loridon *et al.* (2005) y no en todas, por los que no fueron incluidos en el mapa final publicado. Nuestros resultados confirman la situación de estos tres marcadores en LGVII.

Construcción de un mapa compuesto de las tres poblaciones

A partir de los resultados obtenidos para las tres poblaciones evaluadas, y en función de los mapas previamente publicados para guisante, se construyó un mapa compuesto que permitiera observar la situación de los nuevos marcadores ligados y comprobar los marcadores homólogos entre las tres poblaciones. El mapa resultante se muestra en la Figura IV.31, en la cual se destacan en verde los marcadores homólogos entre poblaciones. Estos marcadores han facilitado la comparación entre mapas y permiten la construcción de un mapa compuesto del modo en que han jugado el papel de marcadores puente entre los tres mapas parciales obtenidos en este trabajo.

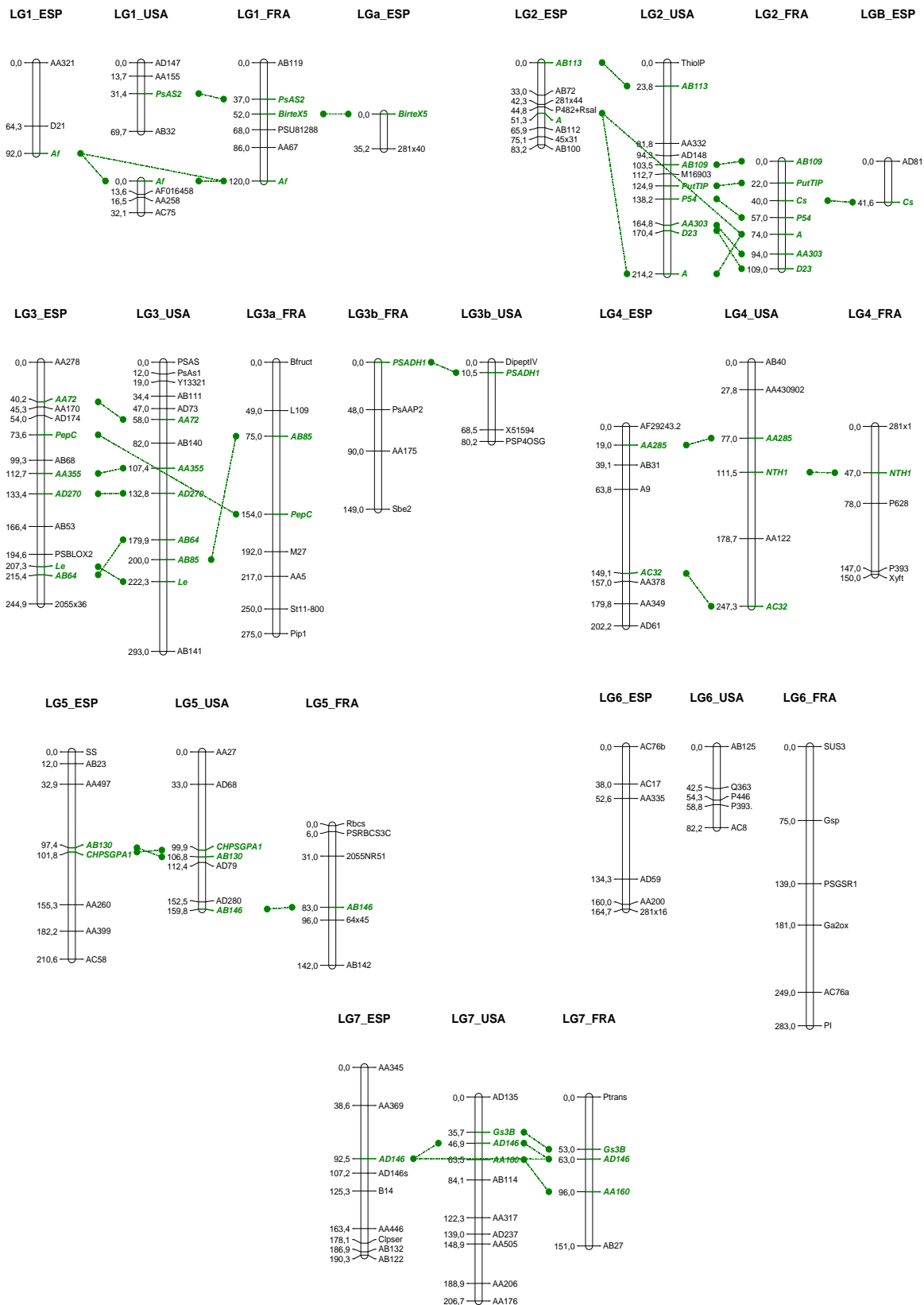


Figura IV.31. Mapa compuesto de las tres poblaciones obtenido a través de marcadores puente

Los resultados obtenidos para el mapa compuesto muestran la presencia de un total de 28 *loci* homólogos, o marcadores puente, 3 de ellos presentes en las tres poblaciones: los rasgos morfológicos *Af*, *A* y un SSR, *AD146*. Los *loci* homólogos se encuentran distribuidos a lo largo de todos los grupos de ligamiento, a excepción del LGVI, el cual no presenta homología entre los *loci* de ninguna de las poblaciones evaluadas.

A través de los marcadores puente se han podido asignar a los grupos de ligamiento I y II los dos grupos LGa y LGb definidos en PopESP. Se estableció un puente de unión entre *BirteX5*, presente en LGa y LGI en PopFRA, y otro puente de unión entre *Cs*, anclado a LGb, con el obtenido en LGII de PopFRA. Gracias a estas uniones se ha confirmado la posición de *AD81* en LGII y se ha anclado por primera vez *281x40* a LGI.

También se ha podido comprobar que el orden de los marcadores dentro de los grupos de ligamiento obtenidos para las diferentes poblaciones se mantuvo en la mayoría de los casos, a excepción de *AB64* y *Le* en LGIII de PopESP y PopUSA y entre *AB130* y *CHPSGPA1* en LGV en las mismas poblaciones. El orden entre *AB64* y *Le* de PopESP coincidió con el definido por Aubert *et al.* (2006), mientras que, en el caso de LGV no hay referencias del orden ya que aunque *AB130* ha sido incluido en el mapa desarrollado por Aubert *et al.* (2006), éste presentó distorsión en su segregación y *CHPSGPA1* no había sido incluido en ningún mapa hasta el momento.

El resto de los marcadores anclados al mapa compuesto mantuvieron el orden entre poblaciones. También mostraron un orden y un distanciamiento similar entre ellos en comparación con la bibliografía revisada y mencionada anteriormente.

A partir del mapa compuesto y de la bibliografía consultada se relacionaron entre sí todos los marcadores mapeados en cada una de las poblaciones. Igualmente, se ha relacionado la presencia de los marcadores anclados en nuestro estudio con su presencia en mapas publicados previamente. También se han analizado las coincidencias con los resultados obtenidos en este trabajo y las posibles discrepancias o problemas relacionados con la segregación o en el ligamiento final al mapa, descritas por los autores de cada uno de los mapas de guisante disponibles. Con los resultados de estas relaciones y comparaciones se construyó la Tabla IV.16.

Con respecto a la evaluación global de los marcadores anclados en el mapa compuesto, cabe destacar que se ha confirmado el grupo de ligamiento al que pertenecen un total de 29 marcadores moleculares. Tres de ellos se ha confirmado su situación en dos poblaciones y se han situado *de novo* otros 21 marcadores moleculares.

Tabla IV.16. Referencias de ligamiento de cada uno de los marcadores mapeados en este trabajo

LG	Marcador	Tipo	Este trabajo			Ref A			Ref B	Ref C	Ref D	Ref E
			PopESP	PopFRA	PopUSA	Pop1	Pop2	Pop3				
I	<i>281x40</i>	RBIP	LGI									
	<i>AA67</i>	SSR		LGI				LGI				LGI ⁹
	<i>AA155</i>	SSR			LGI							LGI ⁹
	<i>AA258</i>	SSR			LGI		LGI	LGI	LGI			
	<i>AA321</i>	SSR	LGI						LGI			
	<i>AB32</i>	SSR			LGI							
	<i>AB119</i>	SSR		LGI					LGI			
	<i>AC75</i>	SSR			LGI		LGI		LGI			
	<i>AD147</i>	SSR			LGI	LGI	LGI	LGI	LGI			
	<i>Af</i>	Morf.	LGI	LGI	LGI	LGI			LGI			LGI ^{2,5}
	<i>AF016458</i>	SSR			LGI	LGI			LGI			
	<i>BirteX5</i>	RBIP	LGI	LGI								
	<i>D21</i>	SSR	LGI			LGI	LGI	LGI	LGI			LGI ⁹
	<i>PSAS2</i>	CAP		LGI	LGI				LGI			
<i>PSU81288</i>	SSR		LGI		LGI	LGI		LGI				
II	<i>45x31</i>	RBIP	LGII									
	<i>281x44</i>	RBIP	LGII									
	<i>A</i>	Morf.	LGII	LGII	LGII	LGII			LGII			LGII ^{1,2,5,9}
	<i>AA303</i>	SSR		LGII	LGII							
	<i>AA332</i>	SSR			LGII	LGII	LGII ^{**}	LGII	LGII ^{**}			
	<i>AB72</i>	SSR	LGII				LGII		LGII			
	<i>AB100</i>	SSR	LGII			LGII	LGII		LGII			LGII ⁹
	<i>AB109</i>	SSR		LGII	LGII			LGII				LGII ⁹
	<i>AB112</i>	SSR	LGII									
	<i>AD81</i>	SSR	LGII					LGII				
	<i>AB113</i>	SSR	LGII		LGII			LGII				
	<i>AD148</i>	SSR			LGII	LGII	LGII ^{**}		LGII ^{**}			
	<i>Cs</i>	Morf.	LGII	LGII								LGII ^{2,5,6}
	<i>D23</i>	SSR		LGII	LGII	LGII	LGII		LGII			LGII ⁹
	<i>M16903</i>	SSR			LGII							LGII ⁷
	<i>P482</i>	STS	LGII							LGII		LGII ⁹
	<i>P54</i>	CAP		LGII	LGII				LGII			
<i>PutTIP</i>	CAP		LGII	LGII				LGII		LGII		
<i>ThiolP</i>	CAP			LGII				LGII				
III	<i>2055x36</i>	RBIP	LGIII									
	<i>AA5</i>	SSR		LGIII				LGIII [*]				LGIII ⁹
	<i>AA72</i>	SSR	LGIII		LGIII			LGIII				
	<i>AA170</i>	SSR	LGIII									LGIII ⁹
	<i>AA175</i>	SSR		LGIII			LGIII		LGIII			LGIII ⁹
	<i>AA278</i>	SSR	LGIII				LGIII	LGIII	LGIII			
	<i>AA355</i>	SSR	LGIII		LGIII	LGIII	LGIII		LGIII [*]			
	<i>AB53</i>	SSR	LGIII			LGIII	LGIII	LGIII	LGIII			
	<i>AB64</i>	SSR	LGIII		LGIII	LGIII	LGIII	LGIII	LGIII			LGIII ⁹
	<i>AB68</i>	SSR	LGIII			LGIII			LGIII			
	<i>AB85</i>	SSR		LGIII	LGIII			LGIII				
	<i>AB111</i>	SSR			LGIII			LGIII				
	<i>AB140</i>	SSR			LGIII	LGIII	LGIII		LGIII			LGIII ⁹
	<i>AB141</i>	SSR			LGIII			LGIII				LGIII ⁹
	<i>AD73</i>	SSR			LGIII	LGIII	LGIII	LGIII				
	<i>AD174</i>	SSR	LGIII			LGIII	LGIII	LGIII	LGIII			LGIII ⁹
	<i>AD270</i>	SSR	LGIII		LGIII	LGIII	LGIII		LGIII			
	<i>Bfruct</i>	CAP		LGIII					LGIII ^{**}		LGIII	
	<i>DipeptIV</i>	CAP			LGIII				LGIII		LGIII	
	<i>L109</i>	STS		LGIII						LGIII		
<i>Le</i>	Morf.	LGIII		LGIII	LGIII			LGIII			LGIII ^{2,5}	

LG	Marcador	Tipo	Este trabajo		Ref A			Ref B	Ref C	Ref D	Ref E
			PopESP	PopFRA	PopUSA	Pop1	Pop2				
	<i>M27</i>	STS		LGIII				LGIII		LGIII ⁹	
	<i>PepC</i>	CAP	LGIII	LGIII			LGIII		LGIII	LGIII ⁶	
	<i>Pip1</i>	CAP		LGIII							
	<i>PsAAP2</i>	CAP		LGIII			LGIII		LGIII		
	<i>PSADH1</i>	SSR		LGIII	LGIII					LGIII ^{8,9}	
	<i>PSAS</i>	SSR			LGIII					LGIII ⁸	
	<i>PSAS1</i>	CAP			LGIII		LGIII				
	<i>PSBLOX2</i>	SSR	LGIII			LGIII	LGIII				
	<i>PSP4OSG</i>	SSR			LGIII					LGIII ⁸	
	<i>Sbe2</i>	CAP		LGIII			LGIII				
	<i>ST11-800</i>	STS		LGIII						LGIII ³	
	<i>X51594</i>	SSR			LGIII					LGIII ⁷	
	<i>Y13321</i>	SSR			LGIII					LGIII ⁷	
IV	<i>281x1</i>	RBIP		LGIV							
	<i>A9</i>	SSR	LGIV				LGIV	LGIV			
	<i>AA122</i>	SSR			LGIV	LGIV	LGIV	LGIV		LGIV ⁹	
	<i>AA285</i>	SSR	LGIV		LGIV	LGIV**	LGIV	LGIV	LGIV**		
	<i>AA349</i>	SSR	LGIV				LGIV	LGIV		LGIV ⁹	
	<i>AA378</i>	SSR	LGIV					LGIV			
	<i>AA430902</i>	SSR			LGIV						
	<i>AB31</i>	SSR	LGIV					LGIV			
	<i>AB40</i>	SSR			LGIV	LGIII		LGIV	LGII		
	<i>AC32</i>	SSR	LGIV		LGIV		LGIV	LGIV			
	<i>AD61</i>	SSR	LGIV			LGIV	LGIV	LGIV			
	<i>AF29243.2</i>	SSR	LGIV								
	<i>NTH1</i>	ASP		LGIV	LGIV			LGIV			
	<i>P393</i>	STS		LGIV					LGIV	LGIV	
	<i>P628</i>	STS		LGIV					LGIV	LGIV ^{6,9}	
	<i>Xyft</i>	Size		LGIV				LGIV		LGIV ⁶	
V	<i>64x45</i>	RBIP		LGV							
	<i>2055NR51</i>	RBIP		LGV							
	<i>AA260</i>	SSR	LGV								
	<i>AA27</i>	SSR			LGIV						
	<i>AA399</i>	SSR	LGV				LGIV	LGIV		LGIV ⁹	
	<i>AA497</i>	SSR	LGV					nl			
	<i>AB23</i>	SSR	LGV			LGIV	LGIV	LGIV		LGIV ⁹	
	<i>AB130</i>	SSR	LGV		LGIV			LGIV***			
	<i>AB142</i>	SSR		LGIV				LGIV			
	<i>AB146</i>	SSR		LGIV	LGIV			LGIV			
	<i>AC58</i>	SSR	LGV				LGIV	LGIV	LGIV		
	<i>AD68</i>	SSR			LGIV					LGIV ⁹	
	<i>AD79</i>	SSR			LGIV	LGIV	LGIV***	LGIV	LGIV***		
	<i>AD280</i>	SSR			LGIV			LGIV		LGIV ⁹	
	<i>CHPSGPA1</i>	SSR	LGV		LGIV						
	<i>PSRBCS3C</i>	SSR		LGIV						LGIV ⁸	
	<i>RbcS</i>	ASP		LGIV				LGIV		LGIV ⁶	
	<i>SS</i>	CAP	LGV					LGIV		LGIV	
VI	<i>281x16</i>	RBIP	LGVI								
	<i>AA200</i>	SSR	LGVI				LGVI	LGVI			
	<i>AA335</i>	SSR	LGVI			LGVI		LGVI	LGVI	LGVI ⁹	
	<i>AB125</i>	SSR			LGVI			LGVI			
	<i>AC8</i>	SSR			LGVI		nl				
	<i>AC17</i>	SSR	LGVI					LGVI			
	<i>AC76a</i>	SSR		LGVI			LGVI	LGVI	LGVI		
	<i>AC76b</i>	SSR	LGVI				LGVI				
	<i>AD59</i>	SSR	LGVI			LGVI	LGVI	LGVI	LGVI		

LG	Marcador	Tipo	Este trabajo			Ref A			Ref B	Ref C	Ref D	Ref E
			PopESP	PopFRA	PopUSA	Pop1	Pop2	Pop3				
	<i>Ga2ox</i>	Size		LGVI				LGVI*		LGVI		
	<i>Gsp</i>	Size		LGVI				LGVI	LGVI		LGVI ^{3,4}	
	<i>P446</i>	STS			LGVI				LGVI			
	<i>PI</i>	Morf.		LGVI		LGVI		LGVI			LGVI ^{2,5}	
	<i>PSGSR1</i>	SSR		LGVI							LGVI ⁸	
	<i>Q141</i>	STS			LGVI				LGVI			
	<i>Q363</i>	STS			LGVI				LGIA/II			
	<i>SUS3</i>	STS		LGVI					LGVI			
VII	<i>AA160</i>	SSR		LGVII	LGVII		LGVII	LGVII	LGVII		LGVII ⁹	
	<i>AA176</i>	SSR			LGVII		LGVII					
	<i>AA206</i>	SSR			LGVII			LGVII	LGVII			
	<i>AA317</i>	SSR			LGVII	LGVII	LGVII**	LGVII	LGVII**		LGVII ⁹	
	<i>AA345</i>	SSR	LGVII					LGVII				
	<i>AA369</i>	SSR	LGVII									
	<i>AA446</i>	SSR	LGVII					LGVII			LGVII ⁹	
	<i>AA505</i>	SSR			LGVII		LGVII**	LGVII				
	<i>AB27</i>	SSR		LGVII				LGVII				
	<i>AB114</i>	SSR			LGVII			LGVII			LGVII ⁹	
	<i>AB122</i>	SSR	LGVII					LGVII				
	<i>AB132</i>	SSR	LGVII					nl				
	<i>AD135</i>	SSR			LGVII			LGVII				
	<i>AD146</i>	SSR	LGVII	LGVII	LGVII	LGVII	LGVII		LGVII			
	<i>AD146s</i>	SSR	LGVII			LGVII	LGVII		LGVII			
	<i>AD237</i>	SSR			LGVII	LGVII		LGVII			LGVII ⁹	
	<i>B14</i>	SSR	LGVII					LGVII				
	<i>Clpser</i>	Size	LGVII						LGVII			
	<i>Gs3B</i>	Size		LGVII	LGVII				LGVII			
	<i>Ptrans</i>	CAP		LGVII					LGVII			

Ref A: Loridon *et al.* (2005); Ref B: Aubert *et al.* (2006); Ref C: Gilpin *et al.* (1997); Ref D: Deulvot *et al.* (2010); Ref E: otros mapas publicados; 1: Lamprecht *et al.* (1952); 2: Ellis *et al.* (1992); 3: Timmerman-Vaughan *et al.* (1993); 4: Weeden *et al.* (1996); 5: Hall *et al.* (1997); 6: Weeden *et al.* (1998); 7: Burstin *et al.* (2001); 8: Pilet-Nayel (comunicación personal en Loridon *et al.*, 2005); 9: Fondevilla *et al.* (2011b); a: no hay coincidencia entre los LG; nl: marcador no ligado; *: distorsión en la segregación significativa al 5%; **: distorsión significativa al 1%; ***: distorsión significativa al 0,1%

Todos los marcadores moleculares cuya situación se ha confirmado han resultado ser SSR, mientras que entre los 21 marcadores moleculares anclados por primera vez, aunque la mayoría hayan sido SSR, también se han anclado otros tipos, entre ellos: 1 CAP (*Pip1*), 1 STS (*sT11-800*), 9 RBIP (*BirteX5*, *45x31*, *64x45*, *281x1*, *281x16*, *281x40*, *281x44*, *2055NR51* y *2055x36*) y los 10 SSR (*AA27*, *AA260*, *AA369*, *AA430902*, *AA497*, *AB132*, *AB32*, *AC8*, *AF29243.2* y *CHPSGPA1*). Todos ellos se han distribuido a lo largo del mapa, localizándose cuatro nuevos marcadores en LGI y LGII, tres en LGIII y LGIV. En LGV se anclaron un mayor número de marcadores, siete, y en LGVI y LGVII dos marcadores en cada uno.

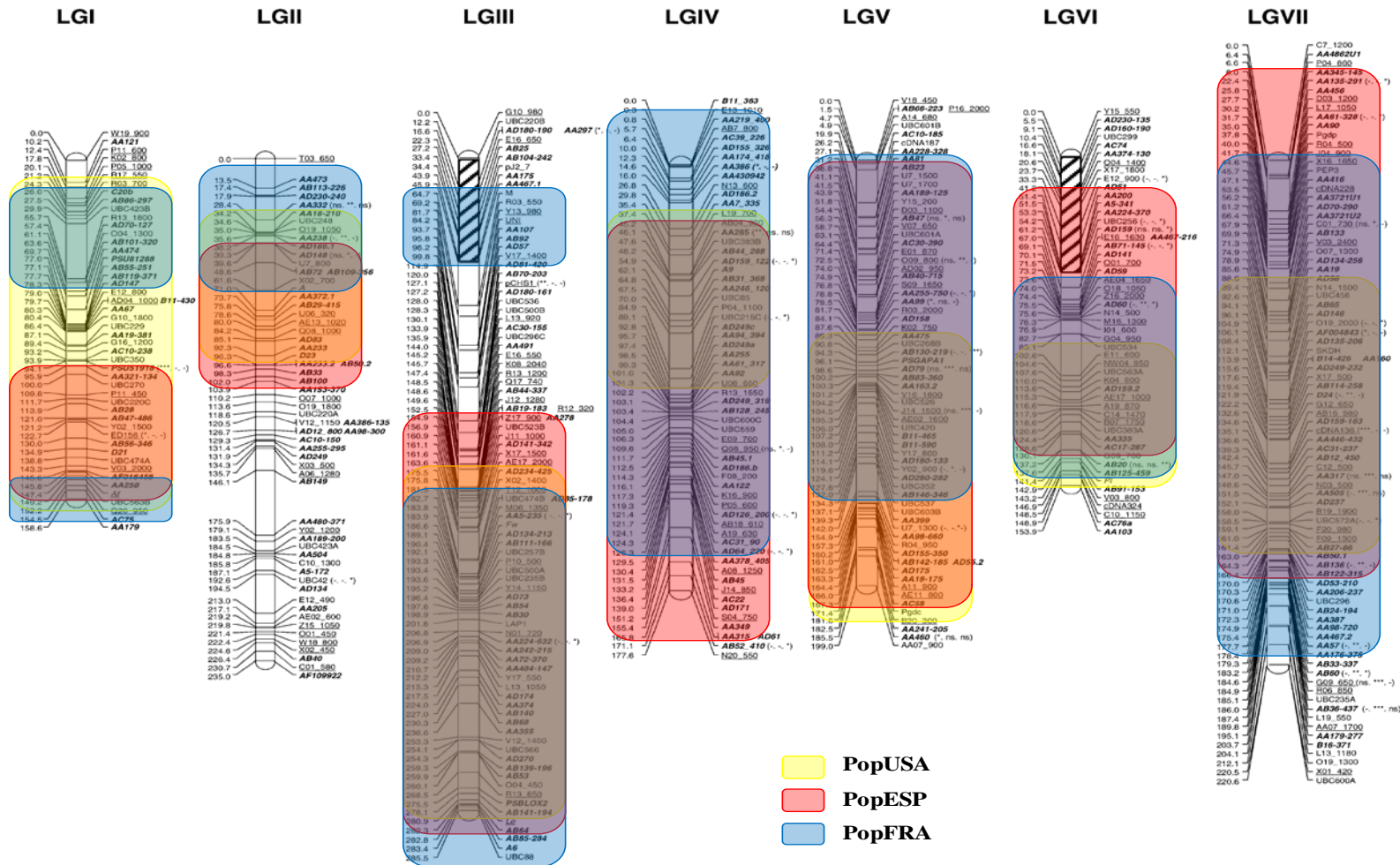


Figura IV.32. Representación gráfica de los mapas obtenidos frente al mapa consenso (Loridon *et al.*, 2005)

Por último, la obtención de este mapa compuesto permitió comprobar la cobertura de los mapas parciales obtenidos para cada una de las poblaciones evaluadas. La comparativa se realizó con respecto a mapas consenso mucho más saturados como el obtenido por Loridon *et al.* (2005). La obtención del mapa compuesto, y su comparación con otros mapas, permitió también establecer las regiones no mapeadas dentro de cada grupo de ligamiento.

Para visualizar la cobertura de nuestros mapas de ligamiento en comparación con otros mapas de ligamiento publicados previamente se realizó una composición basada en los tres mapas de ligamiento obtenidos sobre el mapa consenso publicado por Loridon *et al.* (2005). Esta composición se completó con la información con respecto a los marcadores anclados en la bibliografía revisada y mencionada anteriormente. El resultado de esta representación se muestra en la Figura IV.32.

La composición obtenida ha solapado casi totalmente con el mapa consenso descrito por Loridon *et al.* (2005). No obstante, la región inferior del grupo de ligamiento LGII ha quedado completamente ausente de asociación entre nuestros resultados y el mapa consenso. El número de marcadores ligados a esta región del LGII es muy inferior a la encontrada en otras regiones del mapa presentado por Loridon *et al.* (2005). Igualmente, otros mapas descritos han mostrado también un número reducido de marcadores asociados a esta región (Aubert *et al.*, 2006) o, incluso, han detectado huecos en esta región (Deulvot *et al.*, 2010). Este grupo de ligamiento se corresponde con el cromosoma 6 del genoma de guisante, tal y como se describe en Hall *et al.* (1997) y de acuerdo con lo descrito por Fuchs *et al.* (1998) y Ellis y Poyser (2002), en referencia a la posición del centrómero, se clasifica como acrocéntrico. Teniendo esto en cuenta, la reducción del número de *loci* anclados a esta región puede deberse a la localización en dicha región del centrómero y a un menor porcentaje de recombinaciones en esa zona.

Sólo otra región del mapa consenso presentado por Loridon *et al.* (2005) ha quedado sin asociación con los mapas obtenidos en este trabajo, una región intermedia del LGIII. Al igual que en el caso anterior, la densidad de marcadores asociados a dicha región es menor que la presentada en el resto de grupos de ligamiento. Del mismo modo, la reducción en la densidad de marcadores mapeados en dicha región ocurre en el mapa descrito por Aubert *et al.* (2006). Nuevamente, este grupo de ligamiento, LGIII, se corresponde con el cromosoma 5 descrito por Hall *et al.* (1997) y de acuerdo con Fuchs *et al.* (1998) y Ellis y Poiser (2002) este cromosoma es acrocéntrico. Por tanto, y teniendo en cuenta que el descenso de *loci* asociados a esta región se repite a lo largo de la bibliografía revisada, se plantea nuevamente la hipótesis de que el centrómero este localizado en dicha región.

En resumen, se han obtenido tres mapas de ligamiento correspondientes a tres poblaciones de mapeo basadas en las poblaciones: PopESP, PopFRA y PopUSA. Los mapas parciales obtenidos en este trabajo dan cobertura a la mayor parte del genoma de guisante disponible en la actualidad.

Los tamaños de los mapas obtenidos han ido similares, desde los 1187,9 cM, obtenido para la población PopESP, con un total de 59 marcadores, a los 1379 cM de PopFRA y 1385 cM de PopUSA, con un número de marcadores anclados de 47 y 64, respectivamente.

El objetivo de este trabajo no era tanto el conseguir un mapa consenso altamente saturado a partir de tres poblaciones de mapeo, como el de obtener tres mapas parciales que permitieran comenzar a abordar el estudio de QTL, en consonancia con lo razonado por Irzykowska *et al.* (2001). De forma similar, se han usado previamente mapas parciales para mapeo de QTL en otras leguminosas, como por ejemplo en el caso de caupí (*Vigna unguiculata*) (Menéndez *et al.*, 1997) o de haba (*Vicia faba*) (Vaz Patto *et al.*, 1999).

Para obtener mapas que permitieran el análisis de QTL, y que fueran transferibles y permitiesen cierta extrapolación a otros estudios, en base a los polimorfismos detectados entre los parentales de los tres cruzamientos durante el análisis de diversidad, se han tenido en cuenta marcadores anclados en mapas previamente publicados, como varios de los del tipo SSR (Burstin *et al.*, 2001; Loridon *et al.*, 2005), STS (Gilpin *et al.*, 1997; Timmerman-Vaughan *et al.*, 1993) y otros como CAPS, Size o ASP (Aubert *et al.*, 2006).

Asimismo, y considerar los resultados de diversidad, se incorporaron marcadores RBIP polimórficos, ya definidos con interés potencial en la mejora del guisante (Ellis *et al.*, 1998; Kumar e Hirochika, 2001). Los marcadores basados en retrotransposones, como las secuencias específicas LTR de BARE-1 y PDR1, han sido utilizados para construir mapas de ligamiento en cebada (*Hordeum vulgare*) (Manninen, *et al.*, 2000), avena (*Avena sativa*) (Yu y Wise, 2000) e incluso en el propio guisante (Kumar, *et al.*, 1997; Waugh, *et al.*, 1997). Además su aplicación en la localización de caracteres de importancia agronómica en este cultivo ya ha permitido indagar en diferentes patrones de herencia en la resistencia a bacteriosis ocasionada por *P. syringae* pv. *pisi* (Elvira-Recuenco, 2000).

En todas las poblaciones, los resultados obtenidos permitieron asignar los grupos de ligamiento obtenidos mediante comparación de los mismos con otros mapas publicados anteriormente (Weeden *et al.*, 1998; Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006) a través de marcadores puente, principalmente SSR y , en menor medida marcadores basados en secuencias.

El tamaño del mapa obtenido para PopESP es aproximadamente del mismo tamaño que el publicado por Laucou *et al.* (1998), 1139 cM y casi idéntico en longitud al mapa presentado por Fondevilla *et al.* (2011b). El tamaño de los mapas PopUSA y PopFRA, es muy similar al obtenido por otros autores, como es el caso del mapa consenso de Loridon *et al.* (2005) 1430 cM, (Haldane, 1919) con 229 SSR. El tamaño de nuestros mapas, PopUSA y PopFRA, es similar a otros publicados previamente (Ellis *et al.*, 1992, Gilpin *et al.*, 1997; Hall *et al.* 1997; Pilet-Nayel *et al.*, 2002; Tar'an *et al.*, 2003; Prioul *et al.*, 2004; Aubert *et al.*, 2006). Sin embargo, el tamaño del mapa que hemos

obtenido es menor que el mapa consenso de Weeden *et al.* (1998) de 2416 cM y excede el tamaño predicho para la formación de quiasmas 750 cM (Hall *et al.*, 1997).

Por otra parte, a lo largo del tiempo se han estimado tamaños muy diversos en referencia al mapa de ligamiento de guisante. En este sentido se ha estimado el tamaño de mapa citogenético de guisante en aproximadamente 750 cM (Hall *et al.*, 1997), sin embargo en el mismo trabajo se presentaron dos mapas de ligamiento a partir de RIL de dos cruzamientos diferentes, el primero de 1400 cM, con 129 marcadores (RILs F_{11} de $JI15 \times JI399$) y, el segundo de 2300 cM con 318 marcadores (RILs F_{12} de $JI281 \times JI399$). Este último mapa de ligamiento se corresponde con el mapa de ligamiento de guisante con mayor longitud publicado. En el lado opuesto, uno de los mapas de ligamiento de guisante más pequeño es el presentado por Knox y Ellis (2002) conteniendo 137 SSAP, con 565 cM y a partir de la misma población empleada por Hall *et al.* (1997): RILs F_{11} de $JI15 \times JI399$, en el mismo trabajo estimaron el tamaño del mapa de ligamiento de guisante con el mismo número de marcadores pero en una población F_2 del mismo cruzamiento, obteniendo un mapa de 710 cM. Por tanto, los mapas de ligamiento de guisante obtenidos a partir de una misma población difieren en tamaño según características de la población analizada (generación y número de individuos) y características de los marcadores empleados (tipo de marcadores y número).

El trabajo presentado por Knox y Ellis (2002) enfocado al estudio de la heterocigosidad como causa de la expansión en longitud de los mapas genéticos de guisante muestra las diferencias obtenidas en la longitud de mapas genéticos a partir de una población F_2 y otra RIL (F_{11}) del mismo cruzamiento ($JI15 \times JI399$): 710 cM y 565 cM, respectivamente. Estas diferencias les llevaron a concluir que un exceso de heterocigosidad puede conllevar una expansión del mapa genético, especialmente en poblaciones de mapeo a partir de RILs.

Otro aspecto del estudio publicado por Knox y Ellis (2002) fue la construcción de dos mapas de ligamiento en base a la misma población (RILs F_{11} de $JI15 \times JI399$) y los mismos marcadores (347 entre ellos AFLPs, RFLPs, SSAP y morfológicos) cuya diferencia se basó en el empleo de diferentes programas en la obtención de los mapas: Joinmap (Stam y Van Ooijen, 1995) y Mapmaker (Lander *et al.*, 1987). Ambos programas difieren en el tipo de análisis de ligamiento llevado a cabo. Joinmap se basa en un análisis de ligamiento múltiple en dos puntos (Stam, 1993), mientras que Mapmaker emplea un análisis multipunto en base a tres puntos (Lander *et al.*, 1987). Asimismo difieren en las aproximaciones empleadas para determinar el orden de los marcadores. Joinmap emplea mínimos cuadrados (Stam, 1993) y Mapmaker basa sus aproximaciones en máxima verosimilitud (Lander *et al.*, 1987) empleando el método EM (*Expectation-Maximization*: Dempster *et al.*, 1977; Lander y Green, 1987; Weir, 1996) lo que permite analizar conjuntamente un gran número de *loci*. Los mapas resultantes tuvieron una longitud de 1800 cM en el caso del obtenido mediante Mapmaker, y de 990 cM en el caso del obtenido mediante Joinmap. En ambos casos, todos los marcadores fueron asignados

a los mismos grupos de ligamiento, sin embargo la diferencia de tamaño es clara. En dicho estudio estiman un incremento de la longitud debido a la distorsión de la segregación en los marcadores ejerciendo un exceso de quiasmas entre los grupos de ligamiento. En relación al tamaño del mapa citogenético de guisante de 750 cM (Hall *et al.*, 1997) concluyen que Joinmap permite obtener mapas de ligamiento con un tamaño más próximo al ideal, con la principal diferencia en la reordenación de marcadores para adaptarlos a los eventos de doble recombinación muy próximos entre sí. La obtención de mapas genéticos de ligamiento más cortos mediante Joinmap ha sido mencionado para otras especies como cebada (Qi *et al.*, 1996), *Lycopersicon peruvianum* (Van Ooijen *et al.*, 1994) o melocotón (Dettori *et al.*, 2001).

A pesar de que los mapas obtenidos mediante Joinmap parecen ajustarse mejor al tamaño real del genoma de guisante, los mapas genéticos de ligamiento publicados en guisante han sido obtenidos mediante Mapmaker en gran número (Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006; Deulvot *et al.*, 2010), al igual que predomina en los mapas de ligamiento de guisante obtenidos como paso previo a la localización de QTL asociados a diferentes rasgos (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002; 2004; 2005; Frew *et al.*, 2002; Pilet-Nayel *et al.*, 2002; Tar'an *et al.*, 2003; Prioul *et al.*, 2004; Irzykowska y Woko, 2004; Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008; Barilli *et al.*, 2010; Fondevilla *et al.*, 2011a y b) frente al reducido número de referencias a Joinmap en guisante (Knox y Ellis, 2002; McPhee *et al.*, 2012).

Por tanto, el tamaño estimado de los mapas genéticos de ligamiento dependerá de varios factores, en su mayoría relacionados con la frecuencia de recombinación y la posible presencia de regiones de recombinación. Los tamaños mostrados por los mapas de ligamiento parciales obtenidos en este trabajo son comparables a los obtenidos en otros trabajos empleando el mismo programa, Mapmaker, y por tanto, empleando las mismas aproximaciones en la localización y ordenamiento de los marcadores. Las diferencias más o menos acusadas en los tamaños de los mapas pueden deberse en primer lugar al tipo de población analizada y, en este sentido el tamaño de los mapas puede variar en relación a la diferenciación genética de los parentales, al tipo de cruzamiento y generación de los individuos que integran la población así como su número. Pero también se ha de tener en cuenta que los mapas presentados en este estudio contienen un número limitado de marcadores, mapas parciales, lo que puede afectar al tamaño final así como al posible orden de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento.

No obstante, teniendo en cuenta la presencia de factores que afectan a la estima del tamaño de los mapas de ligamiento, los tres mapas parciales obtenidos (PopESP, PopFRA y PopUSA), a partir de diferentes poblaciones y en base a diferentes tipos de marcadores, todos en un número muy limitado, se corresponden a los mapas de ligamiento de guisante publicados en los últimos años con una saturación mucho más elevada (Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006; Fondevilla *et al.*, 2011b). Esta semejanza en la longitud de los mapas con otros más completos nos sugiere que los mapas parciales

obtenidos en este trabajo podrían poseer una cobertura similar a la de los mapas más saturados disponibles en guisante.

En todos los mapas los marcadores se distribuyeron con distancias medias menores de 30 cM a lo largo de todos los grupos de ligamiento. En caso de separaciones entre marcadores superiores a 50 cM su asignación al grupo de ligamiento correspondiente y el orden dentro del mismo fueron contrastados con mapas previos (Gilpin *et al.*, 1997; Weeden *et al.*, 1998; Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006).

Según lo indicado previamente por Knox y Ellis (2002) sobre la alteración en el orden de marcadores dentro de los grupos de ligamiento entre mapas procedentes de diferentes poblaciones de mapeo se ha comparado el orden de marcadores de nuestros mapas con otros. Con respecto al mapa compuesto obtenido en este trabajo y el orden de marcadores, sí se han encontrado discrepancias. Dichas discrepancias se han encontrado en tres grupos de ligamiento: en LGII entre los marcadores *A*, *AA303* y *D23* entre PopFRA y PopUSA, en LGIII en el orden entre *Le* y *AB64* de PopESP y PopUSA y en LGV entre *AB130* y *CHPSGPA1* en PopESP y PopUSA.

Ellis *et al.* (1992) alertan para el caso de guisante sobre construir un mapa único a partir de diferentes cruzamientos, debido a las frecuentes recombinaciones del genoma de guisante. No obstante Loridon *et al.* (2005) realizaron un exhaustivo examen del orden de marcadores y la asignación de marcadores a grupos de ligamiento en sus diferentes poblaciones consideradas. Estos autores demostraron que los datos generados de forma independiente entre tres laboratorios diferentes estaban en acuerdo. Sin embargo, también detectaron algunas discrepancias en el orden o asignación de los marcadores, sugiriendo la presencia de regiones de recombinación. En este sentido, previamente a este trabajo ya se había sugerido la necesidad de realizar análisis citogenéticos en guisante que podrían revelar el número y posición de nódulos de recombinación (RN) durante la meiosis (Hall *et al.*, 1997). En base a presencia de nódulos, o regiones, de recombinación, el orden de los marcadores moleculares situados en esas regiones o próximos pueden verse afectados por reordenaciones.

Un ejemplo de estas discrepancias en el orden de los marcadores coincide con uno de los marcadores que también mostró diferencias en su posicionamiento en este trabajo; *AB64* se localizó cerca de *Le* en LGIII en mapa compuesto Loridon *et al.* (2005), a diferencia de su situación en LGIV según Prioul *et al.* (2004). En este caso nuestros resultados se asemejan a los resultados obtenidos en Loridon *et al.* (2005) y confirmados por Aubert *et al.* (2006), en los que se sitúa a *AB64* en LGIII y aunque el orden entre *Le* y *AB64* en PopUSA aparezca invertido, coincide con el obtenido en PopESP.

Existen diferentes causas por las que se pueden producir discrepancias en la asignación en diferentes poblaciones (Loridon *et al.*, 2005): se puede estar realmente mapeando bandas diferentes en marcadores multi-banda, aunque también pueden ser debidas al empleo de métodos de contraste usados para separar los productos de amplificación con diferente resolución. Estos posibles errores podrían

resolverse utilizando secuenciadores automáticos para determinar el tamaño de banda. Sin embargo, esta solución plantea la necesidad de disponer equipamiento especializado y conlleva un coste, económico y temporal, adicional a tener presente, sobre todo cuando la obtención del mapa de ligamiento es un paso intermedio y no un objetivo final. Los marcadores SSR son marcadores específicos de *locus*, fáciles de anotar debido a la ausencia de fragmentos de tamaño similar que puedan interferir en la discriminación, baja sensibilidad a las condiciones de reacción y por tanto, altamente reproducibles (Fondevilla *et al.*, 2011a). La inclusión de este tipo de marcadores, junto con marcadores específicos de genes, el caso concreto de los marcadores GTM, ha conllevado el enriquecimiento de los mapas genéticos en guisante con marcadores robustos que facilitan la comparación entre mapas a través de su empleo como marcadores puente, como ha sido el caso de mapas individuales conectados con otros publicados previamente (Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006; Deulvot *et al.*, 2010; Fondevilla *et al.*, 2011).

En nuestro caso, la combinación de los tres mapas dió lugar a la construcción de un mapa compuesto a través de un total de 26 marcadores puente, tres de ellos presentes en las tres poblaciones: A, Af y AD146. El resto entre dos poblaciones: 3 entre PopESP y PopFRA (*BirteX5*, *Cs* y *PepC*), 8 entre PopESP y PopUSA (7 SSR y 1 marcador clásico) y 12 entre PopFRA y PopUSA (6 SSR y 6 GTM). Estos 26 marcadores permitieron comprobar la correcta correspondencia entre la localización de los marcadores en los grupos de ligamiento y comparar el orden en los mismos, observando algunas discrepancias en el orden de los mismos en algunos casos.

Asimismo, el mapa compuesto obtenido en nuestro trabajo puede relacionarse con mapas previos. Puede relacionarse con el mapa consenso de Loridon *et al.* (2005) por 67 marcadores, Con el mapa de Aubert *et al.* (2006) mediante 65 marcadores y con el mapa consenso de Weeden *et al.* (1998) por 5 marcadores, al igual que con los mapas presentados por Ellis *et al.* (1992) y Hall *et al.* (1997). El mapa consenso con microsatélites descrito en Loridon *et al.* (2005) y el mapa compuesto aquí obtenido presentan el nexo de unión de haber utilizado PopFRA como población común, derivada del cruzamiento Terese x Champagne, lo que ha facilitado su comparación tanto en marcadores comunes como en su orden.

Además de SSR, el mapa compuesto presentado en este trabajo comparte otro tipo de marcadores con trabajos previo, como los marcadores basados en secuencias génicas comunes con el mapa de Gilpin *et al.* (1997), y numerosos CAPS y STS, entre otros, con el mapa publicado por Aubert *et al.* (2006), permitiendo situar de forma aproximada genes mapeados en estos estudios en el mapa que se ha obtenido en este trabajo. De esta forma se sitúan en nuestro mapa *loci* con función conocida que podrían permitir, tras una hipotética detección influencia con algún QTL, indagar en el posible efecto sobre algún carácter de interés provocado por diferenciales en el metabolismo de las plantas. El empleo de estos marcadores basados en genes permite obtener, en guisante, mapas funcionales enriquecidos en

genes codificantes y añadir posibles puntos de ligamiento entre guisante y otras especies relacionadas, entre ellas la especie modelo *M. truncatula*, para futuras aproximaciones en la obtención de genes candidatos en guisante (Aubert *et al.*, 2006).

En concreto se ha encontrado correspondencia con otros trabajos como es el caso de *PepC* en LGIII, que coincide con Aubert *et al.* (2006) y con Konovalov *et al.* (2005), *Gsp* en LGVI en común con Aubert *et al.* (2006), Hall *et al.* (1997) y Gilpin *et al.* (1997). El mapa obtenido está conectado con el mapa de guisante consenso (Weeden *et al.*, 1998) mediante marcadores moleculares y clásicos: *Af* localizado en LGI, *A* en LGII, *Le* en LGIII, *Rbcs* en LGV, *Gsp* y *Pl* en LGVI y ninguno para LGIV o LGVII.

Como ejemplo de la importancia del mapeo de marcadores basados en genes, *PepC* entre otros genes, tiene efectos en el tamaño y composición de la semilla cuando su expresión es alterada en leguminosas transgénicas (Rolletschek *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005). En Timmerman-Vaughan *et al.* (1996) un QTL principal para el tamaño de semilla fue localizado cerca del STS *M27* en LGIII y según Loridon *et al.* (2005) estaría relacionado con *PepC*, lo cual se corresponde con este trabajo en el cual, para la población PopFRA, ambos marcadores está próximos entre sí. Tar'an *et al.* 2004 detectaron un QTL para el contenido proteico de semilla que se localizó en LGVI (entre G4_2000 y B7_1750) y Aubert *et al.* (2006) localizaron en ese mismo intervalo 3 genes asociados: *Sus3* (sucrosa sintasa), *PsKao2* y *Gsp* (glutamina sintasa plastidial). Sobre estos genes, los autores señalan al primero y último de estos marcadores como buenos candidatos en el control del contenido en proteína de las semillas de guisante. Ambos marcadores, *Sus3* y *Gsp*, se han mapeado en este estudio para la población PopFRA. La localización de marcadores basados en genes permite la selección de líneas en base a un genotipo ligado a la expresión de un gen conocido, aplicando técnicas clásicas como la selección asistida por marcadores, MAS.

Por último, se ha obtenido por primera vez la posición en el mapa de 21 marcadores moleculares distribuidos a lo largo de los siete grupos de ligamiento. También se ha confirmado la posición de otros 29 marcadores moleculares que se habían localizado en diferentes grupos de ligamiento dependiendo de los mapas o que, habían mostrado segregación distorsionada en las poblaciones evaluadas en otros trabajos. Esto muestra la utilidad de combinar mapas procedentes de diferentes poblaciones para permitir la integración de una mayor cantidad de información de mapeo y la importancia de utilizar marcadores “puente” que sean polimórficos en más de una población para permitir comparar los diferentes mapas genéticos de guisante.

Los marcadores puente y la construcción de mapas consenso mediante la combinación de mapas obtenidos en diferentes poblaciones permiten contrastar resultados, comprobando la asignación de los marcadores a cada grupo de ligamiento y su orden dentro del mismo. Permite además establecer distancias relativas entre marcadores anclados en diferentes mapas a través de marcadores puente

flanqueantes, a la vez que permite detectar zonas escasamente saturadas y no saturadas dentro de los grupos de ligamiento y en comparación con otros mapas publicados previamente a través de la conexión establecida por los marcadores puente.

En general, los resultados presentados están en buena concordancia con el mapa consenso. Aunque los resultados obtenidos han permitido comprobar que la utilización de SSR y marcadores basados en genes son una buena herramienta para obtener un mapa genético de ligamiento rápido para una población de mapeo de guisante, el número de marcadores debería ampliarse para obtener un mapa genético más saturado.

Asimismo, la incorporación de los RBIP en la construcción de los mapas ha permitido localizar dichas secuencias basadas en retrotransposones a regiones concretas del mapa de ligamiento. Los tres mapas de ligamiento permitieron localizar un total de 9 RBIPs distribuidos a lo largo de todos los grupos de ligamiento a excepción del LGVII.

La obtención de los tres mapas de ligamiento y la comprobación, mediante marcadores puentes de la cobertura de los tres mapas parciales, han permitido obtener un mapa compuesto cuya cobertura del genoma de guisante es alta en relación a otros mapas genéticos de guisante mucho más saturados (Loridon *et al.*, 2005; Aubert *et al.*, 2006; Fondevilla *et al.*, 2011b). El empleo de marcadores puente en mapas de saturación parcial, como los nuestros, permite no sólo comprobar la correspondencia en el orden de marcadores o la asociación con otros mapas mucho más saturados, sino que permite comprobar la cobertura de los mismos en relación al mapa completo de guisante. La cobertura casi total de nuestros mapas parciales permite abordar la localización de QTL en relación al total del mapa genético de ligamiento de guisante. En nuestro estudio esto permitirá una aproximación al estudio de QTL asociados a caracteres agronómicos y relacionados con la dureza invernal, utilizando mapas parcialmente saturados y localizando regiones, más o menos amplias, implicadas en la expresión de estos caracteres de interés.

2. 2. Detección y mapeo de QTL

2. 3. Detección y mapeo de QTL relacionados con caracteres agronómicos

Detección y mapeo de QTL asociados a fenología del cultivo

Detección y mapeo de QTL asociados al inicio de floración

Con respecto a la fenología se han evaluado dos caracteres, correspondientes a las fechas de inicio (INF) y la final (FIF) de la floración. Esta evaluación se ha realizado sobre dos de las poblaciones de estudio (PopESP y PopFRA) y evaluando en dos ambientes diferentes.

Para poder comparar mejor los QTL obtenidos y evitar equivocaciones con respecto al marcador al que se asociaban se modificó su nomenclatura. Cada uno los QTL detectado se nombró con la primera letra en mayúscula en referencia a la población mapeada (E: PopESP y F: PopFRA), las siglas correspondientes al rasgo asociado y el número correspondiente al grupo de ligamiento, tras un punto se numeraron los QTL en función del número detectado de los mismos en cada grupo de ligamiento, eliminando de la nomenclatura el marcador al que se aproximaban

Tabla IV.17. QTL asociados al inicio de floración mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA

LG	QTL	Pobl	Ambte	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD Max (H0:H3)	R ² Max (0:1; %)	Efecto Aditivo
				Flanqueantes						
I	einf1.1	PopESP	ZP 08	<i>AA321</i>	<i>Af</i>	<i>D21</i>	65,15	4,53	14,19	-0,25
	finf1.1	PopFRA	ZP 08	<i>AB119</i>	<i>BirteX5</i>	<i>PSAS2</i>	37,0	11,35	7,68	-0,04
II	einf2.3	PopESP	ZI 07	<i>281x44</i>	<i>A</i>	<i>P482</i>	44,52	8,95	3,61	-0,05
	finf2.1	PopFRA	ZI 07	<i>AB109</i>	<i>Cs</i>	<i>PutTIP</i>	22,18	10,09	2,91	0,04
	finf2.3	PopFRA	PI 07	<i>Cs</i>	<i>AA303</i>	<i>A</i>	74,91	7,18	5,95	-0,01
III	einf3.5	PopESP	PP 08	<i>PepC</i>	<i>AB68</i>	<i>PepC</i>	74,32	24,90	3,60	0,04
	einf3.7	PopESP	ZI 07	<i>AA355</i>	<i>AD270</i>	<i>AA355</i>	113,91	5,63	5,99	0,09
	einf3.8	PopESP	ZP 08	<i>AD270</i>	<i>AB53</i>	<i>AD270</i>	134,98	2,87	2,52	-0,10
	einf3.9	PopESP	ZI 07	<i>AB53</i>	<i>2055x36</i>	<i>Le</i>	209,27	3,14	18,13	0,32
	finf3a.1	PopFRA	ZI 07	<i>Bfruct</i>	<i>AA85</i>	<i>L109</i>	49,73	9,04	9,25	0,09
	finf3a.3	PopFRA	ZP 08	<i>AA85</i>	<i>PepC</i>	<i>AA85</i>	75,86	5,70	7,41	0,09
	finf3a.4	PopFRA	PP 08	<i>PepC</i>	<i>M27</i>	<i>PepC</i>	155,54	15,47	3,74	0,05
	finf3a.7	PopFRA	PP 08	<i>sT11-800</i>	<i>Pip1</i>	<i>sT11-800</i>	252,74	12,29	7,90	-0,03
	finf3b.1	PopFRA	ZI 08	<i>PSADH1</i>	<i>Sbe2</i>	<i>AA175</i>	90,64	6,47	30,74	-0,40
IV	einf4.1	PopESP	ZI 08	<i>AF29243.2</i>	<i>AB31</i>	<i>AA285</i>	19,77	2,70	18,14	0,33
	finf4.3	PopFRA	ZI 07	<i>P628</i>	<i>P393</i>	<i>P628</i>	79,42	11,61	5,06	-0,07
V	einf5.3	PopESP	ZI 07	<i>AA497</i>	<i>AB130</i>	<i>AA497</i>	33,26	2,52	4,10	-0,09
	einf5.5	PopESP	PI 08	<i>CHPSGPA1</i>	<i>AA260</i>	<i>CHPSGPA1</i>	102,83	3,36	4,36	-0,07
	finf5.1	PopFRA	ZP 08	<i>Rbcs</i>	<i>AB146</i>	<i>2055NR51</i>	31,31	16,17	9,64	-0,01
VI	einf6.2	PopESP	PP 08	<i>AC17</i>	<i>AA335</i>	<i>AC17</i>	38,39	25,34	4,68	0,03
	einf6.3	PopESP	PI 08	<i>AA335</i>	<i>AD59</i>	<i>AA335</i>	53,72	2,61	5,49	-0,03
	einf6.4	PopESP	ZI 07	<i>AD59</i>	<i>AA200</i>	<i>AD59</i>	135,64	7,00	6,28	0,07
	finf6.1	PopFRA	ZP 08	<i>SUS3</i>	<i>Gsp</i>	<i>SUS3</i>	0,00	13,91	17,92	-0,13
	finf6.3	PopFRA	PP 08	<i>PSGSR1</i>	<i>AC76a</i>	<i>Ga2ox</i>	181,81	17,14	11,52	-0,05
VII	einf7.2	PopESP	PI 08	<i>AA369</i>	<i>AD146</i>	<i>AA369</i>	39,61	2,58	9,00	-0,03
	einf7.4	PopESP	ZP 08	<i>AD146</i>	<i>B14</i>	<i>AD146</i>	94,08	3,93	3,65	-0,11
	finf7.1	PopFRA	PI 07	<i>AB27</i>	<i>AA160</i>	<i>AB27</i>	0,18	7,60	2,50	-0,05
	finf7.3	PopFRA	PI 07	<i>AD146</i>	<i>Ptrans</i>	<i>Gs3B</i>	991,26	11,36	12,24	0,05

En negrita se destacan los marcadores con QTL asociados coincidentes en ambas poblaciones. Codificación de los QTL: e: QTL detectado en la población de mapeo POPESP, f: QTL detectado en la población de mapeo POPFRA, inf: inicio de floración, primer dígito, grupo de ligamiento en el que se ha detectado el QTL, segundo dígito: número de marcador asociado.

Los análisis referentes al inicio de floración han localizado algún QTL en todos los grupos de ligamiento en ambas poblaciones de mapeo y en diferentes condiciones, tal y como se muestra en la Tabla IV.17.

El grupo de ligamiento LGIII destacó por la presencia de QTL con elevado R^2 , con un máximo de 30,74% de la varianza explicada por *finf3b.2*, con valores LOD elevados (*einf3.5*, LOD = 24,90) y el efecto aditivo más marcado, tanto con signo positivo (*einf3.10* con 0,32) como con signo negativo (*finf3b.2* con -0,40). Además de este grupo de ligamiento, los QTL detectados en LGIV y LGVI también mostraron porcentajes de varianza explicada altos (aproximadamente 18%). Los valores LOD en LGVI también fueron elevados.

En el análisis global de QTL asociados al inicio de floración, INF, se puede observar en la Tabla IV.17 que hay QTL distribuidos a lo largo de los siete grupos de ligamiento. Sin embargo, su distribución en los grupos de ligamiento y su localización concreta es dependiente del ambiente evaluado.

En LGI se encontró un QTL asociado a INF en la población PopESP y otro en PopFRA, ambos localizados en regiones solapantes en base a nuestro mapa compuesto. Además en ambos casos los QTL han sido detectados bajo condiciones de siembra primaveral. En LGII se localizaron dos QTL asociados a INF en PopFRA y uno en PopESP. En el caso de *einf2.3* y *finf2.3*, ambos QTL aparecen asociados al marcador morfológico *A*, mientras que *finf2.1* se ha asociado al marcador *PutTIP*.

El grupo de ligamiento LGIII presenta un elevado número de QTL asociados a INF. Sin embargo, aparecen claramente diferenciados en función de la fecha de siembra. En este sentido, se localizaron dos QTL en PopESP vinculados a la siembra primaveral y tres en PopFRA. En el caso de los QTL asociados a INF bajo condiciones de siembra primaveral, se localizan tanto en la siembra en Zamadueñas como en Peñaflores, solapándose en el caso de esta última población los QTL de ambas poblaciones (*einf3.5* y *finf3a.4*) y quedando vinculados al marcador *PepC*, al igual que el QTL *finf3a.3* obtenido en la localidad de Zamadueñas también tras la siembra primaveral.

Los QTL detectados en LGIII y asociados a INF en condiciones de siembra temprana quedan representados por dos QTL en PopESP (*einf3.7* y *einf3.9*) y otros dos en PopFRA (*finf3a.1* y *finf3b.1*). En ambas poblaciones destacan los QTL asociados al extremo inferior de LGIII por alcanzar en ambos casos el mayor porcentaje de varianza explicada dentro de su población y asociado a dicho carácter: *einf3.9* y *finf3b.1*.

En LGIV, aparece un QTL asociado a INF en cada una de las poblaciones evaluadas, en ambos casos se han obtenido en condiciones de siembra otoñal en la localidad de Zamadueñas.

Los QTL localizados en LGV asociados a INF en PopESP coinciden ambos para condiciones de

siembra temprana, aunque einf5.3 corresponde a la evaluación realizada en Zamadueñas, mientras que einf5.5 corresponde con la evaluación realizada en Peñaflores. No obstante ambos QTL se localizan próximos al marcador *AB130* mostrando efecto aditivo.

En LGVI vuelven a aparecer QTL detectado solo bajo condiciones de siembra primaveral, einf6.2 en el caso de PopESP y dos QTL (finf6.1 y finf6.3) en el caso de PopFRA, ambos diferenciados por la localidad en la que han sido detectados, pero con el mismo efecto aditivo. Con respecto a los QTL asociados a INF en este grupo de ligamiento y obtenidos a partir de las evaluaciones en los ensayos de siembra otoñal, sólo se han detectado dos QTL, ambos adyacentes y ligados a *AD59*, pero detectados cada uno en una localidad, para la población PopESP.

Por último, en LGVII destaca que bajo diferentes condiciones y poblaciones, se han detectado 4 QTL, y tres de ellos aparecen vinculados a marcador *AD146*.

El inicio de floración, INF, mostró QTL en todos los grupos de ligamiento. Sin embargo, mostraron diferencias con respecto al porcentaje de varianza explicada, que alcanzó su máximo, 30,7%, dentro de LGIII entre *PsAAP2* y *AA175*. Este QTL es comparable al QTL obtenido por Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008 y definido como WFD3.1, el cual se localizó sobre *AA175* y mostró los máximos valores de R^2 , al igual que en nuestro trabajo, y que se relaciona con el *locus* de floración *Hr* y el efecto del fotoperiodo. Asimismo, este QTL detectado en nuestros análisis, inf3, es el único QTL para el inicio de floración que muestra un efecto predominante aditivo claramente superior al resto frente al efecto, tal y como se sugiere en la bibliografía sobre la herencia de pocos genes de carácter aditivo (Auld *et al.*, 1983; Cousin *et al.*, 1985; Liesenfeld *et al.* 1986).

Por otra parte, además de la importancia de este QTL ligado a *AA175* en LGIII, ha habido otras posibles colocalizaciones a considerar con los trabajos de Lejeune-Hénaut *et al.* (2008). Al igual que en sus resultados, este trabajo ha detectado en ambas poblaciones un QTL para el inicio de floración en la región inferior de este grupo de ligamiento, cercano a los *loci* *Le* y *Bfruct*, sin embargo su implicación aún no está clara.

Otros QTL relacionados con INF destacables por la varianza explicada se mostraron en LGI, IV, V y VI. Los correspondientes a LGI y VI aparecieron predominantemente en siembra primaveral y no se solaparon con los detectados por Lejeune-Hénaut *et al.* (2008). Sin embargo, el QTL WFD5.1 solapó con la región QTL detectada en ambas poblaciones de este trabajo y mostraron valores de R^2 cercanos al 10% al igual que Lejeune-Hénaut *et al.* (2008), aunque se relacionaron, no sólo con el adelanto de la fecha de siembra sino también, con la siembra primaveral. En este sentido, los autores (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) ponen de manifiesto la asociación de este QTL WFD5.1 con el *locus* *Tri*; alelo dominante no deseable en la selección de líneas de guisante destinadas a la producción de piensos, debido a que contiene dos genes estructurales que codifican para los principales inhibidores de tripsina en guisante

(Domoney *et al.*, 1994; 1995). Por tanto, hay una buena correlación entre los datos presentados por dichos autores y los de nuestro estudio, destacando el efecto del QTL en LGIII ligado al marcador *AA175* como principal.

La importancia de este carácter en referencia con la dureza invernal radica en la relación del mismo con uno de los métodos de escape a las heladas, donde un mecanismo eficiente conlleva retrasar la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva, debido a que la sensibilidad a la congelación aumenta tras el inicio de la floración (Fowler *et al.*, 2001).

Detección y mapeo de QTL asociados al fin de floración

Los resultados de la localización de QTL relacionados con el fin de floración, FIF, mostraron también una distribución a lo largo de todo el mapa de ligamiento (Tabla IV.18). Sin embargo el número de QTL detectados disminuyó en relación al número de QTL detectados para el rasgo de inicio de floración.

Tabla IV.18. QTL asociados al fin de floración mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA

LG	QTL	Pobl	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD Max (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	
			Ambte	Flanqueantes						
I	efif1.1	PopESP	ZP 08	<i>AA321</i>	<i>Af</i>	<i>D21</i>	64,43	7,72	9,10	0,11
II	efif2.1	PopESP	ZP 08	<i>AB113</i>	<i>281x44</i>	<i>AB72</i>	33,21	7,71	6,94	0,10
	efif2.3	PopESP	ZI 08	<i>281x44</i>	<i>AB112</i>	<i>A</i>	52,74	2,76	5,06	0,13
	efif2.6	PopESP	ZP 08	<i>AB112</i>	<i>AB100</i>	<i>45x31</i>	76,84	9,22	12,26	0,10
III	efif3.3	PopESP	ZI 08	<i>AA170</i>	<i>AD174</i>	<i>AA170</i>	45,82	2,53	5,06	-0,13
	efif3.5	PopESP	ZP 08	<i>PepC</i>	<i>AA355</i>	<i>AB68</i>	100,38	8,40	5,63	0,01
	efif3.7	PopESP	ZI 08	<i>AA355</i>	<i>AB53</i>	<i>AD270</i>	135,02	4,07	3,21	-0,08
	efif3.9	PopESP	PI 08	<i>AB53</i>	<i>PSBLOX2</i>	<i>PSBLOX2</i>	196,26	3,06	3,43	-0,08
	efif3.10	PopESP	ZP 08	<i>PSBLOX2</i>	<i>AB64</i>	<i>Le</i>	209,35	9,45	3,81	0,03
	ffif3a.3	PopFRA	ZI 08	<i>AB85</i>	<i>PepC</i>	<i>PepC</i>	155,14	2,58	17,64	0,38
	ffif3b.1	PopFRA	ZI 08	<i>PSADH1</i>	<i>PsAAP2</i>	<i>PsAAP2</i>	48,32	4,39	26,38	-0,40
ffif3b.2	PopFRA	ZP 08	<i>PsAAP2</i>	<i>Sbe2</i>	<i>AA175</i>	91,07	4,57	35,35	-0,43	
IV	efif4.1	PopESP	PI 08	<i>AF29243.2</i>	<i>A9</i>	<i>AA285</i>	19,62	2,56	17,12	0,19
V	efif5.3	PopESP	PI 08	<i>AA497</i>	<i>AA260</i>	<i>AB130</i>	98,35	3,23	9,61	-0,11
VI	efif6.1	PopESP	ZP 08	<i>AC76b</i>	<i>AC17</i>	<i>AC17</i>	38,33	7,80	4,97	0,04
	efif6.3	PopESP	ZP 08	<i>AA335</i>	<i>AD59</i>	<i>AD59</i>	134,99	5,52	3,77	1,04
	efif6.4	PopESP	PI 08	<i>AD59</i>	<i>AA200</i>	<i>AA200</i>	161,50	2,94	4,72	-0,07
VII	efif7.1	PopESP	ZP 08	<i>AA345</i>	<i>AA369</i>	<i>AA369</i>	38,88	8,23	7,51	0,08
	efif7.7	PopESP	ZI 08	<i>Clpser</i>	<i>AB132</i>	<i>AB132</i>	189,02	3,55	4,25	0,13

En negrita se destacan los marcadores con QTL asociados coincidentes en ambas poblaciones. Codificación de los QTL: e: QTL detectado en la población de mapeo POPESP, f: QTL detectado en la población de mapeo POPFRA, fnf: fin de floración, primer dígito, grupo de ligamiento en el que se ha detectado el QTL, segundo dígito: número de marcador asociado.

Asimismo, el número de QTL asociados a FIF detectados en PopFRA se ha reducido hasta 3, todos ellos localizados en LGIII, además los tres muestran porcentajes de varianza explicada muy superiores a los encontrados en PopESP, destacando los localizados en la parte inferior de LGIII (ffif3b.1 y ffif3b.2), detectados en Zamadueñas pero bajo diferentes fechas de siembra, y próximos en ambos casos a *PsAAP2*.

En LGI sólo se ha detectado un QTL asociado a FIF, pero bajo condiciones de siembra primaveral. Asimismo, los QTL eifif2.1, y einf2.6, localizados en LGII han sido detectados sólo tras siembra primaveral. En LGIII los QTL detectados para este rasgo en PopESP muestran también diferencias en función de la fecha de siembra, en primavera los QTL efif3.5 y efif3.10 aparecen asociados a *PepC* y *Le* respectivamente. Otros tres QTL han sido detectados en PopESP bajo condiciones de siembra temprana (efif3.3, efif3.7 y efif3.9). El fin de floración, al igual que el inicio, ha sido asociado nuevamente a los genotipos tolerantes para el *locus PepC*.

El ensayo correspondiente a Peñaflores en la campaña 2007/2008 ha permitido localizar dos QTL en PopESP con siembra en otoño: un QTL ligado a LGIV y otro a LGV. Sin embargo, bajo otros ambientes o en la población PopFRA no se han detectado QTL en dichos grupos de ligamiento.

Los QTL detectados en LGVI se corresponden con QTL asociados a FIF bajo condiciones de siembra primaveral (efif6.1 y efif6.3), en la región superior de LGVI, mientras que el QTL efif6.4 que se ha detectado en el ensayo de siembra en otoño y se encuentra próximo a efif6.3.

Por último, los QTL localizados en LGVII están vinculados a la población PopESP, sembrada en Zamadueñas en la campaña 2007/2008, sin embargo ambos se diferencian en la época de siembra, efif7.1 se ha localizado tras la siembra en primavera, mientras que efif7.7 se ha localizado para las evaluaciones de siembra temprana.

Los valores LOD y R^2 más elevados se relacionaron directamente con la siembra primaveral, cuyos QTL se distribuyeron por los grupos LGI, LGII, LGIII, LGVI y LGVII. Los porcentajes de varianza explicada más elevados correspondieron a los QTL mapeados en LGIII, que alcanzaron valores del 33%, seguidos por los situados en LGII. Estos dos grupos de ligamiento, LGII y LGIII, presentaron QTL asociados al fin de floración en los ensayos realizados en primavera predominantemente. En este sentido, los QTL que resultaron sólo exclusivos de siembra en otoño fueron los detectados en LGIV y LGV, con porcentajes de varianza explicada aproximada del 16% y del 9%, respectivamente.

El efecto dominante mostró signo negativo en la mayoría de los QTL detectados en LGI, LGII, LGIV y parte superior de LGIII, independientemente de la fecha de siembra o de la población evaluada, es decir, asociados al genotipo tolerante. El efecto aditivo no ha sido elevado en general, a excepción de efif6.3 que mostró un valor de 1, asociado al genotipo tolerante.

En comparación con los QTL asociados al inicio de floración, se observaron coincidencias en relación a los elevados valores LOD y los altos porcentajes de varianza explicada en ambos rasgos, coincidiendo en ambos casos con QTL mapeados en LGIII y asociados al marcador *AA175*.

Detección y mapeo de QTL asociados a la fecha de cosecha

Se evaluó como rasgo cuantitativo la fecha de cosecha, COS, mostrando nuevamente QTL en todos los grupos de ligamiento (Tabla IV.19).

Tabla IV.19. QTL asociados a la fecha de cosecha mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA

LG			Marcadores		Marcador	Posición (cM)	LOD	Max R ² (H0:H3)	Efecto Aditivo (0:1; %)
	QTL	Pobl	Ambte	Flanqueantes	Asociado				
I	fcos1.1	PopFRA	ZI 08	<i>AB119</i>	<i>BirteX5</i>	<i>PSAS2</i>	37,37	8,47	8,61 -0,14
II	ecos2.1	PopESP	ZI 08	<i>AB113</i>	<i>AB72</i>	<i>AB113</i>	0,21	35,23	3,19 0,02
	ecos2.4	PopESP	ZI 08	<i>P482</i>	<i>AB100</i>	<i>A</i>	52,89	35,29	3,09 0,02
	fcos2.4	PopFRA	PI 08	<i>P54</i>	<i>A</i>	<i>P54</i>	74,57	4,69	1,26 0,03
III	ecos3.6	PopESP	ZI 08	<i>AB68</i>	<i>AA355</i>	<i>AB68</i>	94,34	19,74	2,31 -0,03
	ecos3.10	PopESP	ZI 08	<i>PSBLOX2</i>	<i>AB64</i>	<i>Le</i>	209,58	19,43	5,41 0,03
	fcos3a.7	PopFRA	ZI 08	<i>sT11-800</i>	<i>Pip1</i>	<i>sT11-800</i>	252,74	4,60	3,42 -0,02
	fcos3b.1	PopFRA	ZI 08	<i>PSADH1</i>	<i>Sbe2</i>	<i>AA175</i>	90,29	2,71	3,30 0,18
IV	ecos4.1	PopESP	PI 08	<i>AF29243.2</i>	<i>AA285</i>	<i>AF29243.2</i>	0,38	7,74	4,52 0,19
	ecos4.4	PopESP	PI 08	<i>A9</i>	<i>AC32</i>	<i>A9</i>	65,25	17,13	3,92 0,50
	ecos4.6	PopESP	ZI 08	<i>AA3778</i>	<i>AA349</i>	<i>AA3778</i>	159,29	20,93	2,42 -0,04
	fcos4.3	PopFRA	ZI 08	<i>P628</i>	<i>P393</i>	<i>P628</i>	79,33	2,77	2,23 0,05
V	ecos5.3	PopESP	ZI 08	<i>AA497</i>	<i>AB130</i>	<i>AA497</i>	33,39	32,27	3,38 0,04
	ecos5.5	PopESP	PI 08	<i>CHPSGPA1</i>	<i>AA260</i>	<i>CHPSGPA1</i>	103,04	6,82	7,11 -0,02
	fcos5.1	PopFRA	ZI 08	<i>Rbcs</i>	<i>AB146</i>	<i>PSRBCS3C</i>	6,02	8,35	16,20 -0,17
VI	ecos6.1	PopESP	PI 08	<i>AC76b</i>	<i>AC17</i>	<i>AC76b</i>	0,16	2,60	17,80 -0,53
	fcos6.2	PopFRA	ZI 08	<i>Gsp</i>	<i>Ga2ox</i>	<i>PSGSRI</i>	140,45	3,43	4,27 -0,09
VII	ecos7.2	PopESP	PI 08	<i>AA369</i>	<i>AA116</i>	<i>AD146</i>	39,56	21,80	28,92 0,02

En negrita se destacan los marcadores con QTL asociados coincidentes en ambas poblaciones. Codificación de los QTL: e: QTL detectado en la población de mapeo POPESP, f: QTL detectado en la población de mapeo POPFRA, cos: fecha de cosecha, primer dígito, grupo de ligamiento en el que se ha detectado el QTL, segundo dígito: número de marcador asociado.

La distribución de los QTL asociados a la fecha teórica de cosecha abarca todos los grupos de ligamiento, habiendo detectado QTL en ambas poblaciones para todos los grupos de ligamiento a excepción de LGVII, en el cual sólo se ha localizado un QTL vinculado a PopESP y LGI, en el cual sólo se localizó un QTL asociado a PopFRA.

En LGII se han detectado dos QTL en PopESP, (ecos2.1 y ecos2.4), ambos con valores LOD y varianzas explicadas muy similares, al igual que los efectos mostrados por ambos QTL. En PopFRA se

ha detectado un QTL en este grupo de ligamiento (fcos2.4), el cual comparte la región asociada al marcador morfológico A con el QTL ecos2.4 detectado en PopESP, en ambos casos con efecto aditivo positivo, asociado al genotipo de los parentales tolerantes: presencia de antocianos.

Se han encontrado dos QTL para cada una de las poblaciones evaluadas en LGIII. En PopESP ambos QTL (ecos3.6 y ecos3.10) mostraron valores LOD similares, al igual que su efecto dominante. El primero de los QTL se encuentra vinculado al SSR *AB68*, mientras que el segundo QTL se encuentra ligado a *Le*. En el caso de PopFRA también se han localizado dos QTL en LGIII (focs3a.7 y fcos3b.1), sin embargo en esta población los valores LOD son inferiores a los encontrados en PopESP dentro del mismo LG.

En LGIV se han situado tres QTL asociados a COS para PopESP (ecos4.1, ecos4.4 y ecos4.6), siendo los dos últimos los que han alcanzado mayor valor LOD. En PopFRA se ha localizado un QTL (fcos4.3) con valores LOD y varianza explicada bajos pero que solapa en la misma región que ecos4.4.

Los QTL ecos5.5 y fcos5.1 se han situado en LGV para las poblaciones PopESP y PopFRA. Ambos QTL solapan en la misma región de este grupo de ligamiento y han mostrado valores LOD y porcentajes de varianza explicada similares, al igual que los efectos calculados, sin embargo hay que destacar que en ambos casos se asocian al genotipo de los parentales susceptibles a heladas. Además, se ha detectado otro QTL en PopESP dentro de este grupo de ligamiento (ecos5.3), que si bien no muestra un porcentaje de varianza explicada elevado, alcanza uno de los mayores valores LOD.

En LGVI destacó el QTL detectado en PopESP, ecos6.1, el cual mostró un elevado porcentaje de varianza explicada. Además, PopFRA mostró un QTL (fcos6.2). El QTL detectado en LGVII correspondió a la población PopESP y destacó por su alto valor LOD, y por alcanzar el máximo de varianza explicada en el estudio, casi el 29%. Además este QTL asociado al *locus AD146* podría ser empleado en MAS a través del genotipo tolerante.

En resumen, entre todos los QTL detectados para este rasgo cuantitativo, destacó la detección de QTL con el más alto porcentaje de varianza encontrado, en LGVII (ecos7.2, 28,92%) y LGII por presentar los QTL con los más altos valores LOD (ecos2.4 con 5,29).

Detección y mapeo de QTL asociados a la formación de ramificaciones

La tendencia de las líneas sembradas durante el otoño a formar ramificaciones, RAM, fue evaluada del mismo modo que los anteriores (Tabla IV.20) y la detección y mapeo de los QTL asociados a este carácter se realizó sobre ambas poblaciones: PopESP y PopFRA.

Los QTL asociados a la formación de ramificaciones se han localizado en LGII, LGIII, LGIV y LGV para ambas poblaciones, mientras que los localizados en LGVI y LGVII sólo estaban presentes en PopESP.

Tabla IV.20. QTL asociados a la formación de ramificaciones mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA

LG	QTL	Pobl	Ambte	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD Max (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
				Flanqueantes						
II	eram2.3	PopESP	PI 08	<i>281x44</i>	<i>A</i>	<i>P482</i>	45,42	2,52	6,16	-0,14
	eram2.6	PopESP	PI 08	<i>AB112</i>	<i>AB100</i>	<i>45x31</i>	76,91	4,48	4,63	0,04
	fram2.5	PopFRA	PI 08	<i>A</i>	<i>AA303</i>	<i>A</i>	74,74	8,04	1,27	0,04
III	eram3.2	PopESP	ZI 08	<i>AA72</i>	<i>AA170</i>	<i>AA72</i>	40,64	2,51	2,75	-0,07
	eram3.6	PopESP	PI 08	<i>AB68</i>	<i>AA355</i>	<i>AB68</i>	100,32	3,12	5,45	0,08
	eram3.10	PopESP	ZI 08	<i>PSBLOX2</i>	<i>2055x36</i>	<i>AB64</i>	217,57	8,18	16,28	0,20
	fram3a.1	PopFRA	ZI 08	<i>Bfruct</i>	<i>L109</i>	<i>Bfruct</i>	0,35	2,69	7,71	0,23
	fram3b.1	PopFRA	ZI 08	<i>PSADHI</i>	<i>Sbe2</i>	<i>AA175</i>	90,63	4,82	22,08	-0,43
IV	eram4.1	PopESP	ZI 08	<i>AF29243.2</i>	<i>AA285</i>	<i>AF29243.2</i>	0,01	5,11	5,12	-0,07
	eram4.5	PopESP	ZI 08	<i>AC32</i>	<i>AA349</i>	<i>AA378</i>	159,08	5,71	5,79	-0,10
	fram4.2	PopFRA	PI 08	<i>NTH1</i>	<i>P628</i>	<i>NTH1</i>	47,54	11,63	1,02	0,04
V	eram5.6	PopESP	PI 08	<i>CHPSGA1</i>	<i>AA260</i>	<i>CHPSGA1</i>	103,46	3,30	1,74	0,01
	fram5.2	PopFRA	ZI 08	<i>PSRBCS3C</i>	<i>AB146</i>	<i>2055NR51</i>	31,32	10,71	6,76	-0,03
	fram5.6	PopFRA	ZI 08	<i>AB146</i>	<i>64x45</i>	<i>AB146</i>	84,72	3,47	2,10	-0,06
VI	eram6.3	PopESP	PI 08	<i>AA335</i>	<i>AA200</i>	<i>AD59</i>	135,49	3,05	4,60	0,09
VII	eram7.2	PopESP	PI 08	<i>AA369</i>	<i>AD146s</i>	<i>AD146</i>	93,27	2,69	85,61	0,61

En negrita se destacan los marcadores con QTL asociados coincidentes en ambas poblaciones. Codificación de los QTL: e: QTL detectado en la población de mapeo POPESP, f: QTL detectado en la población de mapeo POPFRA, ram: formación de ramificaciones, primer dígito, grupo de ligamiento en el que se ha detectado el QTL, segundo dígito: número de marcador asociado.

Los QTL eram2.3 y fram2.5 de ambas poblaciones han sido colocalizados en la región próxima al marcador morfológico A en ambas poblaciones, a mayores se ha detectado un segundo QTL en este grupo de ligamiento (eram2.6) para la población PopESP.

El grupo de ligamiento LGIII mostró el mayor número de QTL, en la población PopESP destacó eram3.10 al mostrar el valor LOD y el porcentaje de varianza explicada más elevados dentro del grupo de ligamiento,. En este sentido, para la población PopFRA destacó fram3b.1, en el que además su porcentaje de varianza explicada fue el más elevado para el total de los QTL asociados a RAM en esta población.

En LGIV se detectaron dos QTL en PopESP (eram4.1 y eram4.5), ambos con valores LOD y porcentajes de varianza explicada muy similares entre sí. El QTL detectado en PopFRA (fram4.2) destacó por alcanzar el máximo valor LOD en la población, sin embargo el porcentaje de varianza explicada apenas superó el 1%.

Tres QTL asociados a RAM se detectaron en LGVI, uno para la población PopESP (eram5.6) y dos (fram5.2 y fram5.6) en la población PopFRA. Entre los dos QTL obtenidos en LGV para PopFRA, fram5.2 obtuvo un LOD más elevado que el otro QTL, y un porcentaje de varianza superior.

Por último, la población PopESP permitió localizar dos QTL más asociados a RAM, uno en LGVI (eram6.3) y otro en LGVII (eram7.2). Este último QTL se localizó en el ambiente de Peñaflor durante la campaña 2007/2008 y, por sí solo, explicó más del 85% de la varianza explicada para este rasgo en dicho ambiente y población.

No se detectó ningún QTL en LGI, y los QTL detectados en LGIII mostraron porcentajes de varianza más elevados que el resto de QTL en ambas poblaciones. En este rasgo, RAM, la tendencia de los efectos dominantes fue en signo positivo, salvo para aquellos QTL con elevado R^2 , que mostraron efecto dominante negativo cercano a cero y un efecto aditivo con signo positivo y con mayor valor absoluto.

Los QTL asociados a la tendencia a formar ramificaciones han mostrado claras diferencias en función de localidad y población, de forma que en la campaña 2007-2008 se detectó un QTL en la población PopESP que explicaba más del 85% de la varianza encontrada en la formación de ramificaciones en la localidad de Peñaflor. Sin embargo, en la comparativa entre poblaciones y localidades destacaron los QTL detectados en LGIII, con varianzas explicadas próximas al 15% o superiores en ambas poblaciones y diferentes localidades. Estos QTL, al igual que para los QTL asociados al inicio de la floración, se localizan en dos regiones concretas: uno de ellos asociado al *locus AA175*, y otro asociado a *Le*, coincidiendo ambos con los QTL WFD3.1 y WFD3.2 respectivamente.

La tendencia a formar ramificaciones puede estar relacionada con el crecimiento denominado en roseta, previamente asociado con la dureza invernal (Andersen y Markarian, 1968; Liesenfeld *et al.*, 1986). Markarian y Andersen (1966) llegaron a proponer el control genético de este tipo de crecimiento por tres genes, concluyendo que la formación de una roseta compacta es determinante para la supervivencia invernal. En este sentido, Auld *et al.*, (1985) determinaron el fuerte ligamiento entre genes de dureza invernal con el gen recesivo *er-2* localizado en LGIII próximo a AA278 (Katoch *et al.*, 2010). En el presente trabajo, se ha localizado un QTL asociados a la formación de ramificaciones, eram3.2, que solapa en dicha región, sin embargo no ha mostrado valores LOD elevados así como no explica un elevado porcentaje de varianza.

Detección y mapeo de QTL asociados a caracteres al rendimiento

Detección y mapeo de QTL asociados al número de semilla

Finalmente, se evaluaron rasgos cuantitativos a nivel de semilla cosechada. En primer lugar el número de semilla (N), los resultados del análisis CIM se resumen en la Tabla IV.21.

Tabla IV.21. QTL asociados al número de semillas mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA

LG	QTL	Pobl	Ambte	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD Max (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
				Flanqueantes						
I	enum1.2	PopESP	ZI 08	<i>D21</i>	<i>Af</i>	<i>D21</i>	65,13	2,50	2,84	-0,22
II	fnum2.3	PopFRA	ZI 08	<i>Cs</i>	<i>AA303</i>	<i>A</i>	74,81	4,47	13,75	-0,20
IIIb	fnum3b.2	PopFRA	ZI 08	<i>PsAAP2</i>	<i>AA175</i>	<i>PsAAP2</i>	48,77	2,52	6,00	-0,05
IV	enum4.2	PopESP	ZI 08	<i>AA285</i>	<i>AC32</i>	<i>AB31</i>	40,12	3,69	14,71	-0,14
	fnum4.1	PopFRA	ZI 08	<i>281x1</i>	<i>NTH1</i>	<i>281x1</i>	0,33	2,51	4,69	-0,12
VI	enum6.3	PopESP	ZI 08	<i>AA335</i>	<i>AD59</i>	<i>AA335</i>	53,69	2,52	2,63	-0,04
VII	enum7.2	PopESP	ZI 08	<i>AA369</i>	<i>AD146</i>	<i>AA369</i>	39,29	3,28	98,92	0,75

Codificación de los QTL: e: QTL detectado en la población de mapeo POPESP, f: QTL detectado en la población de mapeo POPFRA, num: número de semillas, primer dígito, grupo de ligamiento en el que se ha detectado el QTL, segundo dígito: número de marcador asociado.

En líneas generales, los QTL detectados han sido dependientes de cada una de las poblaciones evaluadas, no mostrando coincidencias entre los resultados de ambas. Tan sólo se encontró una coincidencia de QTL asociados a N en ambas poblaciones en LGIV (enum4.2 y fnum4.1).

Todos los QTL, independientemente de la población evaluada, mostraron efectos aditivos próximos a cero, siempre con signo negativo. A este patrón similar hay que añadirle una excepción muy marcada en todos los descriptores del QTL, es el caso del QTL asociado al número de semilla en PopESP y localizado en LGVII (enum7.2).

Al igual que para la formación de ramificaciones (RAM), en este caso el QTL localizado en LGVII a nivel del marcador 2, *AD146* (enum7.2), explicó por sí sólo casi toda la varianza (98,92%) en la condición Zamadueñas en la campaña 2007-2008 con siembra invernal, resultando el único QTL detectado con signo positivo, asociado al genotipo tolerante. En el resto de QTL destacaron los detectados en los grupos de ligamiento II y IV. En este último todos con efecto aditivo cercano a cero pero siempre con signo negativo, asociados al genotipo susceptible.

La coincidencia de dos QTL, asociados a la formación de ramificaciones y al número de semillas final, localizados ambos próximos al marcador *AD146* en LGVII, ha resultado destacable, debido al elevado porcentaje de varianza explicado por ambos QTL dentro del análisis individual de cada uno de los rasgos.

Detección y mapeo de QTL asociados al peso total de semillas

Al evaluar el peso de las semillas, se tomaron datos del peso total (PT). Los resultados para la detección y mapeo de QTL asociados al rendimiento de la semilla obtenida en cada evaluación se resumen en la Tabla IV.22.

Tabla IV.22. QTL asociados al peso total de semilla mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA

LG	QTL	Pobl	Ambte	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD Max (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
				Flanqueantes						
III	ept3.5	PopESP	ZI 08	<i>PepC</i>	<i>AB68</i>	<i>PepC</i>	74,44	3,34	5,58	0,11
IV	ept4.2	PopESP	ZI 08	<i>AA285</i>	<i>AC32</i>	<i>AB31</i>	40,12	3,80	10,69	-0,12
	fpt4.1	PopFRA	ZI 08	<i>281x1</i>	<i>NTH1</i>	<i>281x1</i>	0,15	54,87	1,81	0,00
VI	fpt6.2	PopFRA	ZI 08	<i>Gsp</i>	<i>PSGSR1</i>	<i>Gsp</i>	75,97	54,55	47,68	2,25

Codificación de los QTL: e: QTL detectado en la población de mapeo POPESP, f: QTL detectado en la población de mapeo POPFRA, pt: peso total semillas, primer dígito, grupo de ligamiento en el que se ha detectado el QTL, segundo dígito: número de marcador asociado.

En general, se ha detectado un menor número de QTL asociados al peso total de semilla cosechada que respecto a los otros caracteres analizados previamente. En este caso se localizaron tres QTL asociados a tres de los siete grupos de ligamiento en la población PopFRA. Sin embargo, en la PopESP sólo se localizaron dos QTL asociados a los grupos de ligamiento: LGIII (ept3.5) y LGIV (ept4.2). El QTL asociado al grupo de ligamiento LGIII (ept3.5), se vinculó al genotipo tolerante del *locus PepC*. Por otra parte, el QTL obtenido para PopESP (ept4.2) mostró un valor LOD bajo, pero alcanzó a explicar más del 10% de la varianza mostrada por este rasgo en PopESP. En LGVI sólo se localizó un QTL asociado al peso total en las evaluaciones de PopFRA (fpt6.2), el cual fue el único QTL asociado al peso total en PopFRA y cuyo valor LOD superó 54, explicaba el 47,68% de la varianza obtenida para este rasgo en PopFRA y su efecto aditivo era elevado y asociado al genotipo tolerante, siendo susceptible de ser un buen candidato para MAS.

En resumen, el análisis CIM mostró un efecto predominante del QTL fpt6.2 en LGVI, el cual explicaba hasta un 47,68% de la varianza explicada, junto con unos valores LOD altos y efectos aditivo elevado y con signo positivo, es decir, asociado al genotipo tolerante a heladas, Champagne, a través del *locus Gsp*. Resultando secundario el QTL detectado en LGIV, ept4.2, con un 10,69% de la varianza explicada y asociado al genotipo susceptible del *locus AB31*.

Detección y mapeo de QTL asociados al peso de 100 semillas

Por último, se obtuvo el peso medio de 100 semillas. Los análisis CIM realizados sobre este rasgo detectaron un número reducido de QTL, restringidos todos a regiones concretas de los mapas de las poblaciones PopESP y PopFRA, tal y como se muestra en la Tabla IV.23. En dicha tabla se observa que sólo los QTL de LGIII y LGV fueron detectados en ambas poblaciones evaluadas.

Sólo se detectaron dos QTL asociados a este carácter en PopFRA ligados a los grupos de ligamiento LGIII (fpcs3b.1) y LGV (fpcs5.4). Entre estos QTL destacó el QTL ligado a LGIII ya que alcanzó a explicar el 45,10% de la varianza obtenida. En la población PopESP se localizaron dos QTL, uno

asociado al *locus* AA399 del LGV (epcs5.7), el cual explicaba un 9,33% de la varianza y se asoció al genotipo susceptible y, un QTL localizado próximo al marcador AA345 (epcs7.1) que explicaba el 15,45% de la varianza.

Tabla IV.23. QTL asociados al peso de cien semillas mapeados en las poblaciones PopESP y PopFRA

LG	QTL	Pobl	Ambte	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD Max (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
				Flanqueantes						
III	fpcs3b.1	PopFRA	ZI 08	<i>PSADH1</i>	<i>AA175</i>	<i>PsAAP2</i>	48,18	3,86	45,10	0,47
V	epcs5.7	PopESP	ZI 07	<i>AA399</i>	<i>AC58</i>	<i>AA399</i>	184,26	9,33	4,08	-0,05
	fpcs5.4	PopFRA	ZI 08	<i>AB146</i>	<i>64x45</i>	<i>AB146</i>	16067	2,54	1,68	0,12
VII	epcs7.1	PopESP	ZI 08	<i>AA345</i>	<i>AA369</i>	<i>AA345</i>	0,10	2,50	15,65	0,23

Codificación de los QTL: e: QTL detectado en la población de mapeo POPESP, f: QTL detectado en la población de mapeo POPFRA, pcs: peso de cien semillas, primer dígito, grupo de ligamiento en el que se ha detectado el QTL, segundo dígito: número de marcador asociado.

Es destacable la presencia en LGIII de un QTL ligado al marcador *PsAAP2*, asociado al peso de cien semillas, ya que éste marcador se situó adyacente a *AA175* en dicho grupo de ligamiento. Los QTL asociados a rasgos como el inicio y fin de floración, la fecha de cosecha y la formación de ramificaciones han mostrado QTL en la misma región, todos ellos con porcentajes de varianza explicada, relativa a cada evaluación, elevados. Asimismo, se localizaron QTL en dicha región para los rasgos número y peso total, aunque en ambos rasgos los valores R² no fueron altos.

La detección de QTL ligados a caracteres relacionados con semilla ha vuelto a verse afectada por la localidad y la población evaluada. De forma similar al número de semillas en la localidad de Zamadueñas, en que un solo QTL explicó casi el 99% de la varianza en PopESP, ocurrió para el peso total y el peso de cien semillas en las evaluaciones realizadas en Zamadueñas para la campaña 2007-2008 en la población PopFRA, obteniendo en cada caso un QTL que por sí solo explicaba más del 45% de la varianza para cada rasgo.

En relación al solapamiento entre QTL el número de semillas mostró QTL mayoritarios en LGII y LGIV, en este último caso con un claro efecto dominante y varianzas explicadas ligeramente superiores, 14%. En cuanto al peso total, se encontraron QTL localizados en LGIII y LGIV, destacando en el primero valores LOD elevados, y en el segundo un mayor valor R². Por último, el peso de cien semillas se repartió, en ambas poblaciones, entre los grupos de ligamiento LGIII y LGV, todos con efecto aditivo positivo y valores de R² bajos.

En comparación con trabajos publicados en relación a QTL asociados a rendimiento y caracteres relacionados con semilla nuestros resultados son coincidentes en líneas generales. Irzykowska y Wolko (2004) obtuvieron QTL mediante mapeo por intervalos (IM) de caracteres asociados a rendimiento y contenido proteico en guisante, diferenciando entre poblaciones procedentes de F₂ y F₄. Nuestros

resultados se han mostrado similares a los obtenidos por estos autores en cuanto a la localización de los QTL con mayor varianza explicada al comparar los QTL obtenidos en F_2 con los mostrados en este trabajo. En concreto, los QTL con mayor varianza explicada coinciden para el número de semilla en LGIV y LGVII, y en el peso de cien semillas con respecto a los QTL detectados en LGIII y LGVII. Sin embargo, ambos trabajos no son totalmente comparables ya que el tipo de poblaciones difiere en su avance generacional, ya que sus poblaciones se derivaron de generaciones F_2 , mientras que en nuestro estudio, las RILs proceden de F_6 en la población PopESP y de F_8 en el caso de PopFRA. Del mismo modo, tampoco coincide el tipo de análisis empleado para la detección de QTL, ya que el método de detección se basó en mapeo por intervalos (IM) mientras que el método empleado en este trabajo fue mapeo por intervalos compuestos (CIM). Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de comparar resultados es la posible influencia de los ambientes evaluados en ambos trabajos, incluyendo las fechas de siembra utilizadas. En relación a los QTL asociados al rendimiento en semilla y los componentes de rendimiento y desarrollo obtenidos por Timmerman-Vaughan *et al.* (2005), nuestros resultados han sido coherentes con este trabajo. Así, los QTL asociados a número de semilla han resultado coincidentes con los de nuestro trabajo en los grupos de ligamiento LGI, II, III, IV y VII, coincidiendo además los de mayor varianza explicada en LGIV y VII. En cuanto al peso total de semilla, la coincidencias aparecen en LGIII, IV y VI, y de nuevo aparecen como QTL importantes los localizados en un mismo grupos de ligamiento: LGIV. El peso de cien semillas fue comparado con el peso de 1000 semillas (TSW) ya que en el mismo trabajo este valor es obtenido a partir del peso de cien semillas. Las coincidencias en este carácter aparecen en LGI, LGIII y LGVII, y de nuevo los valores máximos de varianza explicada se alcanzan por aquellos QTL asociados a los grupos LGIII y VII. Sin embargo, hay que tener nuevamente en cuenta que, en este caso, la población evaluada deriva de una generación F_2 , la siembra se ha realizado en primavera, y nunca en otoño-invierno, para todas las localidades y años evaluados. No obstante, sí coincide el tipo de análisis realizado en la detección de QTL, ya que en ambos casos se utilizó CIM.

En ambos trabajos (Irzykowska y Wolko, 2004; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005) el tipo de marcadores utilizado, mayoritariamente AFLP, imposibilita ahondar en mayores correspondencias entre sus mapas y los obtenidos en este trabajo, ya que no se dispone de ningún marcador puente, impidiendo así la comparación entre la localización exacta de los QTL y la detección de solapamientos.

Asociación entre QTL en los distintos cruzamientos

En las Figuras IV.33 y Figura.34 se representan las QTL asociados a cada carácter y localizados sobre los diferentes grupos de ligamiento, correspondiendo la longitud total a la región del grupo de ligamiento en la cual el $LOD \geq 2,50$ y la barra a la región dónde se alcanzaban los máximos valores LOD asociados a cada QTL.

Las situación de todos los QTL detectados en la población Cheyenne x ZP-1366, PopESP, se resume en la Figura IV.35. Sobre el mapa de ligamiento se observó como en todas las regiones en las que se localizaron QTL para INF también se situaron QTL asociados a FIF, como cabía esperar. Asimismo en LGIII y LGVII coincidieron los QTL para INF y FIF asociados mayoritariamente a siembra de primavera. Sin embargo, en LGI ambos rasgos coincidieron aunque Einf1 se debió mayoritariamente a siembra primaveral, mientras que Efif1 fue debido a siembra otoñal. El caso contrario ocurrió en LGII y LGVI en los que Efif2, Efif6a y Efif6b se localizaron bajo condiciones de siembra de primavera, y Einf2 y Einf6 correspondieron a siembra otoñal. Sólo los QTL del grupo de ligamiento IV (Einf4a, Einf4b y Efif4) y V (Einf5a, Einf5b y Efif5) se debieron en ambos casos a siembra en otoño. Además, ambos rasgos, INF y FIF, mostraron en los mismos QTL valores LOD y porcentajes de varianza explicada relacionados entre sí. Asimismo los QTL asociados a cosecha (Ecos) coincidieron casi completamente con los asociados al inicio y el fin de floración. Sin embargo, los valores LOD y los porcentajes de varianza explicada obtenidos para los QTL asociados a cosecha no presentaron correlación alguna con los obtenidos para los QTL asociados al inicio o fin de floración, posiblemente debido a un efecto ambiental.

En relación a los QTL asociados a los rasgos cuantitativos a nivel de semilla se observó la coincidencia de uno de los QTL asociados al número de semilla (Enum4) con el peso total de semilla (Ept4) en LGIV. El QTL Ept3 se solapó con el QTL asociado al peso de 100 semillas en LGIII (Epcs3). El peso de 100 semillas y el número de éstas mostraron QTL en los grupos de ligamiento LGI y LGVII, además de en LGIV, sin embargo en los dos primeros no hubo solapamiento entre los QTL. Lo mismo ocurrió en LGV y los QTL asociados al peso total (Ept5) y el peso de cien semillas (Epcs5). En concreto, el peso de cien semillas en LGV (Epcs5) se situó aislado del resto de QTL. De forma aislada se localizaron Epcs2 en LGII y Enum6 en LGVI, en ambos casos no coincidieron con rasgos asociados a semillas, pero sí con la disposición de QTL referentes a la fecha de fin de floración y de cosecha.

El mapa de ligamiento correspondiente a la población de origen francés, Terese x Champagne (PopFRA) con la situación de los QTL más destacados se muestra en la Figura IV.35. Al comparar los resultados con respecto a la Figura IV.35 se observaron diferencias en la distribución de los QTL. En primer lugar, se observó que la coincidencia entre los QTL asociados a INF e FIF sólo se localizó en LGIII, coincidiendo con los únicos QTL detectados para este último rasgo (Ffif3a y Ffif3b). Además, en este grupo de ligamiento y en LGI, LGV y LGVI se localizaron los QTL para INF y FIF debidos a siembra en primavera.

QTL en PopESP (Cheyenne x ZP-1366)

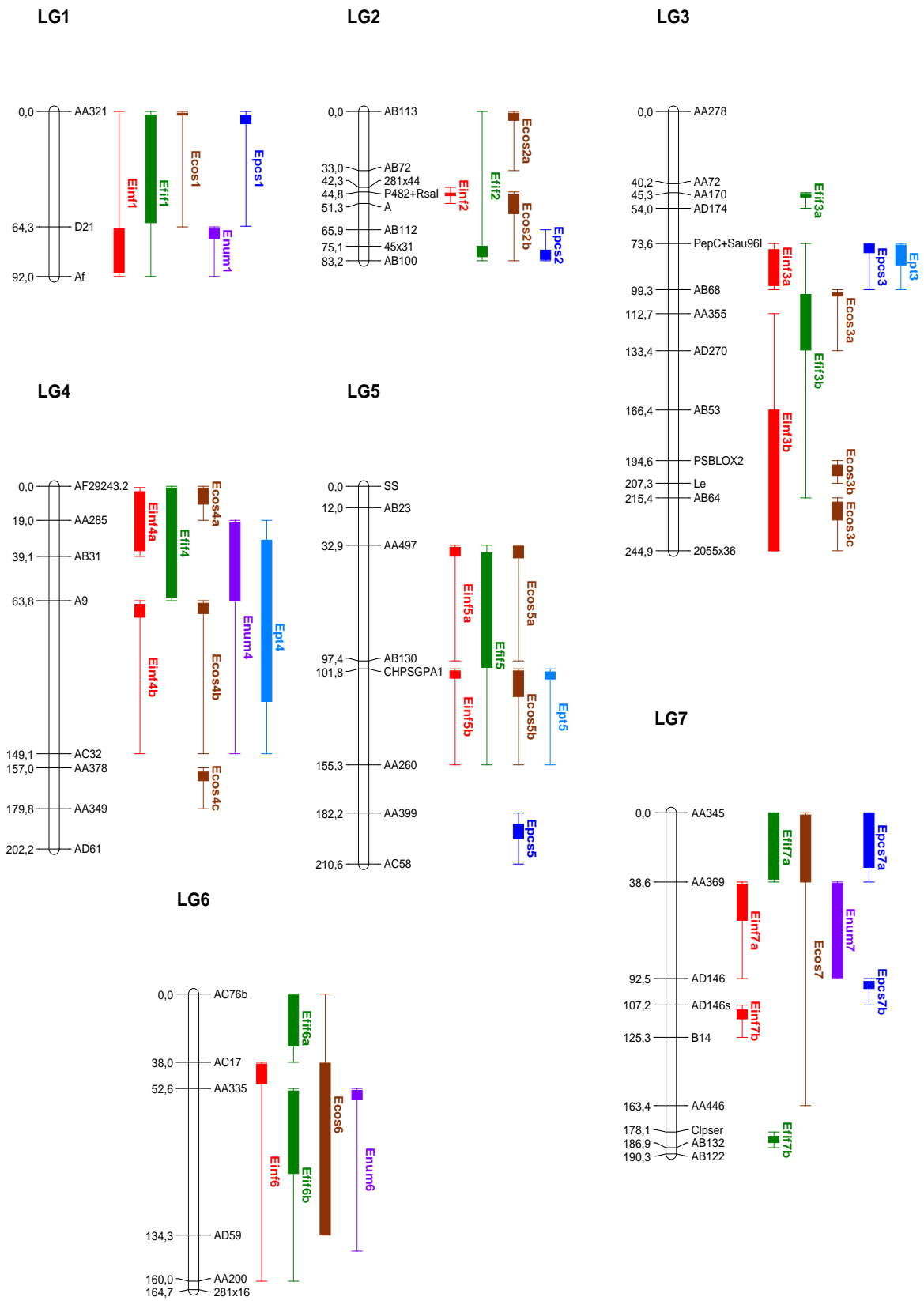


Figura IV.33. Mapa de QTL sobre la población PopESP

En la población PopFRA, los tres QTL asociados al número de semilla se solaparon con los asociados al peso total de semilla y se localizaron en LGII (Fnum2 y Fpt2), LGIII (Fnum3b y Fpt3b) y LGIV (Fnum4 y Fpt4), estando en este último grupo de ligamiento aislados del resto de QTL. El peso total de semillas, además de mostrar QTL coincidentes con el número de semillas, también se detectó en LGIIIa y LGVI. El peso de cien semillas presentó cuatro QTL en LGIIIb, LGV y LGVII, coincidiendo con INF en todos los casos.

En resumen, al analizar las relaciones entre los QTL asociados a diferentes rasgos cuantitativos en PopESP, destacó el solapamiento de la mayoría de los QTL detectados para el inicio y fin de floración, así como para la fecha de cosecha. Igualmente, coincidieron los QTL de inicio y fin de floración asociados mayoritariamente a la siembra primaveral en LGIII y LGVII, mientras que los QTL asociados a la siembra otoñal para ambos rasgos se localizaron los grupos LGIV y LGV y de forma compartida se localizaron en LGI, II y VI. En PopFRA, la colocalización de QTL para el inicio y fin de floración sólo ocurrió en LGIII. Estos solapamientos en LGIII vuelven a dar consistencia a la hipótesis en la que este grupo de ligamiento, y en concreto la región cercana a AA175, juega un papel clave en la floración y su relación con la dureza invernal.

En cuanto a la caracterización de QTL relacionados con la semilla obtenida tras la siembra otoñal, en ambas poblaciones se han solapado los QTL en LGIV correspondientes a peso total y número de semillas, mientras que en LGIII ha coincidido la presencia en ambas poblaciones de QTL asociados al peso total. Sin embargo, en PopESP este rasgo se solapa con el peso de cien semillas, mientras que en PopFRA se solapa con el número de semillas. Por tanto, se demuestra que hay relación entre los tres rasgos evaluados aunque dicha relación no se ha mostrado específica en ningún caso.

La relación entre caracteres asociados a floración y rasgos asociados a semilla se refleja por el solapamiento de QTL en la mayoría de los grupos de ligamiento entre alguno de los rasgos asociados a semilla y el inicio de floración. Estos solapamientos han sido más patentes en PopESP. La distribución de los QTL ha dependido del ambiente evaluado y la población empleada. No obstante, se ha podido comprobar cómo rasgos cuantitativos relacionados con la fenología de guisante muestran QTL en regiones coincidentes dentro de los grupos de ligamiento y su efecto depende de la fecha de siembra, mientras que los rasgos asociados a semilla y rendimiento de cosecha han sido mapeados en regiones más concretas y con tendencia a solaparse con el inicio de la floración.

Las diferencias encontradas entre los diferentes ambientes y entre poblaciones ponen de manifiesto la necesidad de evaluar conjuntamente no sólo varias localidades y campañas, tal y como sugieren Lejeune-Hénaut *et al.* (2008), sino también diferentes poblaciones.

QTL en PopFRA (Terese x Champagne)

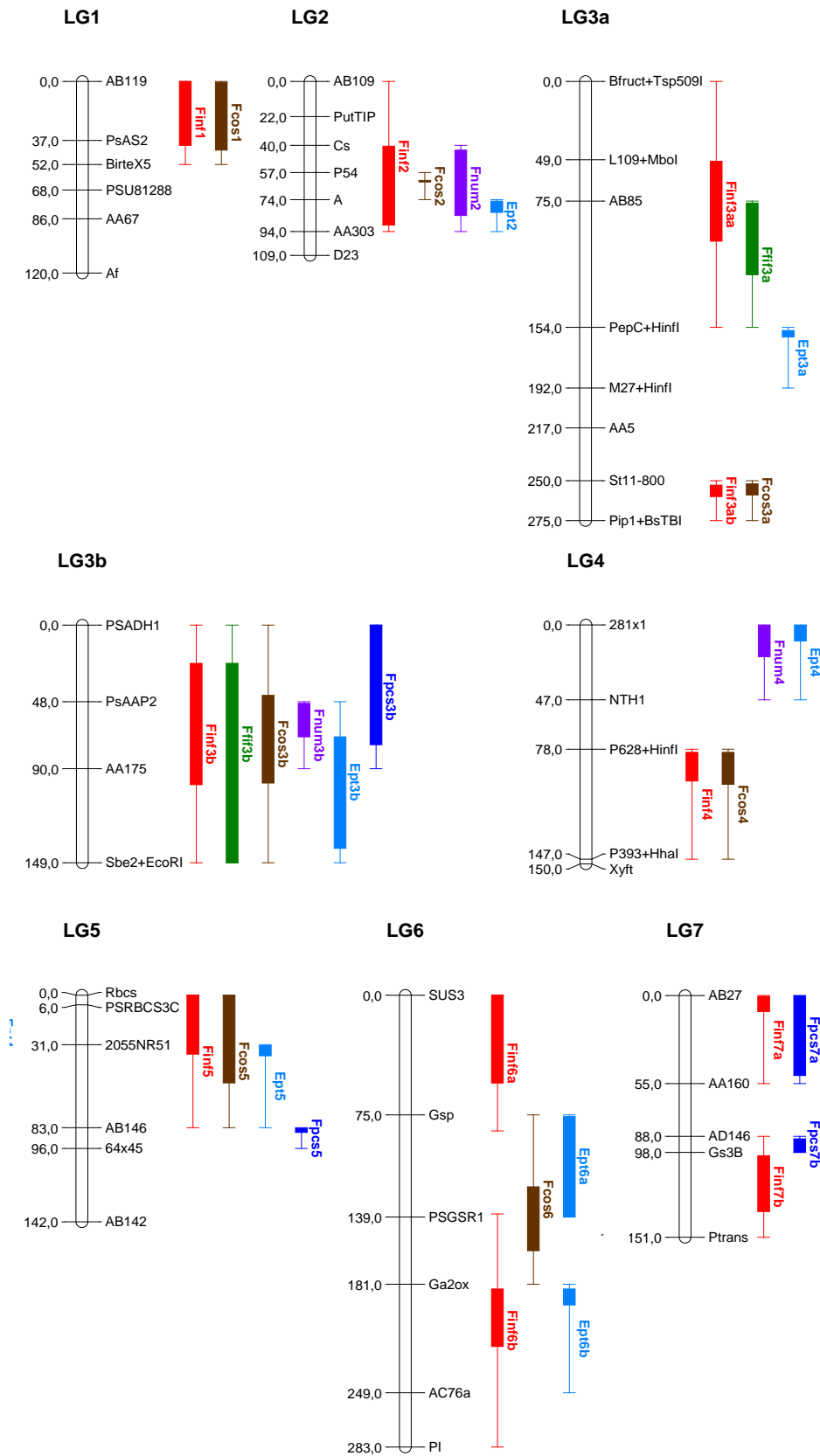


Figura IV.34. Mapa de QTL sobre la población PopFRA

2. 4. Detección y mapeo de QTL a partir del experimento en cámara climática para tolerancia a heladas

Detección y mapeo de QTL asociados a daños generales

Resultados evaluados en función de la temperatura ensayada

Temperatura de ensayo -6°C

Los daños generales se han analizado de forma independiente en cada una de las réplicas agrupándose los análisis según temperaturas. De esta forma se han podido detectar QTL correspondientes a este rasgo cuantitativo dentro de cada rango de temperaturas. En la Tabla IV.24 se muestran los resultados obtenidos tras evaluar la varianza explicada y el LOD alcanzado dentro del mapa de ligamiento.

Tabla IV.24. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -6°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
IIIb	-6dg3b.2	PSAS1	Y13321	PSAS1	12,15	20,20	1,91	-0,04
VII	-6dg7.8	AA505	AA176	AA206	190,7	46,27	1,15	0,01

Los daños generales a -6°C han mostrado dos QTL en LGIIIb y LGVII. Además, la varianza explicada obtenida en este caso ha resultado excesivamente baja, al igual que el efecto aditivo, siendo imposible discernir entre la presencia del QTL efectivo o de un artefacto estadístico.

Temperatura de ensayo -9°C

Se evaluaron de igual forma los valores obtenidos para los daños generales del ensayo llevado a -9°C. Los resultados del análisis CIM, mostrados en la Tabla IV.25, permitieron detectar un total de 19 QTL distribuidos por todos los grupos de ligamiento salvo en IV, aunque la mayoría se agruparon en los grupos LGIIIb y LGVII con 5 QTL en cada uno.

Tabla IV.25. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -9°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
Ia	-9dg1a.3	PSAS2	AB32	PSAS2	32,06	5,60	3,53	-0,10
II	-9dg2.1	ThiolP	AA332	AB113	24,38	5,83	1,44	-0,03
	-9dg2.8	P54	AA303	P54	139,63	5,16	9,80	-0,11
IIIb	-9dg3b.3	Y13321	AB111	Y13321	19,29	4,40	4,83	-0,12
	-9dg3b.6	AA72	AA355	AB140	82,62	9,28	8,39	-0,12
V	-9dg5.1	AA27	AD68	AA27	0,01	8,14	1,50	-0,02
VI	-9dg6.4	P393	AC8	P393	59,40	6,21	11,11	0,20

Con respecto a la varianza explicada, destaca el único QTL detectado en LGVI, -9dg6.4 con la máxima varianza explicada en este análisis. El efecto aditivo dependió del QTL detectado, aquellos QTL que destacaron por su efecto aditivo fueron: -9dg6.4 el único QTL del grupo de ligamiento VI siendo el único con efecto aditivo elevado y positivo; parte de los QTL del LGIIIb: -9dg3b.3, -9dg3b.6 y -9dg3b.7; en LGI: -9dg1a.3 y en LGII: -9dg2.8. No obstante, los valores LOD inferiores a los detectados bajo condiciones de -6°C.

Temperatura de ensayo -12°C

En la siguiente tabla, Tabla IV.26, se muestran los 11 QTL para daños generales que fueron localizados en el ensayo realizado a -12°C. Su distribución se centró en el grupo de ligamiento III y preferentemente en su parte inferior, IIIb, con 3 QTL entre los que destacaron dos por alcanzar los porcentajes de varianza más elevados en este ensayo: -12dg3b.8 ($R^2 = 8,91$) y -12dg3b.12 ($R^2 = 7,30$). Dentro de los QTL detectados en otros grupos de ligamiento se detectó un único QTL en LGV, -12dg5.2, que explicaba el 5,37% de la varianza, seguido por los QTL -12dg2.7 (4,74%) y -12dg7.5 (3,43%) en los grupos de ligamiento II y VII.

Tabla IV.26. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -12°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
Ia	-12dg1a.1	AA155	PSAS2	AA155	13,97	4,17	1,21	-0,01
II	-12dg2.2	AB113	AA332	AB113	24,52	6,17	2,11	0,04
	-12dg2.7	PutTIP	AA303	P54	139,77	5,50	4,74	-0,06
IIIa	-12dg3a.3	X51594	PSP4OSG	X51594	69,28	5,24	1,36	-0,01
IIIb	-12dg3b.6	AA72	AB140	AB140	82,58	2,62	2,85	-0,07
	-12dg3b.8	AA355	AB64	AD270	134,23	5,53	8,91	0,12
	-12dg3b.11	AB85	AB141	Le	225,01	4,45	7,30	-0,08
V	-12dg5.2	AD68	CHPSGAPA1	AD68	33,42	4,01	5,37	-0,07
VII	-12dg7.1	AD135	Gs3B	AD135	0,29	5,97	1,90	-0,10
	-12dg7.3	AD146	AA160	AD146	47,4	5,86	1,08	-0,07
	-12dg7.5	AB114	AA317	AB114	85,28	6,98	3,43	0,09

No se localizó ningún QTL en los grupos de ligamiento IV y VI, y los QTL en los grupos de ligamiento Ia y IIIa presentaron porcentajes de varianza explicada bajos, acompañados de efectos aditivos muy cercanos a cero, lo cual podría implicar su escaso o nulo papel en la expresión de los daños generales a esta temperatura. Nuevamente los valores LOD fueron reducidos, resultando valores muy inferiores a los hallados a -6°C y ligeramente más bajos que los detectados a -9°C.

El efecto aditivo cambió en cuanto a signo dependiendo del QTL específico, de este modo destacaron por su elevado efecto aditivo en positivo los QTL -12dg3b.8 (0,16), y -12dg7.5 (0,09), por

tanto, ligados al genotipo tolerante a la dureza nvernal. Por el contrario, los QTL que destacaron por su efecto aditivo con signo negativo se distribuyeron por los grupos de ligamiento II, IIIb, V y VII, asociados al genotipo susceptible.

Temperatura de ensayo -15°C

Por último, el análisis CIM realizado en el ensayo a -15°C para el rasgo daños generales detectó un reducido número de QTL, limitados a cuatro de los siete grupos de ligamiento descritos en guisante. Los resultados se muestran en la Tabla IV.27, en la cual se puede observar la ausencia de QTL en LGV, LGVI y LGVII.

Entre los 5 QTL detectados a esta temperatura, destacó especialmente -15dg4.1 por alcanzar la máxima varianza explicada (9,01%) con respecto al resto de QTL de este análisis. No obstante, a pesar del bajo número de QTL todos ellos mostraron porcentajes de varianza explicada por encima del 3,3%. En este caso, a -15°C, los valores LOD obtenidos fueron más elevados que los anteriores, situándose entre los resultantes en los ensayos de -6°C y -9°C.

Tabla IV.27. QTL asociados a daños generales evaluados en el ensayo de -15°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
Ia	-15dg1a.3	PSAS2	AB32	PSAS2	31,74	18,63	3,30	0,04
II	-15dg2.7	PuTIP	AA303	P54	139,60	16,68	4,08	0,03
IIIb	-15dg3b.8	AA355	AD270	AA355	108,46	2,56	5,64	-0,08
IV	-15dg4.1	AB40	AA430902	AB40	0,01	12,87	9,01	-0,02

El efecto aditivo destacó en el QTL -15dg3.8 por mostrar el efecto aditivo en negativo (-0,08) más marcado, mientras que -15dg1a.3 (0,04) y los dos QTL de LGII (ambos con un efecto de 0,03) mostraron los efectos aditivos positivos más marcados en el ensayo.

Resultados evaluados en global para el conjunto de temperaturas

Se realizó un análisis conjunto de los QTL detectados para el conjunto de temperaturas en busca de un patrón compartido. En la Figura IV.35 se muestran la distribución en los grupos de ligamiento de los QTL obtenidos para el rasgo DG en cada una de las temperaturas en el mapa de ligamiento.

A partir de los resultados observados en la Figura IV.35 y del análisis de los porcentajes de varianza explicada en cada uno de los QTL presentes en más de una de las temperaturas ensayadas se pudo obtener un patrón de presencia de QTL.

QTL Daños Generales en PopUSA (Medora x Melrose)

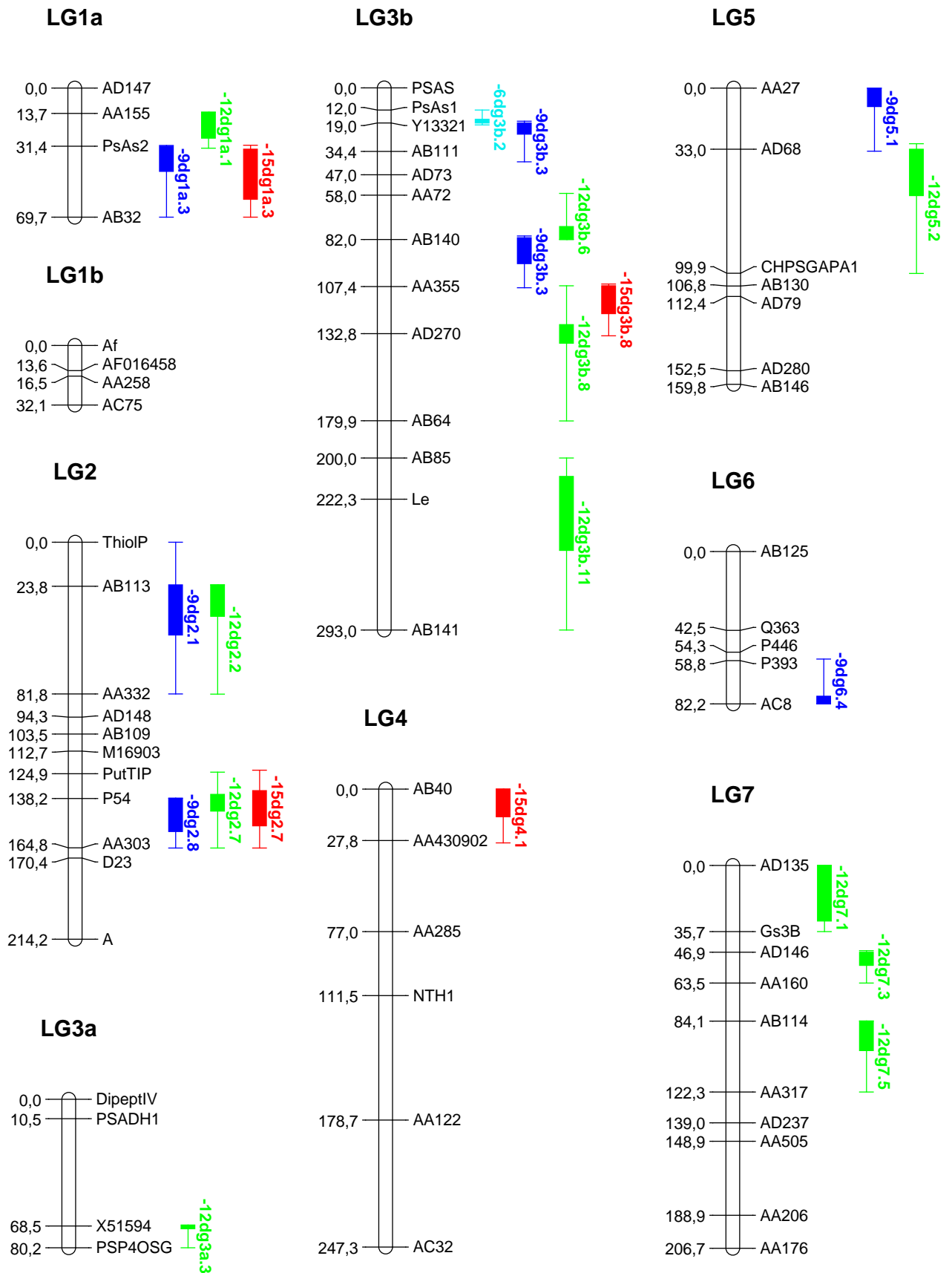


Figura IV.35. QTL asociados al daño general evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas

No se detectó ningún QTL compartido para las cuatro temperaturas ensayadas. No obstante, se observaron patrones de distribución similares dentro de rangos de temperaturas. De este modo se encontró un QTL compartido entre las temperaturas -6°C y -9°C (indicados en distintos tonos de azul en la Figura IV.35) en el grupo de ligamiento, LGIIIb (-6dg3b.2 y -9dg3b.3), próximos al *locus Y13321* y ambos con efecto aditivo negativo, asociados al genotipo susceptible.

Entre las temperaturas -9°C y -12°C (resaltados en verde en la Figura IV.35) se encontró el mayor número de QTL coincidentes. El QTL del LGII -9dg2.2 detectado a -9°C solapó con el QTL -12dg2.1 detectado en el ensayo a -12°C. Además de la región entre los *loci AB113* y *AA332* del LGII se encontraron otros tres QTL: uno en LGII en la región de los *loci P54* y *AA303*, ambos con efecto aditivo asociado al genotipo susceptible, otro en LGIIIb (-9dg3b.3 y -12dg3b.6, cercanos ambos al *locus AB140*) y uno más en LGV (-9dg5.1 y -12dg5.2), próximos ambos al *locus AD68*. Todos los QTL coincidentes entre -9°C y -12°C muestran efecto aditivo asociado al genotipo susceptible, Medora.

Entre las temperaturas -12°C y -15°C se asociaron QTL, -12dg3b.8 y -15dg3b.8 en LGIIIb entre los *loci AA355* y *AD270*, aunque en este caso los efectos aditivos son contrarios, en el caso del QTL detectado a -12°C está asociado al genotipo susceptible, y el QTL detectado a -15°C, asociado al genotipo tolerante, Melrose.

En relación a estos QTL, se observó un comportamiento muy similar en ambas temperaturas con respecto a -9dg2.8 coincidiendo con otros QTL detectados a -12°C (-12dg2.7) pero, también a -15°C (-15dg2.7). En este sentido, en LGIa también coinciden QTL en estas tres temperaturas señaladas: -9dg1a.3, -12dg1a.1 y -15dg1a.3, próximos todos al *locus PsAs2*. En el LGIIIb se concentran QTL asociados al daño general próximos al *locus AA355* detectados en las temperaturas -9°C, -12°C y -15°C. Por tanto, no se han encontrado patrones de comportamiento similares en todas las temperaturas pero si se observó a temperaturas adyacentes la presencia de QTL comunes, destacando las temperaturas -9°C y -12°C entre las que los QTL han mostrado mayor semejanza en sus características. También se observó un mayor número de QTL en cada una de estas temperaturas, mientras que las temperaturas -6°C y -15°C presentaron un menor número de QTL. La expresión de este carácter parece controlada por QTL localizados en tres grupos de ligamiento, LGIa, LGII y LGIIIb, sin embargo dichos QTL no están colocalizados sino que su situación, al igual que su efecto, difiere dependiendo de la temperatura a la que se han visto sometidas las plantas.

En relación a los QTL asociados al daño general y coincidentes en varias temperaturas cabe destacar la presencia de dos QTL, ambos situados en LGII, el primero detectado bajo las temperaturas -6°C, -9°C y -12°C, y otro bajo las condiciones -9°C, -12°C y -15°C. En el primer caso, el QTL se localizó en la región entre los marcadores *AB113* y *AA332* y el segundo se localizó próximo a *P54*. Teniendo en cuenta el mapa obtenido por Aubert *et al.* (2006) se determinó que en la región comprendida entre *AB113* y *AA332* se situaba otro marcador basado en un gen codificante para un

posible transportador de aminoácidos/péptidos, *PepTrans*. Asimismo, el marcador *P54* se corresponde con la secuencia codificante para una proteína de almacenamiento y posible precursor de una proteína de unión a sacarosa (Aubert *et al.*, 2006). Del mismo modo, entre el rango de -9°C y -15°C se han localizado QTL en la región final de LGIII, dónde se localiza otro marcador basado en un gen, en concreto *Bfruct* (Aubert *et al.*, 2006), codificante para la enzima β -fructofuranosidasa, o invertasa, implicada en la hidrólisis de diferentes azúcares.

Por último, los QTL presentes en LGVII, -12dg7.1 y -12dg7.3, muestran la asociación entre los marcadores *AD135*, *Gs3b* y *AD146* con la aparición de daños generales a -12°C . El GTM involucrado, *Gs3b*, se corresponden con la enzima glutamina sintasa (Aubert *et al.*, 2006). Esta enzima, implicada en el ciclo de la urea y en la síntesis de aminoácidos, ha sido relacionada con el estrés por altas temperaturas en arroz (Liang *et al.*, 2011) y en cereales (Zhao *et al.*, 2008). En este último caso observando diferencias entre cultivares adaptados al invierno, correlacionando la sobreexpresión de esta enzima con el diferente contenido proteico. Igualmente se ha relacionado el aumento de esta enzima con situaciones de estrés provocadas por exceso de nitrato amónico en *Catharanthus roseus* (Gou *et al.*, 2012), en presencia de cumarina en *Medicago sativa* (Cheng *et al.*, 2011), y frente a estrés salino en tomate (Ghanem *et al.*, 2011; Cervilla *et al.*, 2009). El papel de la glutamina sintasa citosólica en cereales es clave en la movilización de nitrógeno desde las hojas senescentes y su actividad en hojas en senescencia esta asociada con el rendimiento (Andrews *et al.*, 2004).

Detección y mapeo de QTL asociados a daños en tallos

Resultados evaluados en función de la temperatura ensayada

Temperatura de ensayo -6°C

El análisis del rasgo cuantitativo DT (daño en tallos), se realizó del mismo modo que en el caso anterior, DG. En un primer análisis se estudió la presencia de QTL relacionados con el daño en tallos en el ensayo sometido a -6°C , cuyos resultados se muestran en la Tabla IV.28.

Tabla IV.28. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -6°C

LG	QTL	Marcadores Flanqueantes		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
Ia	-6dt1a.1	<i>AD147</i>	<i>AA155</i>	<i>AD147</i>	0,00	14,02	1,73	-0,02
IIIb	-6dt3b.5	<i>AD73</i>	<i>AA355</i>	<i>AA72</i>	58,58	20,20	6,20	-0,16
	-6dt3b.10	<i>AB64</i>	<i>AB85</i>	<i>AB64</i>	181,81	17,65	5,37	-0,09
VII	-6dt7.4	<i>AA160</i>	<i>AB114</i>	<i>AA160</i>	64,21	14,83	3,07	-0,05

Se detectaron un total de 4 QTL situados en tres grupos de ligamiento: Ia (-6dt1a.1), IIIb (-6dt3b.5 y -6dt3b.10) y VII (-6dt7.4). Todos ellos con valores LOD entre 14 y 20,20, efecto aditivo asociado al genotipo susceptible. Los máximos porcentajes de varianza explicada se situaron en el LGIIIb, con un

máximo de 11,78% del QTL -9dt3b.5, que mostró el efecto aditivo más marcado con -0,16. Al contrario, los QTL -9dt1a.1 y -9dt7.4 mostraron la menor expresión de efecto aditivo y siendo tanto sus valores LOD como R² los más bajos.

Temperatura de ensayo -9°C

Con respecto a los QTL relacionados con DT detectados a -9°C, los resultados obtenidos (Tabla IV.29) muestran un elevado número de QTL, al igual que ocurría para DG a dicha temperatura. En este caso se detectaron un total de 11 QTL, pero a diferencia de los que ocurría en DG a -9°C, en este caso se concentraron tan sólo en 3 grupos de ligamiento I, III y VII.

Tabla IV.29. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -9°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
Ia	-9dt1a.1	AD147	AA155	AD147	0,08	43,17	4,92	0,02
IIIa	-9dt3a.1	DipeptIV	PSADH1	DipeptIV	0,09	6,92	2,86	0,04
IIIb	-9dt3b.6	AA72	AA355	AB140	82,58	43,27	5,34	-0,02
	-9dt3b.9	AD270	AB85	AB64	181,24	14,47	2,11	-0,01
VII	-9dt7.1	AD135	Gs3B	AD135	0,01	26,48	6,03	0,01
	-9dt7.5	AB114	AA206	AA505	150,37	46,06	8,69	0,01

En la base a los resultados mostrados en la tabla, destacaron en número los QTL del LGIII, divididos en IIIa (-9dt3a.1) y dos más en IIIb (-9dt3b.6 y -9dt3b.9), y del LGVII con dos (-9dt7.1 y -9dt7.5), mientras que LGI sólo contó con un QTL en su región superior (-9dt1a.1). El efecto aditivo mostró valores cercanos a cero, con excepción de un QTL con signo negativo (-9dt3b.6) y dos con un efecto aditivo ligeramente superior a cero (-9dt1a.1 y -9dt3a.1). Los mayores porcentajes de varianza explicada se encontraron en LGVII, aunque no fueron valores muy elevados (máximo 8,69%). Por su parte, los porcentajes de varianza explicada más bajos se localizaron en el grupo de ligamiento LGIII.

Temperatura de ensayo -12°C

La Tabla IV.30 muestra una nueva reducción del número de QTL detectado a -12°C con respecto a la anterior temperaturas de -9°C, como en el caso de DG. Aparecieron los mismos grupos de ligamiento que a -9°C a excepción de LGIa, que fue sustituido por LGII (-12dt2.2). De igual modo, el número de QTL presente en LGIII y LGVII se vio reducido en ambos casos. En el grupo LGIII se mantuvieron (-12dt3a.1, -12dt3b.6 y -12dt3b.9) y se añadió uno más, -12dt3b.8, mientras que en LGVII sólo se mantuvieron dos (-12dt7.5 y -12dt7.7).

Los valores LOD se vieron muy reducidos con respecto a los anteriores. Los porcentajes de varianza explicada fueron similares a los anteriores aunque disminuyó el porcentaje de varianza explicada de -12dt7.7 (2,14%) con respecto al encontrado a -9°C (-9dt7.7 con 7.61%) y aumentó en el

caso de -12dt3a.1 con 9,05% respecto de 2,86% en -9dt3a.1.

Tabla IV.30. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -12°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
II	-12dt2.2	AB113	AA332	AB113	24,14	3,68	3,50	0,11
IIIa	-12dt3a.1	DipeptIV	PSADH1	DipeptIV	0,00	4,84	9,05	0,09
IIIb	-12dt3b.6	AA72	AB140	AA72	58,68	2,75	4,31	-0,07
VII	-12dt7.5	AB114	AA317	AB114	85,21	2,53	2,14	0,05
	-12dt7.7	AD237	AA505	AD237	140,43	2,83	2,14	-0,08

El efecto aditivo volvió a alejarse de valores cercanos a cero, pero aparecieron QTL con ambos signos, -12dt3a.1 incrementó su efecto aditivo positivo (desde 0,04 a 0,09), -12dt7.5 marcó un efecto también positivo y -12dt7.7 pasó a tener un efecto aditivo en negativo (-0,08). Destacó, como efecto aditivo con mayor valor positivo el nuevo QTL posicionado en LGII, -12dt2.2, con 0,11.

Temperatura de ensayo -15°C

Los QTL ligados a DT evaluado a -15°C se muestran en la Tabla IV.31. Se observa como el grupo de ligamiento Ia volvió a presentar QTL (-15dt1a.1, -15dt1a.2 y -15dt1a.3) y también apareció un QTL en LGV (-15dt5.1). En total se detectaron 12 QTL, aumentando los QTL presentes en los grupos de ligamiento III y III, viéndose reducida de nuevo la presencia de los mismos en LGVII.

Tabla IV.31. QTL asociados a daños en tallos evaluados en el ensayo de -15°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
Ia	-15dt1a.1	AD147	AB32	PSAS2	31,91	10,58	4,11	-0,01
II	-15dt2.10	D23	A	D23	172,49	7,40	2,76	-0,08
IIIb	-15dt3b.5	AD73	AD270	AB140	83,00	10,79	9,32	-0,02
V	-15dt5.1	AA27	AD68	AA27	0,02	10,37	3,05	0,09
VII	-15dt7.4	AA160	AB114	AA160	64,14	5,17	2,13	-0,02

En líneas generales los valores LOD aumentaron ligeramente, situándose en valores entre 5 y 14, por tanto, superarían a los encontrados a -12°C. Los porcentajes de varianza explicada también aumentaban, aunque ligeramente, y se situaron entre 2,13 y 9,32. Con respecto al efecto aditivo, un número creciente de QTL mostró valores con signo negativo aunque siempre cercanos a cero, destacando en este caso -15dt2.10 (-0,08) y, con signo positivo, -15dt5.1 (0,09).

Resultados evaluados en global para el conjunto de temperaturas

Finalmente se realizó un análisis conjunto para todas las temperaturas con respecto a los QTL referentes al daño en tallos, cuyos resultados se muestran en la Figura IV.36. En este caso se detectó un

mismo QTL en todas las temperaturas evaluadas en LGIIIb, coincidiendo todos los QTL en la región asociada a los *loci* AA72, AB140 y AA355. Los valores de R^2 mostraron tendencia a disminuir al reducirse la temperatura de ensayo, al igual que el efecto aditivo, asociado al genotipo de Medora, que tendió a cercarse a cero.

En el rango de -6°C y -9°C se localizaron dos QTL coincidentes (en azul), un QTL correspondiente al grupo de ligamiento LGIIIb ($-6\text{dt}3\text{b}.10$ y $-12\text{dt}3\text{b}.9$), con porcentajes de varianza explicada similares en el rango de temperaturas y efecto aditivo y en LGIa coincidieron también ($-6\text{gt}1\text{a}.1$ y $-6\text{dt}1\text{a}.1$), aunque con efectos aditivos de signo contrario. Además, en todos los casos, los valores absolutos de los QTL detectados a -9°C eran más próximos a cero que sus correspondientes a -6°C .

Entre -9°C y -12°C se solaparon en LGIIIa, $\text{dt}3\text{a}.1$, presentaba en ambos casos valores del mismo signo, aunque tanto LOD era menor a -12°C . En cambio, R^2 y el efecto aditivo aumentaron a -12°C . Al comparar los QTL entre -12°C y -15°C tan sólo uno de ellos coincidió, $\text{dt}3\text{b}.8$ (destacado en rojo), el cual aumentó su valor LOD, R^2 y el efecto dominante mostrado al bajar la temperatura, viéndose tan solo reducido el efecto aditivo con signo negativo.

Al observar la distribución de los QTL asociados al daño en tallo solapantes en todos los ensayos realizados se observaron varios patrones de comportamiento en función de la temperatura. Se comprobó como los QTL localizados prioritariamente en LGI y LGIII ampliaban su efecto entre -9 y -12°C a LGVII. Por otra parte, en LGV y la región asociada al marcador A sólo se localizaron QTL en el ensayo a más baja temperatura. Sin embargo, los daños en tallo parecieron permanecer ligados a una región específica del LGIII (LGIIIb entre *AD73* y *AD270*), siendo su efecto aditivo con signo negativo cada vez más cercano a cero y su LOD y R^2 oscilantes a lo largo de todas las temperaturas ensayadas. Por tanto, en todos los rangos de temperatura la región terminal de LGIII vuelve a mostrar QTL, al igual que en el caso de daños generales.

El daño mostrado en tallos se asoció a un QTL presente en todas las temperaturas evaluadas, asociado a LGIIIb ($\text{dt}3\text{b}.6$). Por tanto, para los daños sufridos en tallo aparece un QTL principal en LGIIIb, entre los *loci* AA72 y AB140, junto con otros QTL con efectos dependientes de la temperatura de ensayo. En esta misma región entre los marcadores AA72 y AB140 se localizan dos GTMs según Aubert *et al.* (2006): *PepC* y *EglI*. La secuencia *PepC* codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, implicada principalmente en la fotosíntesis pero con un papel clave a nivel de metabolitos intermediarios del metabolismo de los ácidos tricarboxílicos debido a su carácter anaplerótico (Latzko, 1983; O'Leary, 1982). Diversos autores han encontrado relación entre los niveles de esta enzima bajo diferentes condiciones de estrés abiótico: osmótico, salino (Soussi *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2006), hídrico (González *et al.*, 2003; Fontaine *et al.*, 2003) o por metales (Saccardy *et al.*, 1996; Krantev *et al.*, 2008). También se han asociado variaciones en su expresión en relación a cambios en la temperatura (Chinthapalli *et al.*, 2003; Naidu y Long 2004).

QTL Daños en Tallos en PopUSA (Medora x Melrose)

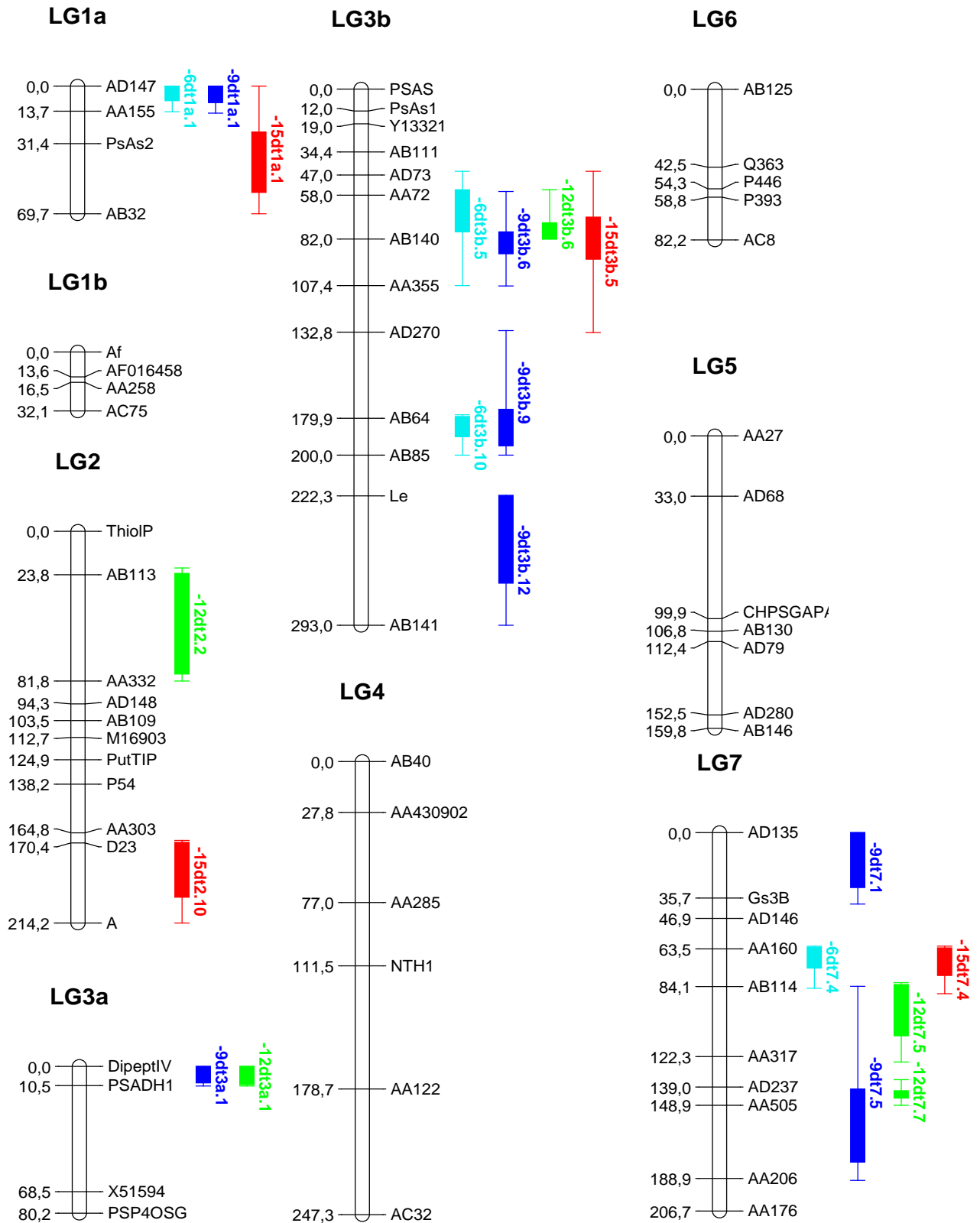


Figura IV.36. QTL asociados al daño en tallos evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas

Detección y mapeo de QTL asociados a daños en hojas

Resultados evaluados en función de la temperatura ensayada

Temperatura de ensayo -6°C

Tras el análisis realizado a -6°C se localizó un único QTL (-6dh3b.5) en LG IIIb (Tabla IV.32). La Tabla IV.32 muestra las características del QTL detectado. (-6dh3b.5), que mostró efecto aditivo con signo negativo, -0,10 y explicó un 5,45% de la varianza. Este QTL coincide en posición con el detectado a la misma temperatura en la evaluación del daño en tallos, coincidiendo igualmente con su efecto aditivo negativo, sugiriendo la asociación de ambos rasgos al genotipo susceptible a heladas esta región del genoma y, en concreto, su posible asociación con el *locus* AA72.

Tabla IV.32. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -6°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
IIIb	-6dh3b.5	AD73	AB140	AA72	58,58	6,52	5,45	-0,10

Temperatura de ensayo -9°C

La Tabla IV.33 muestra los 5 QTL detectados a -9°C para DH. En este análisis destaca que tan sólo se conservó el QTL de LGII (-9dh2.10), el cual cambió de signo en cuanto a su efecto dominante y aumentó levemente la varianza explicada.

Tabla IV.33. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -9°C

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
II	-9dh2.10	D23	A	D23	110,90	15,30	2,72	-0,01
IIIb	-9dh3b.12	Le	AB141	Le	224,82	9,25	2,54	0,06
V	-9dh5.2	AD68	CHPSGAPAI	AD68	33,80	9,61	10,53	0,08
VI	-9dh6.1	AB125	P446	Q363	42,96	3,02	17,64	0,22
	-9dh6.4	P393	AC58	P393	59,38	2,83	14,99	0,22

El grupo de ligamiento LGIIIb se mantuvo, pero el QTL se desplazó a otro *loci* (-9dh3b.12) y aparecieron otros otros QTL. Dos de ellos aparecieron en LGIV (-9dh5.2 y -9dh5.5) y dos en LGVI (-9dh6.1 y -9dh6.4). Los valores LOD obtenidos en este caso fueron menores que bajo -6°C, a excepción de -9dh2.10 que mostró un valor LOD de 15,30. Los porcentajes de varianza explicada, en cambio, se vieron incrementados, destacando claramente los dos pertenecientes a los QTL del grupo de ligamiento VI, que a su vez mostraron los mayores efectos aditivos alcanzados hasta el momento (0,22)

Temperatura de ensayo -12°C

Como en los otros rasgos cuantitativos analizados hasta el momento, el ensayo a -12°C permitió localizar un mayor número de QTL en el mapa de ligamiento, tal y como se muestra en la Tabla IV.34.

Un total de 9 QTL se detectaron en sólo cuatro de los siete grupos de ligamiento, de forma que LGIII se mostró como el grupo con mayor número de QTL con tres (-12dh3a.1, -12dh3b.5 y -12dh3b.7), dos en LGIV (-12dh4.1 y -12dh4.5), dos en LGVI (-12dh6.1 y -12dh6.4) y dos en LGVII (-12dh7.3 y -12dh7.5).

Comparativamente, los valores LOD fueron marcadamente superiores a los mostrados por los QTL detectados a -6°C y -9°C, destacando valores cercanos a 40 en LGIIIb y LGVII. Por el contrario los porcentajes de varianza explicada fueron menores en líneas generales, sólo destacando -12dh4.1 con 9,72% de la varianza explicada. La mayoría de los QTL mostraron efectos aditivos próximos a cero y en valores negativos, siendo sólo positivos los QTL de los grupos de ligamiento IIIa y IV.

Tabla IV.34. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -12°C

LG	QTL	Marcadores Flanqueantes		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
IIIa	-12dh3a.1	<i>DipeptIV</i>	<i>PSADH1</i>	<i>DipeptIV</i>	0,01	40,26	1,11	0,02
IIIb	-12dh3b.5	<i>AD73</i>	<i>AA72</i>	<i>AD73</i>	47,56	11,15	1,07	-0,01
	-12dh3b.7	<i>AB140</i>	<i>AB85</i>	<i>AB64</i>	189,70	42,76	6,20	-0,03
IV	-12dh4.1	<i>AB40</i>	<i>AA285</i>	<i>AB40</i>	0,47	13,58	9,72	0,04
	-12dh4.5	<i>AA122</i>	<i>AC32</i>	<i>AA122</i>	180,73	12,40	3,89	0,02
VI	-12dh6.1	<i>AB125</i>	<i>Q363</i>	<i>AB125</i>	0,25	19,13	2,50	-0,01
	-12dh6.4	<i>P393</i>	<i>AC8</i>	<i>P393</i>	59,44	15,62	2,88	-0,02
VII	-12dh7.3	<i>AD146</i>	<i>AA160</i>	<i>AD146</i>	47,44	39,58	2,64	-0,02
	-12dh7.5	<i>AB114</i>	<i>AA505</i>	<i>AD237</i>	140,41	44,69	4,25	-0,01

Temperatura de ensayo -15°C

Tabla IV.35. QTL asociados a daños en hojas evaluados en el ensayo de -15°C

LG	QTL	Marcadores Flanqueantes		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo
Ib	-15dh1b.3	<i>AA258</i>	<i>AC75</i>	<i>AA258</i>	16,67	43,17	3,23	-0,02
II	-15dh2.7	<i>PutTIP</i>	<i>AA303</i>	<i>P54</i>	58,40	45,14	5,70	0,02
IIIa	-15dh3a.1	<i>DipeptIV</i>	<i>PSADH1</i>	<i>DipeptIV</i>	0,05	46,24	1,58	0,01
IIIb	-15dh3b.6	<i>AA72</i>	<i>AD270</i>	<i>AB140</i>	82,93	3,68	18,43	-0,27
	-15dh3b.9	<i>AD270</i>	<i>AB85</i>	<i>AB64</i>	180,86	46,36	1,02	0,02
IV	-15dh4.1	<i>AB40</i>	<i>AA122</i>	<i>AB40</i>	0,18	45,10	4,61	0,01
V	-15dh5.2	<i>AD68</i>	<i>CHPSGAPA1</i>	<i>AD68</i>	33,91	46,70	3,36	0,01
VI	-15dh6.2	<i>Q363</i>	<i>P446</i>	<i>Q363</i>	42,95	39,67	3,37	-0,01
VII	-15dh7.7	<i>AD237</i>	<i>AA505</i>	<i>AD237</i>	140,37	37,28	3,64	0,02

En los análisis de DH realizados con el ensayo de -15°C se detectaron 10 QTL repartidos por todos los grupos de ligamiento del mapa genético (Tabla IV.35). En este sentido DH se diferenció claramente

del patrón seguido por DG y DT. En este sentido, el número de QTL asociados a DG y DT detectado a -15°C era menor que a -12°C y similar en número a los detectados a -6°C .

Los valores mostrados por todos los QTL han sido muy elevados, cercanos o superiores a 40, con excepción de uno de los QTL detectado en LGIII ($-15\text{dh}3\text{b}.6$) que, por sí solo explicó más del 18% de la varianza para estas condiciones. El resto de QTL asociados a DH, obtenidos tras heladas de -15°C , se distribuyeron en todos los grupos de ligamiento y mostraron un claro efecto dominante con signo negativo y un efecto aditivo casi nulo.

Resultados evaluados en global para el conjunto de temperaturas

En relación al análisis conjunto de todos los QTL para DH destacó que los QTL detectados a -9°C coincidían escasamente con los detectados bajo el resto de temperaturas, ya que sólo se detectó un QTL coincidente con -15°C en LGV en el cual se observó efecto aditivo asociado a Melrose. Sin embargo, si no se considera esta temperatura del análisis conjunto se localizaron más coincidencias. De este modo, sin -9°C , el QTL asociado a los marcadores AA72 y AB140, en LGIIIb, apareció en todos los casos, mostrando bajo todas las condiciones, valores LOD altos respecto al resto y efecto aditivo negativo. El porcentaje de varianza de este QTL se mantuvo constante hasta reducirse drásticamente a -15°C .

Entre -6°C y -12°C se detectó un QTL, uno ligado a LGIIIb, asociado a los loci AD73 y AA72 mostrando un mismo patrón: valores LOD altos, reducción del porcentaje de varianza explicada, efecto aditivo que descendía levemente por debajo de cero, pasando de estar asociado a Medora, a corresponderse con el genotipo Melrose.

Al comparar los QTL obtenidos a -12°C y a -15°C se localizaron tres coincidencias. Una de ellas fue el solapamiento de los QTL en LGIIIa asociado a los loci *DipeptIV* y *PSADH1*. Otros tres QTL coincidentes se detectaron en LGIIIb. Se localizaron también QTL en LGIV asociados a AA430902 y AA285 y, finalmente, uno en LGVII, en la región de los loci AD237 y AA505. A excepción de los QTL solapantes en LGIIIb, el resto de QTL mencionados mostraron un descenso marcado en el porcentaje de varianza explicada. Los QTL de LGIIIb, por el contrario, destacaron por aumentar visiblemente el porcentaje de varianza explicada y el efecto aditivo con signo negativo.

La Figura IV.37 muestra las coincidencias entre los QTL detectados. Se observa claramente la presencia de QTL para daños en hoja en los grupos de ligamiento LGIIIb y LGVII independientemente de la temperatura. También se observó que por debajo de -9°C el daño en hojas también mapeó en el grupo de ligamiento IV y se expandió su efecto a la parte superior de LGIII (IIIa). De nuevo aparece reiteradamente el grupo de ligamiento LGIIIb asociado a los daños mostrados en diferentes partes de la planta. Aunque en este caso concreto el efecto de este QTL y su varianza explicada, junto con el resto, varía dependiendo de la temperatura a la que ha sido detectado. El grupo de ligamiento VII mostró mayor efecto sobre el daño en hojas a temperaturas menos extremas (-6°C hasta máximo -12°C).

QTL Daños en Hojas en PopUSA (Medora x Melrose)

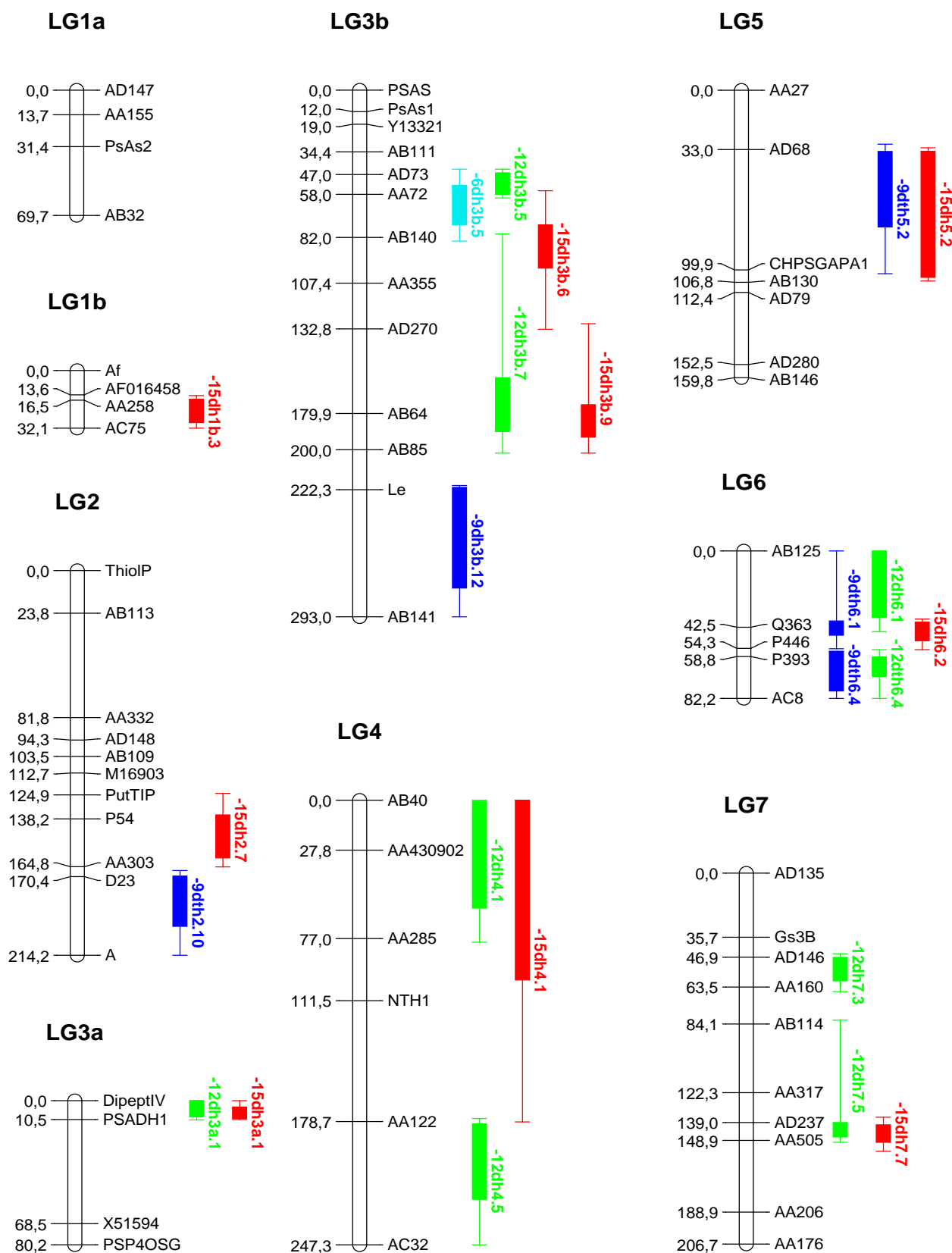


Figura IV.37. QTL asociados al daño en hojas evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas

En relación a los QTL asociados a daños en hojas detectados en el rango entre -6°C y -12°C, el QTL localizado en la región entre los marcadores *AD146* y *AA160* se corresponde con uno de los QTL con mayor valor LOD y mayor varianza explicada en cada uno de los análisis realizados. Asimismo, en relación al mapa obtenido por Aubert *et al.* (2006) dicha región agrupa otros marcadores basados en secuencias génicas como *Htrans*, codificante para un transportador de hexosas, y *Ptrans*, codificante para un traslocador de fosfato. Entre las temperaturas -12°C y -15°C se han detectado QTL solapantes en la región superior de LGIII, en la cual se sitúa *DipeptIV*, codificante para una proteína similar a la dipeptidil peptidasa IV. También se han detectado QTL en la región superior de LGIV, donde se sitúan varios GTM como *Elsa*, una proteasa, y otros relacionados con el metabolismo de azúcares como es el caso de *Sucsyn* (sucrosa sintasa), *Sps* (sucrosa fosfato sintasa), *Ufggt* (UDP-glucosa flavonoide glicosil transferasa) o *Xyft* (xilaglucono glucosil transferasa). Por último, el único QTL presente en todos los rangos de temperatura evaluados, dh3b.10, vuelve a estar localizado en la región correspondiente a *Bfruct*.

En resumen, todos los QTL asociados a daños a cualquier nivel muestran solapamientos entre las temperaturas evaluadas, siendo más evidente en dos rangos de temperaturas, un rango inicial entre -6°C y -9°C y, un segundo rango con las temperaturas más extremas, -12°C y -15°C. Asimismo, se ha observado la colocación de un gran número de QTL con GTMs relacionados con genes implicados en el metabolismo de azúcares a distintos niveles. En concreto, la reiterada detección de QTL en la región asociada a la enzima invertasa y podría ser un gen candidato a ocasionar el efecto del QTL. Esta enzima ha sido relacionada con la respuesta al estrés causado por bajas temperaturas por muchos autores y en diversas especies vegetales como por ejemplo: patata (Sin'kevich *et al.*, 2008; Artuso *et al.*, 2000), garbanzo (Kaur *et al.*, 2008; Nayyar *et al.*, 2007) o *Arabidopsis* (Usadel *et al.*, 2008), entre otras.

Detección y mapeo de QTL asociados al porcentaje de supervivencia

Comparativa entre distintos tiempos de evaluación

El porcentaje de supervivencia, en relación al número de plantas supervivientes tras los ensayos de heladas, fue evaluado a dos tiempos: después de 24 horas tras someter las plantas a heladas (%SUP-Post-Fr), y después de dos semanas (%SUP-Rec). Ambas evaluaciones se realizaron del mismo modo, con el objetivo de comprobar la fiabilidad en la primera evaluación de plantas supervivientes tras comprobar la viabilidad de cada planta después de dos semanas de recuperación.

Los análisis de las evaluaciones se realizaron siguiendo el mismo proceso que para el resto de rasgos cuantitativos y los QTL detectados se detallan en el [Anexo IV.4](#).

A diferencia del resto de rasgos evaluados, en primer lugar se realizó un análisis comparativo de los QTL detectados en cada temperatura coincidentes para ambos rasgos. Entre todos los QTL detectados tras el periodo de recuperación (%SUP-Rec), tan sólo 6 QTL no coincidieron con los obtenidos tras el análisis de los datos correspondientes a la evaluación tras heladas correspondiente a las 24 horas (%SUP-Post-Fr). Los QTL que pertenecían a los seis al ensayo sometido a -15°C y estaban ligados a los grupos LGIa (-15suprh1a.1 y -15suprh1a.2), LGII (-15suprh2.9) y LGIIIb (-15suprh3b.4, -15suprh3b.7 y -15suprh3b.8). Todos los QTL restantes detectados en recuperación presentaban coincidencia con los detectados en la primera evaluación, suponiendo el 67% de los QTL detectados tras heladas.

Estas coincidencias sugieren fiabilidad y repetitividad en las evaluaciones realizadas con 14 días de diferencia. Sin embargo, el mayor número de QTL detectado a las 24 horas indica una posible sobreestimación de los daños, lo que puede enmascarar los efectos finales de las heladas sobre la supervivencia definitiva de las plantas.

Resultados evaluados en global para el conjunto de temperaturas

El estudio comparativo permitió obtener tres QTL coincidentes (Tabla IV.36) a lo largo de todo el rango de temperaturas (resaltados en amarillo en la Figura IV.38): en LGI (suprec1a.1), en LGIII (suprec3b.7) y en LGVI (suprec6.4).

Tabla IV.36. QTL asociados a la supervivencia tras dos semanas de recuperación

LG	QTL	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD ($H_0:H_3$)	R^2 (0:1; %)	Efecto Aditivo
		Flanqueantes						
Ia	-6suprec1a.1	AD147	AA155	AD147	0,01	29,71	3,04	0,02
	-9suprec1a.1	AD147	AA155	AD147	0,01	21,72	2,30	-0,03
	-12suprec1a.1	AD147	AA155	AD147	0,09	13,85	10,18	-0,04
	-15suprec1a.1	AD147	AA155	AD147	0,01	11,71	2,55	-0,04
IIIb	-6suprec3b.7	AB140	AA355	AB140	83,02	33,51	6,00	0,03
	-9suprec3b.7	AB140	AA355	AB140	82,82	13,93	2,24	0,01
	-12suprec3b.7	AB140	AA355	AB140	82,85	6,52	2,67	0,06
	-15suprec3b.7	AB140	AA355	AB140	83,04	14,44	4,05	0,03
V	-6suprec5.5	AD280	AD79	AD79	113,53	25,39	2,10	-0,01
	-9suprec5.5	AD280	AD79	AD79	113,88	20,46	5,35	-0,05
VI	-6suprec6.4	P393	AC8	P393	59,61	32,10	4,72	0,01
	-9suprec6.4	P393	AC8	P393	59,79	69,49	1,64	-0,01
	-12suprec6.4	P393	AC8	P393	59,79	6,49	9,70	-0,06
	-15suprec6.4	P393	AC8	P393	59,64	10,99	1,88	0,07

Los tres QTL mostraron efecto aditivo positivo a -6°C . Todos ellos manifestaron oscilaciones a lo largo de los rangos de temperatura en el valor LOD y en R^2 , sin embargo la tendencia final fue a un

menor LOD y menor R^2 a -15°C . En cuanto a los QTL coincidentes en rangos de temperaturas adyacentes los resultados se muestran en la Figura IV.39. En azul se destacan las coincidencias obtenidas entre los QTL a -6°C y -9°C , en verde los QTL repetidos a -9°C y -12°C y en rojo los QTL coincidentes a -12°C y -15°C .

El análisis conjunto mostró como en el rango entre -6°C y -9°C el número de QTL coincidentes era elevado, lo que concuerda con el mayor número de QTL detectado de forma individual para ambas temperaturas. En este rango los QTL se extendieron a lo largo de todos los grupos de ligamiento, indicando un efecto generalizado sobre la supervivencia a estas temperaturas. Entre -9°C y -12°C la distribución y el número de QTL coincidentes se redujo notablemente, de forma que los QTL se situaron en los grupos de ligamiento LGI, LGII, LGIII y LGVI. Sin embargo, se detectaron varios QTL dentro de LGII y también repartidos entre IIIa y IIIb. En el rango de temperaturas más bajas se repitió el reparto de QTL anterior (LGI, LGII, LGIII y LGVI) pero, a diferencia que en el rango anterior, el número quedó más reducido.

Una revisión más detallada de los resultados a nivel del grupo de ligamiento LGV, comprobando la presencia de QTL asociados a este grupo de ligamiento, permitió comprobar la presencia de QTL coincidentes en la misma región (5.5; LGV entre *AD79* y *AD280*), tanto en la evaluación tras 24 horas como en la evaluación tras dos semanas, en la región próxima al marcador *AD79*. Estos QTL se corresponden con las evaluaciones realizadas tras someter a las plantas a temperaturas de -6°C y -9°C pero no se han detectado QTL solapantes tras el análisis realizado bajo condiciones de -12°C y -15°C . Los valores LOD obtenidos en ambas temperaturas han sido próximos a 20 y los porcentajes de varianza explicada han variado en relación a la temperatura de ensayo. De modo que, en las evaluaciones realizadas a -6°C los porcentajes de varianza explicada por este QTL han superado el 2%, sin embargo, las evaluaciones realizadas a -9°C mostraron un incremento en la importancia de este QTL asociado a este rasgo, ya que en ambas evaluaciones superó el 5% de la varianza explicada.

La evaluación de la supervivencia de las plantas tras heladas se realizó en dos tiempos, de forma que hubo una evaluación tras 24 horas y otra evaluación, siguiendo los mismos criterios, que se realizó tras un periodo de recuperación de dos semanas. Los resultados obtenidos mostraron alto grado de coincidencia al analizar los datos obtenidos para cada una de las evaluaciones. Este grado de coincidencia demuestra la fiabilidad y reproducibilidad de las evaluaciones realizadas con una separación de dos semanas. Sin embargo, la presencia de un mayor número de QTL detectado en la primera evaluación podría indicar que esta evaluación puede causar una sobreestimación de los daños, lo que sobreestimaría a su vez la estima de supervivencia final y distorsionaría los QTL detectados, tal y como se sugiere en el trabajo de Murray y Swensen (1991), ya que tras un período de recuperación la supervivencia total de la planta puede ser evaluada de una forma más precisa en plantas sometidas a heladas.

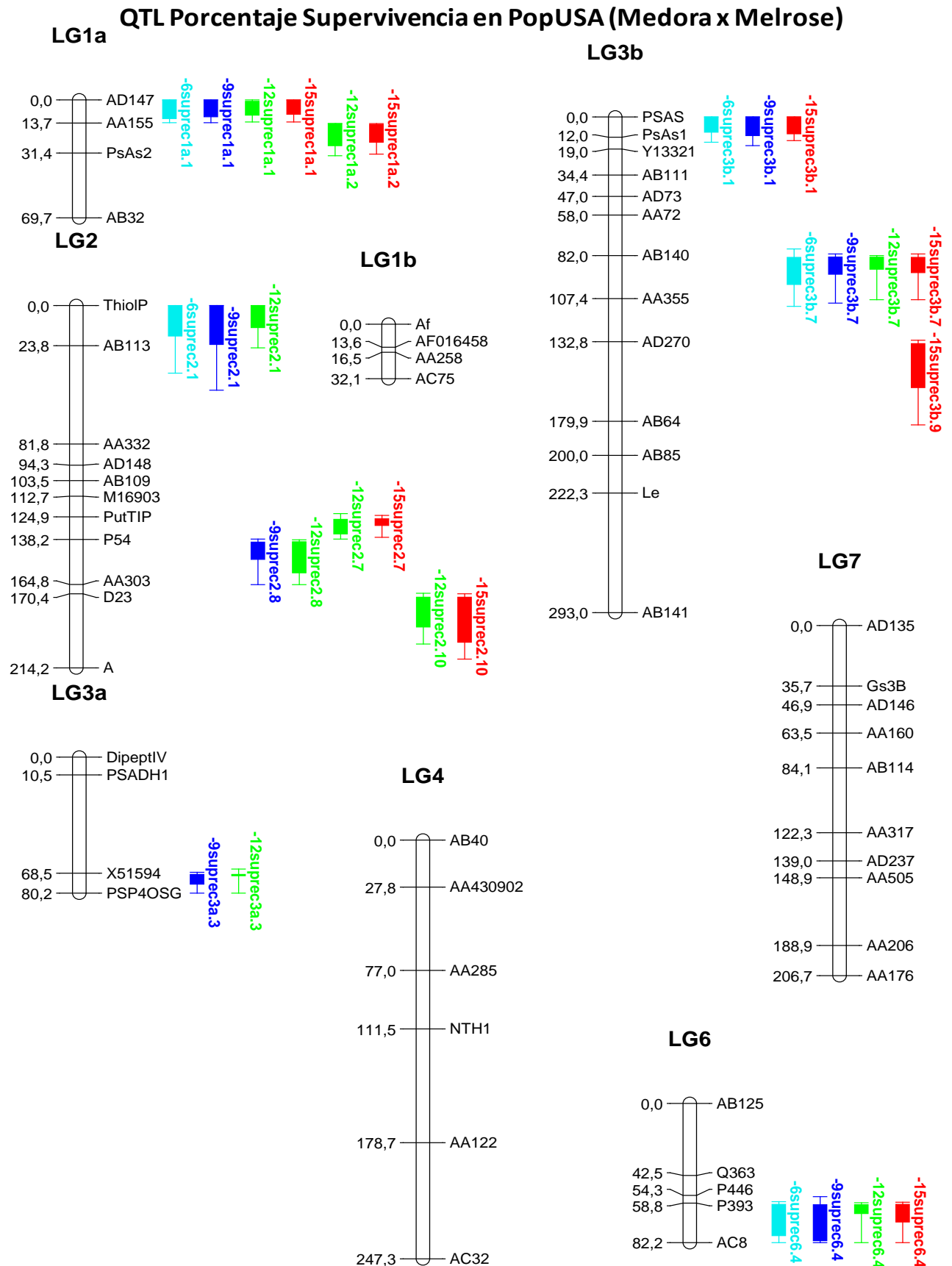


Figura IV.38. QTL asociados al porcentaje de supervivencia tras dos semanas de recuperación evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas

Tras evaluar los QTL asociados a la tasa de supervivencia dentro de cada temperatura, el análisis conjunto mostró el solapamiento de tres QTL en todo el gradiente de temperaturas: en LGI (suprec1a.1), LGIII (suprec3b.7) y LGVI (suprec6.4). En este punto se observan las coincidencias con el trabajo de Lejeune-Henault *et al.* (2008) a nivel de QTL asociados a tolerancia a heladas en campo, de forma que en su trabajo detectaron QTL en estos tres grupos de ligamiento. Estos autores también encontraron un QTL asociado a la tolerancia a heladas en LGV, el cual no ha mostrado coincidencia con nuestros análisis de todas las temperaturas pero, sí se colocan dos QTL detectados a -6°C y -9°C . Por tanto, los resultados de este trabajo son consistentes con los obtenidos por Lejeune-Henault *et al.* (2008) y sostienen, junto con los resultados obtenidos sobre QTL asociados al inicio de floración mostrados en las evaluaciones de campo, el efecto principal de un QTL asociado al *locus Hr* y el papel secundario de otros dos QTL localizados en LGI y LGVI, quedando pendiente de confirmar el efecto del QTL WFD5.1 en LGV.

Una revisión más detallada de los resultados a nivel del grupo de ligamiento LGV, permitió comprobar la presencia de QTL coincidentes una misma región próxima al marcador *AD79*, tanto en la evaluación tras 24 horas como en la evaluación tras dos semanas. Estos QTL se corresponden con las evaluaciones realizadas tras someter a las plantas a temperaturas de -6°C y -9°C pero no se han detectado QTL solapantes tras el análisis realizado bajo condiciones de -12°C y -15°C .

Los QTL asociados al porcentaje de supervivencia ligados al marcador *AD79* en el grupo de ligamiento LGV pueden estar relacionados con el QTL WFD5.1 descrito por Lejeune-Henault *et al.* (2008) y asociado a tolerancia a heladas. En este sentido, los autores describen la presencia de un QTL en una amplia región de LGV que abarca, dependiendo de la condición evaluada, desde el microsatélite *AA475* hasta *AD79* para alguna de las localidades. Nuestros resultados, localizan en dicha región un QTL asociado a la capacidad de supervivencia frente a la dureza invernal. Dicho rasgo está directamente relacionado con la tolerancia a las heladas invernales evaluadas por Lejeune-Henault *et al.* (2008), aunque no se han evaluado los mismos parámetros. Sin embargo, la coincidencia de los resultados obtenidos en ambos trabajos, al comparar evaluaciones realizadas en campo con las realizadas en cámara de ambiente controlado, permiten establecer que este QTL está vinculado a la capacidad del guisante para tolerar la heladas.

Detección y mapeo de QTL asociados al desarrollo de brotes

El último rasgo cuantitativo evaluado en los ensayos de heladas fue el desarrollo de yemas (Br). El análisis CIM para cada una de las temperaturas ensayadas, cuyos resultados se presentan en la Tabla IV.37, mostró valores LOD muy bajos, de forma que tan solo se localizaron tres QTL (sombreados en gris): uno en el ensayo a -9°C localizado en LGIV (-9br4.5), uno detectado para -12°C en LGII (-12br2.1) y uno más detectado a -15°C en LGVII (-15br7.1).

Con el objetivo de buscar un patrón de comportamiento en la evolución de este rasgo cuantitativo con respecto al descenso de temperatura se redujo el límite LOD hasta 2, aumentando entonces la detección de nuevos QTL.

Tabla IV.37. QTL asociados al desarrollo de brotes evaluados en todas las temperaturas

Temp (°C)	QTL	LG	Marcadores		Marcador Asociado	Posición (cM)	LOD (H0:H3)	R2 (0:1; %)	Efecto Aditivo
			Flanqueantes						
-9	-9br1a.1	Ia	AD147	AA155	AD147	0,05	2,40	10,03	-0,17
-12	-12br2.1	II	ThiolP	AA332	AB113	24,25	4,28	18,09	-0,24
-12	-12br3b.11	IIIb	AB85	AB141	Le	224,70	2,05	9,34	-0,17
-6	-6br4.4	IV	NTH1	AC32	AC122	180,67	2,06	19,57	0,39
-9	-9br4.5	IV	AC122	AC32	AC122	181,10	4,10	17,44	0,25
-15	-15br7.1	VII	AD135	AD146	Gs3B	36,02	2,75	9,58	-0,24

En sombreado se destacan los QTL con LOD > 2,50

A pesar de reducir el valor LOD mínimo se observó que los porcentajes de varianza explicada eran altos, superando en todos los casos el 9%. El efecto aditivo obtuvo valores negativos en todos los casos, a excepción de los QTL detectado a -6°C, y además los valores absolutos superaron los encontrados en otros rasgos. En el caso del efecto dominante los valores absolutos no alcanzaron la unidad.

Resultados evaluados en global para el conjunto de temperaturas

El estudio comparativo de los QTL detectados no mostró coincidencias entre las evaluaciones realizadas a diferentes temperaturas, aunque si se observaron QTL adyacentes entre sí en cada temperatura. Destacaron los localizados en LGIV correspondientes a la evaluación a -6°C ya que ambos explicaban aproximadamente el 19% de la varianza cada uno (Figura IV.39).

El último rasgo cuantitativo evaluado fue la formación de brotes, y la localización de QTL fue totalmente dependiente de la temperatura a la cual se evaluaron las plantas. Además los valores LOD obtenidos en todos los casos han sido muy bajos. No obstante, teniendo esto en cuenta, los QTL detectados en LGII, LGIV y LGVII superan valores LOD > 2,5, siendo los correspondientes a LGII y IV los que presentan LOD > 4 y un porcentaje de varianza explicada cercano al 18%. Estos resultados permiten esbozar la hipótesis de un desarrollo de yemas laterales dependiente del rigor de estrés por helada previo, siendo necesario plantear estudios futuros para profundizar en la evaluación y análisis de este carácter concreto.

En resumen, la formación de brotes o ramificaciones laterales parece depender de la temperatura a la que se han visto sometidas las plantas, sin embargo esta hipótesis está sujeta al bajo valor LOD establecido como límite y, por tanto, sólo puede plantearse como un indicio sobre el que se debería profundizar.

QTL Brotes en PopUSA (Medora x Melrose)

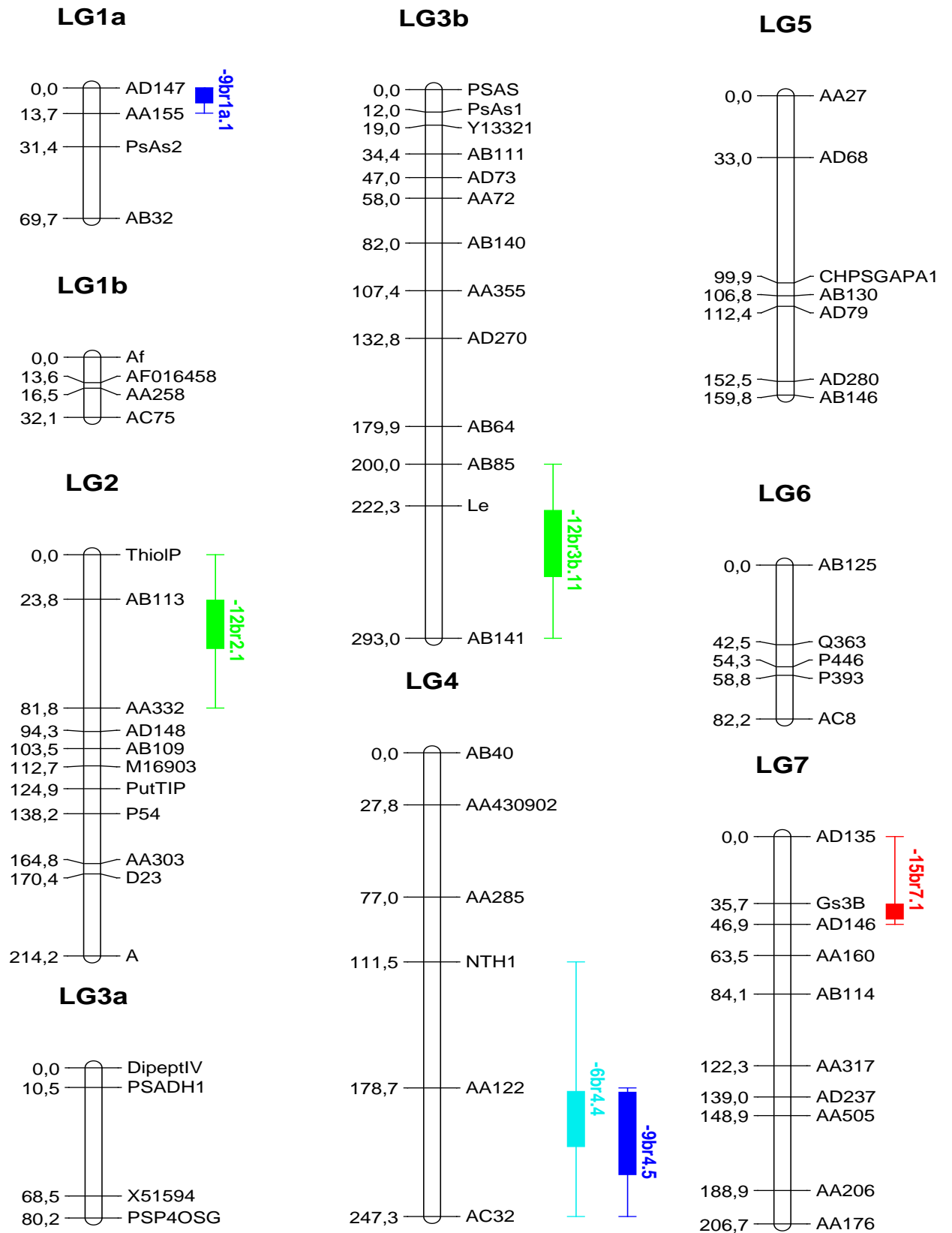


Figura IV.39. QTL asociados al desarrollo de brotes evaluado en el conjunto de temperaturas ensayadas

Si comparamos los QTL correspondientes a la formación de ramificaciones resultantes de los ensayos de heladas con los obtenidos en condiciones de campo (Tabla IV.20) mediante el mapa compuesto obtenido en este trabajo (Figura IV.31) se puede observar la coincidencia de QTL en tres regiones del mapa. En LGIII coincidieron los QTL correspondientes a PopESP (eram3.10) y a PopFRA (fram3a.1) con -12br3b.11, en la región de los *loci Le* y *AB64*, aunque en el caso de los dos QTL de campo estaban asociados a los genotipos tolerantes a heladas mientras que, en el caso de los ensayos de -12°C el QTL mostró efecto aditivo vinculado al genotipo susceptible. En LGVII el QTL detectado a -15°C (-15br7.1) coincide en posición con el QTL detectado en PopESP (eram7.2), asociados ambos al *locus ADI46*. Por último, los QTL correspondientes a PopESP, eram4.5, y PopFRA, fram4.2, solapan en la misma región que los QTL correspondientes al ensayo de -6°C, -6br4.4, y de -9°C, -9br4.5 en una región próxima al *locus NTH1*. En este último grupo de ligamiento, los QTL detectados bajo condiciones controladas de heladas mostraron efecto aditivo elevado y vinculado al genotipo tolerante, Melrose, al igual que en el caso de PopFRA, también con efecto aditivo vinculado a Champagne. La comparativa entre los QTL obtenidos en campo y en cámara para la formación de ramificaciones han mostrado coincidencias. No obstante, estas coincidencias se encuentran limitadas a determinadas regiones y dependientes de la temperatura. Es destacable el solapamiento entre los QTL obtenidos en ambas poblaciones en condiciones de campo con los ensayos de heladas a -6°C y -9°C, mostrando una posible correlación en su control genético.

En relación con la asociación de estos QTL detectados con secuencias génicas ancladas a dichas regiones el mapa de Aubert *et al.* (2006), junto con los marcadores puente obtenidos en este trabajo y anclados al mapa PopUSA, han permitido establecer la correspondencia del QTL asociado al grupo de ligamiento LGII, localizado en la evaluación a -12°C, con los GTM *ThiolP* y *PepTrans*, y en LGVII el QTL detectado tras la evaluación a -15°C con el GTM *Gs3b*. En concreto, los GTM *Peptrans* y *Gs3b* se corresponden con GTM también asociados a los QTL localizados en relación a los daños generales mencionados anteriormente. Los tres GTM comparten su relación con el metabolismo proteico, destacando su implicación en la asimilación de nitrógeno y la movilización de aminoácidos y oligopéptidos.

Evaluaciones por temperatura de todos los rasgos evaluados

Todos los QTL obtenidos para los diferentes rasgos cuantitativos evaluados se situaron en el mapa de ligamiento según su asociación a los diferentes *loci* anclados al mapa, según la temperatura a la que se realizó la evaluación, tal y como se muestra en las Figuras IV.40 y IV.41.

La disposición de los QTL en el mapa permitió comprobar la distribución similar de muchos de los QTL descritos según rangos de temperatura tal y como se comentó anteriormente.

Se analizó la disposición de los QTL asociados a los diferentes rasgos evaluados para cada

temperatura en busca de patrones de comportamiento similares y relaciones entre rasgos. La visualización en el mapa permitió observar cómo los QTL correspondientes al rasgo cuantitativo de supervivencia tras recuperación aparecieron solapados a QTL asociados a daño general y daño en tallo. Sin embargo, al ser evaluado en temperaturas inferiores los QTL detectados se solapan con daños en hoja y, fundamentalmente, con daños en tallo.

Del mismo modo, se comprobó que los QTL asociados a la formación de brotes se localizaban en el mapa de ligamiento de forma independiente a otros QTL, aunque al reducirse la temperatura la formación de brotes apareció ligada a QTL asociados con el daño en tallo.

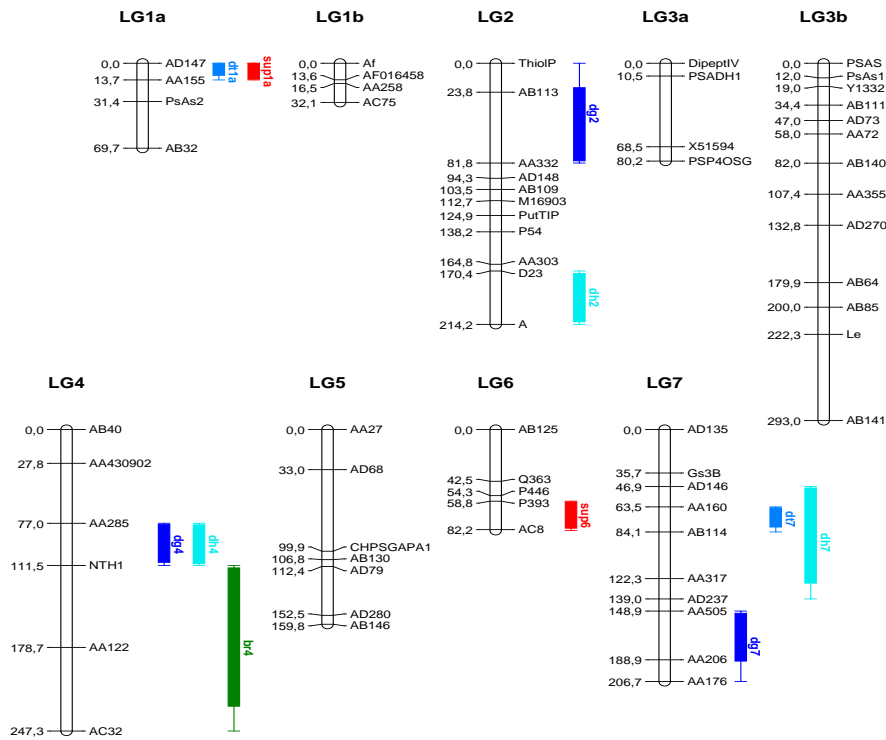
A temperaturas de -6°C y -9°C tanto la supervivencia como la capacidad para formar nuevos brotes no se encontró asociada fuertemente con otros de los rasgos cuantitativos, mientras que a temperaturas de -12°C y -15°C estos rasgos se asociaron con el dalo sufrido en tallos.

Otra característica observada en los mapas de ligamiento fue la aparición de QTL de forma creciente en grupos de ligamiento en los que a -6°C no presentaban ningún QTL (LGIa, LGIIIa y LGV) o sólo uno (LGVI). Por tanto, parece ser que al reducirse la temperatura, los efectos sobre la planta de guisante afectan a un mayor número de genes. La distribución de este creciente número de genes involucrados en cada rasgo se muestra a través de la expansión del efecto de la expresión de dicho rasgos asociado a otras regiones del mapa.

Los resultados obtenidos en la detección de QTL asociados a la tolerancia a heladas y asociados a caracteres agronómicos afectados por la dureza invernal han mostrado diferentes efectos a nivel del genoma de guisante. Se ha detectado un elevado número de QTL y se ha comprobado el efecto de la temperatura y el rigor invernal en la asociación de los QTL mostrados en diversos grupos de ligamiento o asociados a diferentes *loci*.

Finalmente, y tras observar la presencia de solapamientos entre QTL detectados en temperaturas próximas para la mayoría de los rasgos evaluados, se estudió la distribución de los mismos dentro de mapas de ligamiento según temperaturas. Este estudio permitió observar asociaciones interesantes entre diferentes rasgos cuantitativos. De esta forma, se observó la colocalización de los QTL asignados a supervivencia tras recuperación con los asignados a daño general y daño en hoja a temperaturas de -6°C y -9°C . Sin embargo, a menores temperaturas los QTL asignados a la supervivencia se mantienen solapados con el daño en hoja, pero pasan a solaparse con el daño en tallo en vez de mantenerse solapados con el daño general.

-6°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)



-9°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)

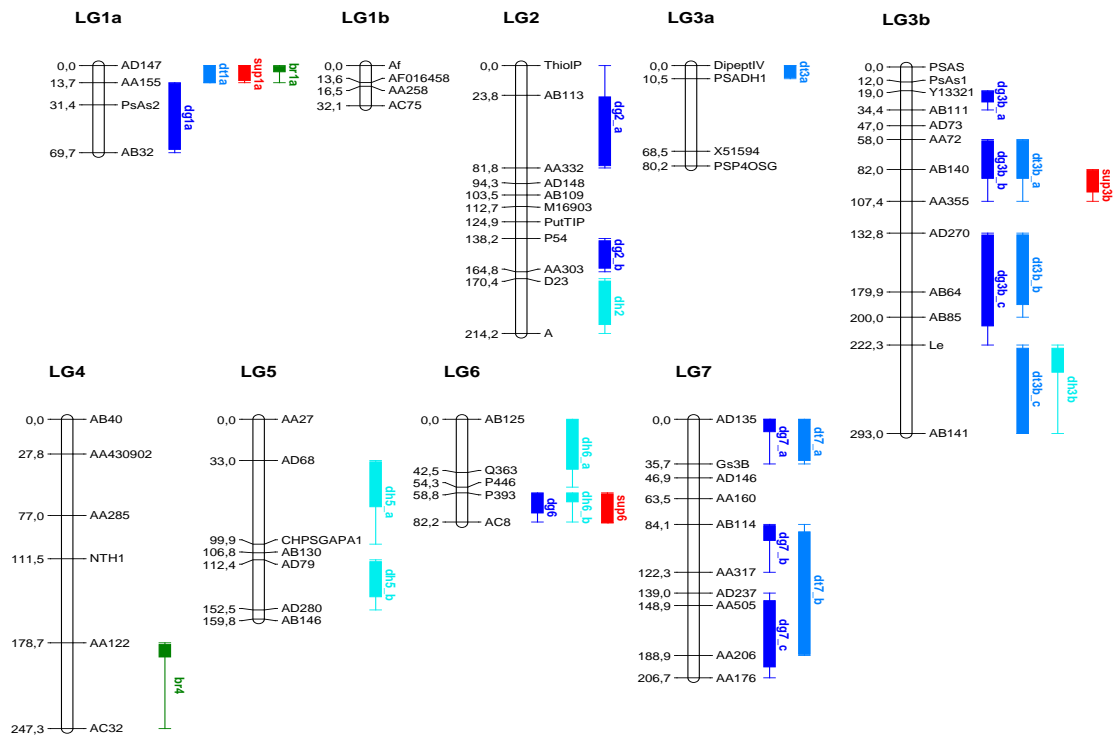
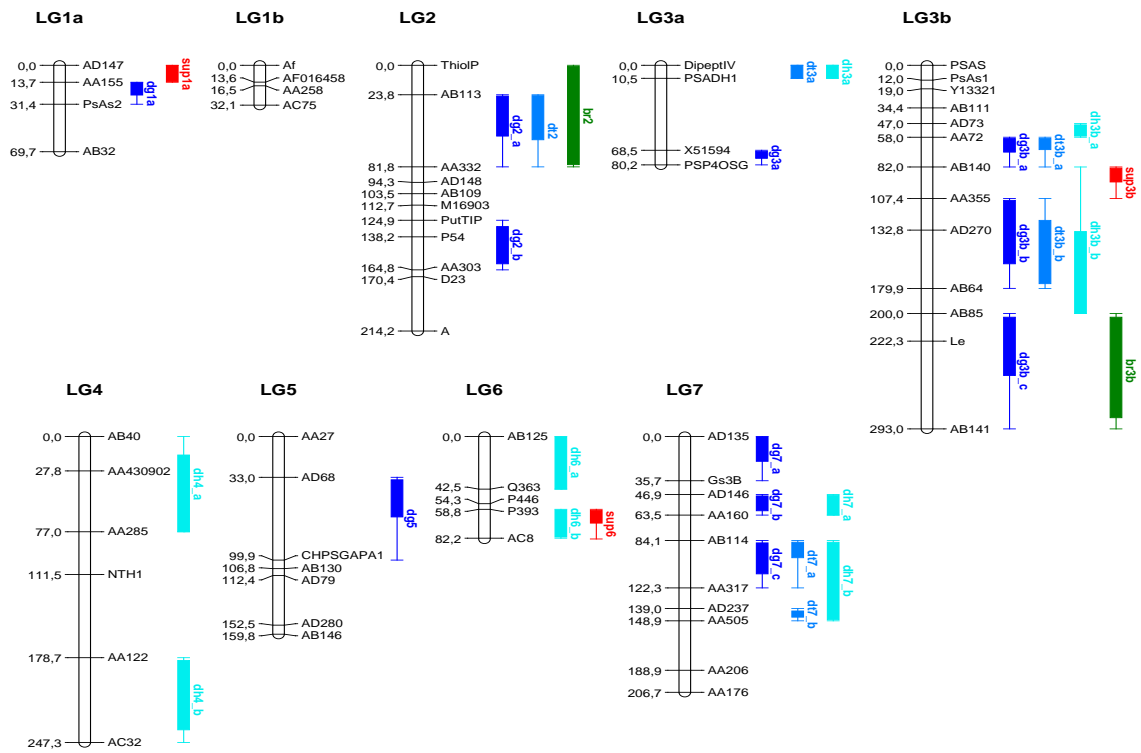


Figura IV.40. Mapas de QTL asociados a tolerancia a heladas a partir de los ensayos a -6°C y -9°C

-12°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)



-15°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)

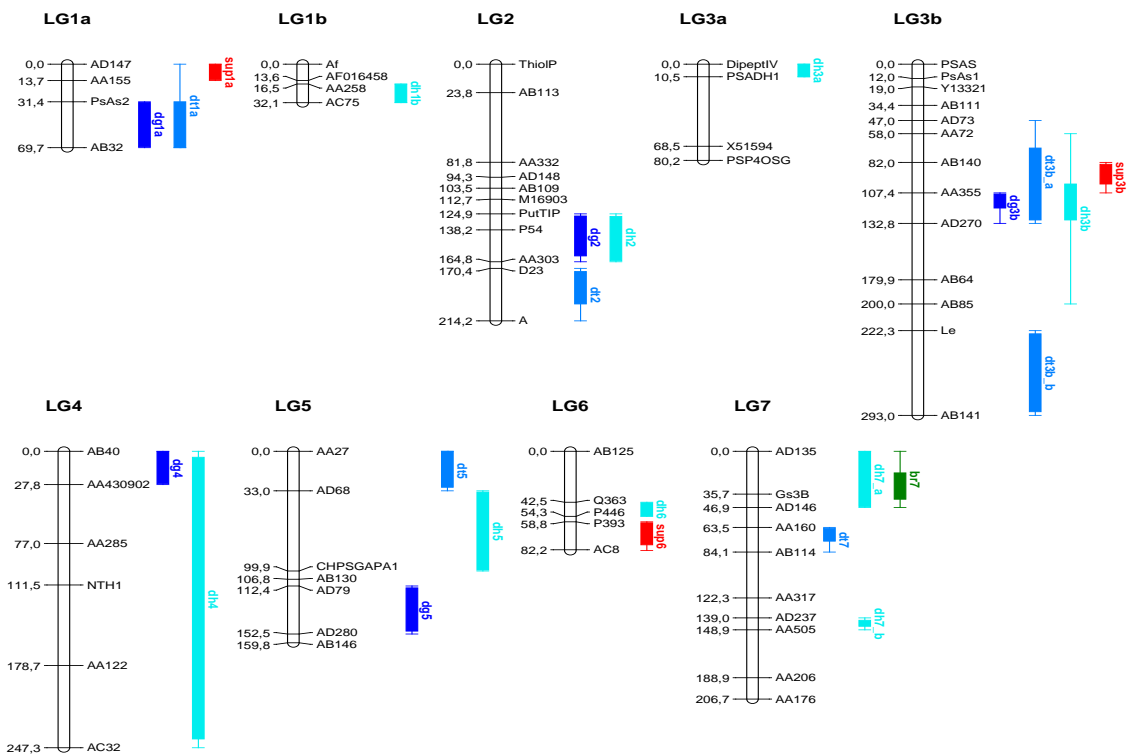


Figura IV.41. Mapas de QTL asociados a tolerancia a heladas a partir de los ensayos a -12°C y -15°C

Se ha comentado previamente la ausencia de solapamiento entre QTL asociados a la formación de brotes, si bien estos QTL no aparecen claramente solapados con otros rasgos, aunque a temperaturas más extremas aparece el solapamiento entre este rasgo y QTL asociados al daño en tallo, en LGIII y LGVII. Esta asociación a temperaturas más extremas estaría en coherencia con que la muerte del ápice terminal motivaría que cesase la dominancia apical que inhibiese la formación de ramificaciones en los primeros momentos de desarrollo de la planta, con lo que se desarrollarían esas yemas laterales.

Otra observación destacable es la dispersión cada vez mayor a lo largo del mapa de ligamiento en la presencia de QTL registrados para cada rasgo, es decir, a medida que la temperatura evaluada era menor, los QTL detectados se localizaban en un mayor número de grupos de ligamiento. En concreto, a -6°C el número de QTL en LGIa, LGIIIa, LGV y LGVI es casi nulo, mientras que a -15°C hay presencia de QTL en todos ellos.

En esta comparativa en la distribución de los QTL según temperaturas en el mapa de ligamiento se comprueba la similitud en la distribución de los mismos según rangos de temperatura, tal y como se ha mencionado previamente. En coherencia con esto, diversos autores han concluido que las temperaturas de ensayo entre -8 y -12°C permiten la separación entre líneas tolerantes a heladas y las variedades de primavera (Acikgoz, 1982; Auld *et al.*, 1983; Cousin 1983).

2. 5. Análisis comparativo de QTL asociados a caracteres de interés en la mejora genética del guisante

El programa de mejora genética del guisante proteaginoso establecido en el ITACyL se focaliza en la obtención de nuevas líneas competitivas agrónomicamente. En este sentido, el aumento del rendimiento de este cultivo ha sido vinculado al adelanto de la fecha de siembra (Cousin, 1976; Singh *et al.*, 1996; Dordio, 1997; Abbate *et al.*, 1997; Caminero, 2002). No obstante, la siembra otoño-invernal del guisante somete a este cultivo a nuevos estreses, tanto bióticos como abióticos, regulados en primera instancia por el grado de dureza invernal mostrado por cada variedad individual.

Los estudios previos en referencia a la dureza invernal en guisante (Auld *et al.*, 1983; Cousin *et al.*, 1985; Liesenfeld *et al.*, 1986) sugieren una herencia cuantitativa de la dureza invernal con efecto aditivo de unos pocos genes. Liesenfeld *et al.* (1986) estimaron que tan sólo tres genes aditivos podrían condicionar la dureza invernal. Entre otras leguminosas, Kahraman *et al.* (2004) detectaron cinco posiciones QTL para la supervivencia al invierno en lenteja, con un solo QTL con consistencia entre localidades y campañas. Un trabajo más reciente realizado en guisante (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) destacó la significatividad de seis QTL, dentro del determinismo genético de carácter oligogénico para la tolerancia a la dureza invernal, y dentro de estos seis, tres de ellos localizados en LGIII, V y VI, mostraron consistencia entre todas las condiciones experimentales.

El mapeo de rasgos cuantitativos relacionados con la dureza invernal presentado en este estudio obedece a la evaluación de dos poblaciones segregantes, PopESP y PopFRA, en dos fechas de siembra, dos años y dos localidades. Esta valoración en diferentes ambientes es considerada necesaria en especies cultivadas para asegurar que los resultados reflejan suficiente confianza para futuros programas de mejora del guisante de invierno tal y como sugieren Lejeune-Hénaut *et al.* (2008). Obtener evaluaciones con repetitividad de tolerancia invernal bajo condiciones experimentales de campo resulta complicado. Para sobrellevar esta dificultad, se constituyó una red de ensayos de campo experimentales entre dos localidades con diferente dureza invernal: Peñaflor y Zamadueñas; y dos campañas diferentes de siembra: 2006-2007 y 2007-2008. Se incluyeron repeticiones en algunos de los ambientes, así como se realizó siembra primaveral para poder establecer una comparativa. Con estas bases experimentales se pretendió discernir los QTL más significativos en relación a la dureza invernal.

Los QTL detectados en la evaluación de los ensayos de campo en PopESP y PopFRA pueden ser comparados con los QTL detectados posteriormente en este documento mediante la evaluación de los ensayos en cámara climática en PopUSA. Gracias a la presencia de marcadores puente entre las tres poblaciones se pudieron obtener los QTL solapantes en las tres poblaciones en los grupos de ligamiento LGI, LGII, LGIII y LGV.

El marcador puente *ADI46*, ligado al LGVII y presente en las tres poblaciones, permitió establecer la presencia de dos QTL coincidentes en las poblaciones evaluadas en campo (Fnas7 y Enas7), sin embargo el QTL localizado en el ensayo de cámara de ambiente controlado, nas7.5, no coincidía en dicha región, sino que se localizó en una región inferior de dicho grupo de ligamiento. En el grupo de ligamiento LGVI ocurrió algo similar, se detectó la presencia de QTL en las evaluaciones realizadas en campo para ambas poblaciones, pero no en la evaluación realizada bajo condiciones controladas. A pesar de la ausencia de marcadores puente entre nuestras poblaciones, a través de marcadores puente en dicho LGVI con el mapa publicado por Aubert *et al.*, (2006) se estableció que la región que engloba a los marcadores *Gsp* y *AA335* los QTL de PopFRA y PopESP solapaban, a diferencia de PopUSA, evaluada en cámara, la cual no presentaba QTL asociados a nascencia en este grupo de ligamiento.

En cuanto a los porcentajes de varianza explicada, las nascencias evaluadas en campo muestran valores más elevados, alcanzando sus valores máximos en LGII (26,5%), mientras que los valores alcanzados en las evaluaciones en cámara son siempre menores y su máximo se encuentra en LGV y LGIV (11,7 y 10,6% respectivamente). Con respecto a los valores LOD ocurre algo similar, en las evaluaciones en campo destacan los alcanzados en LGIII y LGV, próximos a 50, mientras que en cámara los valores LOD han sido mucho menores, cercanos a 10, en LGIII, IV y V. En este sentido, mientras que no hay coincidencia entre el porcentaje de varianza explicado entre las distintas evaluaciones, los valores más elevados de LOD coinciden en ambos casos en LGIII y LGV, indicando que su presencia en dichas regiones, todas solapantes, es altamente probable y no debido a error

experimental, a pesar de que difiera la importancia en cada análisis al variar el porcentaje de varianza explicada.

Por tanto, las nascencias parecen ligadas a regiones específicas en LGIII y LGV, en concreto la parte inferior de LGIII en la región del marcador *Le*, y en LGV en la región intermedia próxima a *AD68*. En estas regiones los QTL asociados a nascencias se mostraron con valores LOD elevados pero sus porcentajes de varianza difieren en importancia. En cuanto al papel de cada uno de los QTL detectados, tras comprobar las diferencias entre ensayos, los resultados parecen indicar que su importancia depende del ambiente en el que sea analizada la capacidad de nascencia. De esta forma, mientras que en campo el QTL que abarca una amplia región alrededor del marcador *A* juega un papel crucial con efecto aditivo, en un ambiente mucho más controlado y en condiciones óptimas, ya no hay un único QTL sino que los QTL localizados en LGIV, ligado a *AA122*, y LGV, ligado a *AD280* cobran mayor importancia. En el primer caso con efectos aditivo y dominante similares, mientras que el QTL en LGV muestra un efecto claramente dominante, si bien es verdad que los porcentajes de varianza explicada se reparten mucho más bajo estas condiciones óptimas.

En consecuencia, ya en el inicio del desarrollo del cultivo de guisante los factores ambientales afectan a rasgos como la nascencia, en las fases previas a los rigores de la dureza invernal propiamente dichos. Por tanto, entre ambas poblaciones hay diferencias en la distribución de los QTL, probablemente debido a un número reducido de condiciones evaluadas e influida a su vez por posibles variaciones individuales.

No obstante, se comprobó la presencia de QTL asociados al inicio de floración en la mayoría de los QTL, mostrando la complejidad de este rasgo. Mientras, los rasgos asociados a semilla y rendimiento se localizaron en regiones más restringidas del genoma de guisante, y generalmente con interacciones entre ellos y con el inicio de floración. Ambas poblaciones coincidieron en la distribución de QTL, al igual que en los valores obtenidos para cada QTL, asociados al inicio de floración y el fin de floración, y, en menor medida, con algunos de los QTL asociados a la fecha de cosecha.

Tras observar estas diferencias entre la capacidad de germinación entre un ambiente controlado y condiciones de siembra otoñal en campo, se estableció el interés de recurrir a condiciones controladas para evaluar el efecto de la temperatura en el desarrollo del cultivo. Por tal necesidad se realizaron las evaluaciones en cámaras de ambiente controlado en relación a la tolerancia a heladas *per se*.

La incorporación de marcadores basados en genes, GTM, y SSR, ambos específicos de *locus* han permitido establecer asociaciones entre los diferentes mapas de ligamiento disponibles en guisante (Fondevilla *et al.*, 2011b), y aún más, permiten comparar y analizar las relaciones entre los QTL asociados a diferentes caracteres de interés en mejora. En guisante se han realizado trabajos, que del mismo modo que en nuestro estudio, han localizado QTL asociados a diferentes caracteres de interés

en las mismas poblaciones de mapeo. En concreto se han localizado conjuntamente QTL asociados a la resistencia frente a *O. crenata* junto con caracteres agronómicos como la biomasa aérea de la planta (Fondevilla *et al.*, 2010), ampliándose a la resistencia frente a *M. pinodes* e incluyendo la fecha de floración (Fondevilla *et al.*, 2011b). Otros trabajos han asociado el inicio de floración, a través del locus *Hr*, con la tolerancia a la dureza invernal (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008). También se han realizado estudios sobre los genes de desarrollo con efectos pleiotrópicos en diferentes aspectos del desarrollo de guisante y su productividad (Burstin *et al.*, 2007) y otros enfocados estrictamente a la localización de QTL de resistencia como es el caso de resistencia a *P. syringae* pv. *pisi* (Fondevilla *et al.*, 2011a) o resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* raza 2 (McPhee *et al.*, 2012).

No obstante estos estudios realizados en mejora del guisante no sólo se limitan a estos últimos años. Previo a los trabajos mencionados se han mapeado QTL asociados a rasgos relacionados con el rendimiento del cultivo y rasgos de desarrollo (Irzykowska y Wolko, 2004; Timmerman-Vaughan *et al.* 2005), resistencia a diferentes estreses bióticos como ascoquitosis (Prioul *et al.*, 2004; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002; 2004), resistencia al virus del mosaico en guisante (PsbMV: Frew *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004), a la podredumbre de la raíz causada por *Aphanomyces euteiches* (Pilet-Nayel *et al.*, 2002; 2005), a *F. oxysporum* (Coyne *et al.*, 2000; McClendon *et al.*, 2002), a *P. syringae* pv. *pisi* (Hunter *et al.*, 2001). También se ha estudiado la asociación entre la resistencia al encamado, a *M. pinodes* y la altura de la planta (Tar'an *et al.*, 2003).

Sin embargo, a diferencia de los estudios realizados en los últimos años, los trabajos previos a 2005 se basan, en su mayoría, en mapas construidos en función de marcadores universales, generalmente no específicos de especie ni de locus: RDMs como RAPDs, ISSRs o AFLPs puntual (Frew *et al.*, 2002; Prioul *et al.*, 2004). Este tipo de marcadores, y en consecuencia, los mapas obtenidos y los QTL ligados a los mismos, limitan la labor de asociación entre otros trabajos. La identificación de marcadores puente entre los mapas que permitan asociar rasgos e identificar regiones de interés para los mejoradores se ve limitada, quedando muchas veces reducida la asociación entre diferentes rasgos evaluados sobre la misma población de mapeo por la falta de nexos de unión entre diferentes mapas y resultados.

La incorporación de marcadores específicos de locus ha permitido vincular los trabajos de diferentes autores y en diversas poblaciones de mapeo. En este sentido, ya se ha comentado la vinculación de varios QTL de resistencia a diferentes patógenos al gen *Le* (Fondevilla *et al.*, 2010; 2011a y b; MCPhee *et al.*, 2012), al locus *Hr* (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008; Fondevilla *et al.*, 2011a), la asociación entre los resultados de trabajos previos (Prioul *et al.*, 2004; Burstin *et al.*, 2007) con otros más recientes, vinculando resistencia a *M. pinodes*, el inicio de la floración y la biomasa (Fondevilla *et al.*, 2010; 2011b), vinculando QTL asociados a la resistencia a la dureza invernal al locus *Tri* (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008), mostrando la asociación de rasgos agronómicos y de rendimiento con loci

morfológicos como *Af* o *Le* (Burstin *et al.*, 2007), entre otros. Al igual que en estos trabajos, ya se ha comentado las diferentes colocalizaciones entre los QTL asociados a los diferentes rasgos evaluados en este trabajo con resultados previamente publicados. No obstante, la reiterada colocalización mostrada por QTL asociados a diversos rasgos con *loci* concretos dentro del mapa genético de guisante, así como la presencia de grupos de ligamiento en la asociación de QTL asociados a caracteres de rendimiento e interés agronómico sugiere la presencia de regiones concretas implicadas en respuestas generales a estreses en general así como regiones vinculadas a diferentes caracteres de rendimiento vinculados entre sí y con las regiones de respuesta al estrés.

Profundizando más en esta línea de asociación de diferentes rasgos y en relación a cada grupo de ligamiento se han encontrado varias asociaciones entre rasgos diversos de interés en la mejora del guisante. Así, en el grupo de ligamiento LGI se puede destacar la región distal de dicho grupos, y en concreto la región en la que se sitúa el *locus Af*. En nuestro estudio localizamos varios QTL, asociados en primer lugar al número de semillas, y en la que se han localizado próximos QTL asociados a la floración. Estos QTL coinciden en localización con los descritos por Burstin *et al.* (2007) para el número de semillas, el rendimiento de semilla, el inicio y el fin de floración, así como se situó próximo un QTL asociado al peso de semilla y varios QTL asociados al rendimiento del cultivo en relación a la biomasa y al contenido proteico de la semilla. Por tanto, esta región parece implicada en diversas componentes del rendimiento y en otros caracteres involucrados con la adaptación y la calidad y, por tanto, de indudable interés en mejora.

Otra región dentro de este grupo de ligamiento en la que aparecen QTL asociados a diferentes rasgos es la asociada al *locus Rgp*, en dicha región Burstin *et al.* (2007) localizan un QTL asociado al contenido proteico de semilla, próximos a dicho *locus*, se localizan varios QTL asociados a la resistencia a *O. crenata* y a la biomasa aérea de guisante (Fondevilla *et al.* 2010; 2011a), en nuestro estudio se ha mostrado la presencia de QTL asociados al peso de cien semillas y a la fecha teórica de cosecha próximos a dicha región (entre los *loci* AA321 y AA28). Este gen *Rgp* se cree que juega un papel en la biosíntesis de la pared celular (Delgado *et al.*, 1998) y además se ha vinculado su expresión al contenido en semillas en *M. truncatula* (Gallardo *et al.*, 2003).

La última región que ha destacado dentro de este grupo de ligamiento ha sido la región que engloba desde el *locus* AA474 hasta AD147, en dicha región nuestro estudio localiza numerosos QTL asociados a la supervivencia a heladas y el daño expresado durante heladas bajo diferentes temperaturas, así como se ha vinculado al inicio de floración bajo condiciones de siembra adelantada. En dicha localización se sitúa también un QTL asociado a la dureza invernal (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) aunque este QTL ha mostrado un escaso porcentaje de varianza explicada en su análisis frente a otros QTL con un mayor papel en la tolerancia a la dureza invernal. Por último, señalar que otros trabajos previos han mapeado QTL de interés en este grupo de ligamiento, LGI, pero la ausencia de marcadores

puede haber impedido su asociación con nuestros resultados. Entre ellos destaca la presencia de QTL asociados tanto al rendimiento (Irzykowska y Wolko, 2004; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005) como otros relacionadas con resistencia a ascoquitosis (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002; 2004) y a la podredumbre de la raíz causada por *A. euteiches* (Pilet-Nayel *et al.*, 2002).

En el grupo de ligamiento LGII se han encontrado coincidencias en los QTL asociados a floración por diversos autores, en la región próxima al *locus A* se localizan QTL para floración (Fondevilla *et al.*, 2010) y la duración de la floración (Burstin *et al.*, 2007) junto con los QTL asociados al inicio y fin de floración de nuestro estudio y la fecha teórica de cosecha. En esta región hemos localizado también varios QTL asociados a la tolerancia a heladas, sobre todo en las temperaturas más extremas (-15°C). Esta colocación entre QTL asociados a floración y asociados a la tolerancia a heladas sugiere la existencia de relación entre ambos rasgos, en la misma línea que describen Lejeune-Hénaut *et al.* (2008) entre la dureza invernal y el *locus* de floración *Hr*.

En el grupo de ligamiento LGIII se han localizado numerosos QTL asociados a diversos rasgos como es el caso de la resistencia a diferentes razas *F. oxysporum* (McClendon *et al.*, 2002; Loridon *et al.*, 2005; McPhee *et al.*, 2012), a *M. pinodes* (Prioul *et al.*, 2004; Fondevilla *et al.*, 2011a), a *Uromyces pisi* (Barilli *et al.*, 2010). En varios casos se han localizado QTL relativos a resistencia a diferentes estreses en dos regiones específicas dentro de este grupo de ligamiento, una en la parte proximal, ligado a diferentes *loci*, y otra en la parte distal, generalmente vinculado al *locus Le*, este es el caso de la resistencia a la raza 2 de *F. oxysporum* (McPhee *et al.*, 2012), a *M. pinodes* (Fondevilla *et al.*, 2011a), a *P. syringae* pv. *syringae* (Fondevilla *et al.*, 2011b) o la tolerancia a la dureza invernal (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) así como a la biomasa (Fondevilla *et al.*, 2010), al número y peso de semilla y la como floración (Burstin *et al.*, 2007).

En la región distal, y en concreto el *locus Le*, ha sido mencionado en numerosos trabajos por su relación con diferentes caracteres de interés en mejora. En nuestro estudio concretamente se localizan QTL asociados a daños en heladas a partir de -9°C, así como QTL asociados a floración. En dicha región también se localizan QTL para los patógenos mencionados anteriormente así como caracteres relativos a altura de la planta (Prioul *et al.*, 2004). En la región superior de LGIII, próximo a AA175, se han localizado en nuestro estudio QTL asociados a floración, fecha teórica de cosecha, número y peso de semillas así como el daño general asociado al rango de temperaturas -9°C a -15°C. En dicha región se han situado los QTL asociados a resistencia para varias razas de *F. oxysporum* (Loridon *et al.*, 2005; McPhee *et al.*, 2012) y a *M. pinodes* (Pioul *et al.*, 2004; Fondevilla *et al.*, 2011a). Además coinciden los QTL detectados para peso de semilla y número con otros asociados a la floración descritos por Burstin *et al.* (2007) y el QTL WFD3.1 descrito por Lejeune-Hénaut *et al.* (2008). La colocación del QTL WFD3.1 con los QTL descritos en este trabajo y asociados a la tolerancia a heladas *s. str.* sugiere la relación del rasgo de dureza invernal con la expresión de la tolerancia a heladas.

Asimismo, la floración también se ha mostrado asociada a ambas regiones tal y como muestran los QTL obtenidos por varios autores (Prioul *et al.*, 2004; Burstin *et al.*, 2007; Fondevilla *et al.* 2011a). De este modo, el *locus* AA175, localizado en esta región de LGIII, ha sido propuesto como marcador para su empleo en MAS por varios autores (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008; Fondevilla *et al.*, 2011a).

En el grupo de ligamiento LGIV se ha localizado, en su región distal (*loci* AC22 y AD171), un QTL asociado a la raza 2 de *F. oxysporum* (McPhee *et al.*, 2012), región en la que también se han encontrado QTL asociados a la floración (Burstin *et al.*, 2007), aunque en este último trabajo también detectaron QTL asociados al peso de semilla en la región proximal (*loci* Elsa, AA430942). Similar localización es la de uno de los QTL asociados a la resistencia a *O. crenata* (Fondevilla *et al.*, 2011a). En esta región hemos situado daños asociados a heladas a -15°C. Sin embargo, la mayoría de los QTL detectados en este trabajo sobre LGIV se sitúan próximos a la región entre los *loci* AA285 y A9. En dicha región situamos QTL asociados a floración, a caracteres relacionados con semilla y los daños mostrados por heladas, destacando la asociación de rasgos evaluados a -6°C. En dicha región Burstin *et al.* (2007) localizan un QTL asociado al peso de semilla y varios relacionados con el contenido en nitrógeno, así como el número de células del cotiledón, sugiriendo que la asociación en grupos de QTL asociados a diferentes caracteres muestra el efecto pleiotrópico de los genes del desarrollo en el contenido proteico de la semilla y en la productividad del cultivo. La incorporación de nuestros QTL asociados a daños por heladas, sugiere la posibilidad de que estos genes de desarrollo estén también involucrados en otras acciones como la tolerancia a heladas.

Otros autores muestran la localización de QTL asociados a rendimiento y peso de semilla (Irzykowska y Wolko, 2004; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005), de resistencia a PsbMV (Gao *et al.*, 2004) y a *M. pinodes* (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002; Pilet-Nayel *et al.*, 2002; Tar'an *et al.*, 2003). Con todo, al no disponer de marcadores puente entre nuestro estudio y sus trabajos no se han podido establecer asociaciones.

En relación a LGV destaca una región central entre los *loci* AA475 y AD79 en la cual nuestro estudio sitúa QTL asociados a la floración, a la formación de ramificaciones laterales, al peso de semillas y a los daños por heladas en el rango entre -9°C y -15°C. En dicha región, otros autores han localizado QTL asociados a floración y al número de ramificaciones (Burstin *et al.*, 2007), pero también se han localizado QTL asociados a la resistencia a *O. crenata* (Fondevilla *et al.*, 2010; 2011a) y a la tolerancia a la dureza invernal (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008), en este último caso asociado a su vez al *locus* *Tri*, gen codificante para un inhibidor de tripsina, no deseado en guisantes destinados a pienso animal, pero relacionado con el contenido proteico (Domoney *et al.*, 1994; 1995) y, por tanto, sugiriendo la vinculación de la tolerancia a la dureza invernal a caracteres como el peso de semilla. En este sentido previamente se situaron QTL asociados al contenido proteico de semilla así como el peso de semilla en este grupo de ligamiento (Irzykowska y Wolko, 2004). Nuevamente la floración aparece

asociada a la dureza invernal, pero también a la tolerancia a heladas *per se* y a la resistencia a estreses bióticos como *O. crenata*.

En relación al grupo de ligamiento LGVI, en la región localizada entre el *locus AD159* y *locus AD60* se han localizado varios QTL asociados a resistencia a *P. syringae* pv. *syringae* (Fondevilla *et al.*, 2011b), a *M. pinodes* (Fondevilla *et al.*, 2011a) colocalizado con un QTL asociado a floración, a *O. crenata* (Fondevilla *et al.*, 2010) colocalizado con la longitud de la raíz, tolerancia a la dureza invernal (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) y QTL asociados al peso de semilla y al inicio de floración (Burstin *et al.*, 2007). Nuestro estudio localiza en dicha región también QTL asociados a floración. Sin embargo, en nuestro estudio, los QTL asociados a la tolerancia a heladas, junto con QTL asociados al inicio de floración se localizan en la región distal de este grupo de ligamiento, próximos al *locus AB125*. En esta región distal se han situado igualmente QTL asociados al contenido proteico de semilla (Burstin *et al.*, 2007); el número de vainas junto con el rendimiento y el número de semillas (Irzykowska y Wolko, 2004); y el peso de semilla (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005), de resistencia a *P. syringae* pv. *pisi* (Hunter *et al.*, 2001) y a PsbMV (Frew *et al.*, 2002). Estas asociaciones sugieren una relación entre los caracteres de semilla con la resistencia a diferentes estreses, entre ellos la tolerancia a heladas, localizada en esta región distal de LGVI.

En el último grupo de ligamiento, LGVII, se han situado varios QTL asociados a diferentes rasgos como la longitud de las raíces colocalizado con el número de tubérculos de *O. crenata* por longitud de raíz (Fondevilla *et al.*, 2010; 2011a), resistencia a ascoquitosis (Pilet-Nayel *et al.*, 2002; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002; 2004; Prioul *et al.*, 2004), resistencia a *P. syringae* pv. *pisi* (Hunter *et al.*, 2001) y a PsbMV (Frew *et al.*, 2002). Asimismo, se han localizado QTL asociados a rendimiento como el número de semilla y el rendimiento en semilla (Irzykowska y Wolko, 2004), ambos caracteres junto con el peso de semilla han sido también localizados en este grupo de ligamiento en otro estudio (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005), y a todos ellos se les ha unido la localización de QTL asociados a floración (Burstin *et al.*, 2007). Sin embargo, la ausencia de marcadores moleculares específicos de *locus* que puedan utilizarse como marcadores puente limita la comparación entre todos los QTL ligados a este grupo de ligamiento. Nuestros resultados localizan en la región próxima a *AB27* el daño general tras heladas leves y en la región próxima a *AA416* los daños tras heladas más extremas, donde también se colocalizan QTL asociados al número y peso de semillas. En la zona intermedia a ambos *loci* se localizan varios QTL asociados a daños en hojas y tallo tras heladas intermedias junto con QTL asociados a floración. Esta distribución de QTL tan amplia también se muestra en el trabajo realizado por Burstin *et al.* (2007) en el que el rendimiento, el peso y el número de semillas muestran QTL localizados en la región intermedia comentada, mientras que los QTL asociados a la floración muestran una amplia distribución pero se concentran próximos a *AB27*.

Otros estudios han asociado diferentes rasgos cuantitativos con *loci* concretos para su aplicación en

MAS, o han vinculado la expresión de dichos rasgos con genes concretos. Se han localizado RGAs en todos los grupos de ligamiento, pero los detectados en I, IV y VII contienen además genes de simbiosis *sym* (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000). Pilet-Nayel *et al.* (2002) demostraron la asociación entre resistencia y rasgos morfológicos por la co-segregación de los alelos de resistencia a *A. euteiches* *Aph2* (LGV) y *Aph3* (LGI) con los alelos *Af* (hojas normales) y *R* (semilla redonda). Además, estudios de resistencia multigénica a enfermedades que se relacionan con la madurez de la planta de guisante han mostrado la colocalización de QTL para resistencia y estado de desarrollo (Collien *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Kim y Diers, 2000; Qi *et al.*, 1998, Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002). Este último trabajo (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002) relaciona al QTL Asc2.1, asociado a la resistencia a ascoquitosis, (LGII) con un QTL que afecta al estado reproductivo de la planta. También se ha descrito la relación entre encamado, la altura de la planta y la reacción a *Mycosphaerella* sp (Dirlewager *et al.*, 1994; Tar'an *et al.*, 2005) y se ha asociado un QTL de resistencia a ascoquita en LGIV con el locus *P628.Hinfl* (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002) y otro QTL asociado a la resistencia a *Mycosphaerella* sp muy próximo al detectado por Tar'an *et al.* (2005).

Los análisis comparativos sugieren también posiciones cromosomales similares para el QTL ht2, asociado a la altura de la planta, y el gen *Le* (que controla la longitud entre nudos) en LGIII, para el QTL flo1 (asociado a floración) y el QTL para el estado reproductivo Mat2.1 (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002) en LGII y para el QTL flo2 y el gen *Hr* (alta respuesta al fotoperiodo) en LGIII (Weeden *et al.*, 1998). Se ha sugerido también la localización conjunta de QTL asociados a diferentes rasgos: entre resistencia a *Ascochyta pisi* raza C y la altura de la planta evaluada en campo (Dirlewager *et al.*, 1994), entre resistencia a podredumbre de la raíz causada por *A. euteiches* y el gen *Le* (Marx *et al.*, 1972). También se han encontrado co-localizaciones entre QTL asociados a resistencia a *M. pinodes* y QTL asociados a la altura y/o fecha de floración (Prioul *et al.* 2004): dos QTL (mpIII-1 y mpIII-4) asociados a resistencia a *M. pinodes* y ht2 (probablemente correspondiente a *Le*) en LGIII y otro QTL (mpIII-3) y el QTL flo2 (posiblemente correspondiente a *Hr*) en LGIII. Así, esta región distal de LGIII puede contener genes relacionados en un espectro amplio de resistencia a patógenos o genes relacionados con otros procesos que muestren efectos pleiotrópicos (Fondevilla *et al.*, 2011b), como por ejemplo el gen cofactor para giberelina 3P-hidroxilasa (Lester *et al.*, 1997) localizado en esta región. Las giberelinas (GAs) son fitohormonas que regulan el crecimiento e influyen en varios procesos del desarrollo. La respuesta a estreses bióticos y abióticos y las proteínas involucradas en el desarrollo están interconectadas y las GAs pueden estar involucradas en la resistencia a *M. pinodes* y *O. crenata* (Fondevilla *et al.*, 2011b). Posibles colocalizaciones pueden inferirse del mapeo comparativo del QTL mpVI-1 y los genes *E* (floración temprana) y/o *na* (nudos extremadamente cortos) en LGVI de acuerdo al mapa consenso (Lacou *et al.*, 1998; Weeden *et al.*, 1998).

Prioul *et al.*, (2004) sugieren tres posibles causas a las colocalizaciones encontradas entre resistencia a un patógeno y los caracteres morfológicos junto con el estado de madurez de la planta de

guisante: (1) el efecto directo de la arquitectura de la planta, la estructura aérea o la precocidad en el desarrollo de la epidemiología del patógeno, (2) ligamientos genéticos entre genes controlando la resistencia a *M. pinodes* y la altura de la planta o el momento de floración y/o (3) efectos pleiotrópicos de los genes. El progreso de la enfermedad se ve afectado por la estructura aérea: un avance más rápido de la enfermedad en cultivares con mayor densidad aérea (Le May, 2002). La susceptibilidad a *M. pinodes* aumenta con la precocidad de la planta (Bretag y Ramsey, 2001), y con la longevidad de las plantas (Zimmer y Sabourin, 1986). La severidad de la ascoquitosis incrementa en campo en plantas maduras (Kraft *et al.*, 1998). Timmerman-Vaughan *et al.* (2004) sugieren un efecto pleiotrópico entre la resistencia a ascoquitosis y los genes de maduración, así como de floración (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002).

Timmerman-Vaughan *et al.* (2005) proponen que la co-localización de QTL asociados a diferentes rasgos puede indicar (1) una relación casual, (2) que genes individuales subyacentes al QTL tiene efectos pleiotrópicos, o (3) que hay regiones genómicas asociadas con estos QTL que contienen genes ligados que afectan a rendimiento *per se*, componentes del rendimiento y/o rasgos del desarrollo. En su estudio co-localizan el rendimiento de semilla y el número con alta correlación en LGIII y LGVII, el rendimiento de semilla y el peso coinciden en LGIV y LGVII, además otros rasgos de desarrollo relacionados con floración coinciden en sus posiciones con los QTL asociados a rendimiento y sus componentes, lo que confirma el papel del desarrollo vegetal en la determinación del rendimiento, incluyendo la duración de la floración (Bourion *et al.*, 2002).

Los grupos de QTL para la morfología de la planta, fenología, crecimiento, estado del nitrógeno, y rasgos de semilla pueden corresponder a genes del desarrollo que controlen el desarrollo vegetativo y/o la floración y tengan efectos pleiotrópicos en la morfología de la planta y, eventualmente, sobre el contenido proteico de la semilla y su productividad, como ejemplo de este tipo de genes: *Le* y *Af*.

El siguiente paso, a esta co-localización de QTL asociados a diferentes rasgos, ha sido vincular la expresión de los mismos a genes candidatos situados en las regiones que abarcan los QTL. En este sentido se ha asociado un QTL para el número de semilla en LGII con *P482*, marcador ligado a la enzima GBSSI (almidón sintetasa ligada al gránulo I) y un QTL para rendimiento en LGIV con *SUS3* (sucrosa sintasa) (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005). En el mapeo de QTL desarrollado por Burstin *et al.* (2007), el peso de semilla mostró un QTL mapeado en la proximidad del gen candidato *PepC* en LGIII, en la misma región, otro gen candidato es *PGK1*, codificante para una fosfoglicerato kinasa.

Las isoformas de glutamina sintasa (*gln-1* y *gln-4*) expresadas en hojas se relacionaron con el control del número y el peso de semilla, respectivamente (Martin *et al.*, 2006).

En resumen, se han detectado QTL asociados a rasgos de carácter fenológico, como la floración, morfológico, como el número de ramificaciones, y de relacionados con el rendimiento, como el número y el peso de semilla, todos ellos evaluados en campo. También se han mapeado QTL asociados

a la tolerancia a heladas y evaluados a diferentes temperaturas. Se han encontrado correlaciones entre los diferentes rasgos evaluados, al igual que se han definido regiones dentro del mapa de ligamiento de guisante en las que se localizan grupos de QTL asociados a *loci* concretos y posiblemente ligados a genes cuyo efecto principal puede ejercer un efecto pleiotrópico sobre otros rasgos de interés en la mejora del guisante.

Entre los diferentes genes candidatos propuestos en la bibliografía y los obtenidos a partir de nuestro propio estudio se plantea otra forma de enfocar la localización de genes candidatos involucrados en la tolerancia a la dureza invernal en guisante a través de la tolerancia a heladas *s. str.* adquirida tras un periodo de aclimatación.

3. Análisis de la expresión diferencial asociada a la aclimatación en guisante

3. 1. Selección sistemas de amplificación

Con el fin de buscar genes candidatos relacionados con la tolerancia al enfriamiento, en relación a la tolerancia a heladas propiamente dicha, se procedió a buscar en bases de datos secuencias de genes publicadas. Se obtuvieron 946 secuencias de ARNm de *P. sativum* a partir las bases de datos de Genbank/EMBL. Las secuencias candidatas se seleccionaron tras una búsqueda bibliográfica en base a criterios de tolerancia a heladas en plantas y tolerancia a estrés abiótico en especies relacionadas.

La aclimatación al frío cubre procesos que tienen lugar bajo temperaturas bajas pero positivas (período de enfriamiento), el cual permite a las plantas sobrevivir a las heladas (Levitt, 1980; Thomashow, 1999; Bourion *et al.*, 2002; 2003; Ruelland *et al.*, 2009). Este fenómeno solo puede tener lugar en plantas capaces de aclimatarse y permitirá prevenir daños inducidos por la deshidratación celular resultante de la formación de hielo (Webb *et al.*, 1993; Pearce, 1999). La aclimatación al frío ha sido relacionada con diversos procesos tales como la estabilización osmótica celular, cambios en la composición lipídica de la membrana, incremento de antioxidantes, activación de metabolismo primario a nivel de fotosíntesis y/o biosíntesis de nuevas proteínas (Uemura *et al.*, 1995; Prasad, 1996; Thiellement *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2005). Dichos procesos se corresponden con variaciones del metabolismo causadas, entre otros posibles factores, por cambios en la expresión de determinados genes implicados en determinadas rutas metabólicas.

Debido al reducido número de publicaciones referentes a la expresión de genes o presencia de proteínas determinantes en la tolerancia a heladas en guisante (Auld *et al.*, 1983; Cousin *et al.*, 1985; Liesenfel *et al.*, 1986; Weiser *et al.*, 1990; Cheng-Che *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2005; Lejeune-Hénaut

et al., 2008; Dumont *et al.*, 2011), la búsqueda de genes candidatos en la bibliografía sobre guisante abarcó genes y proteínas implicados en la respuesta al estrés, independientemente del tipo de estrés causante.

Tras la primera selección de genes potencialmente relacionados con tolerancia a heladas se obtuvieron un total de 498 secuencias codificantes para diversos genes. Tras la selección de genes candidatos relacionados con estreses abióticos y en concreto con estrés a bajas temperaturas en diferentes cultivos e información sobre genes relacionados con el metabolismo primario vegetal, se obtuvieron un total de 200 secuencias correspondientes a 200 genes candidatos.

Se comprobó la especificidad de cada una de las 200 secuencias para guisante, así como su identidad y homología, con el gen objetivo mediante alineamiento múltiple *in silico* a través de la aplicación BLASTN. Este tipo de herramienta, BLASTN, resulta útil en el diseño experimental, ya que cualquier homología apreciable con pseudogenes u otros objetivos inesperados puede detectarse. La detección de homologías mediante el empleo de este tipo de herramientas permite elevar la especificidad de los sistemas diseñados (Bustin *et al.*, 2009), no obstante la especificidad sólo quedará validada empíricamente mediante evidencia experimental.

De esta comprobación se obtuvo el 100% de identidad de la secuencia con el gen objetivo para todas las secuencias analizadas. No obstante, se descartaron un total de 68 secuencias debido a la homología que presentaron con otros genes dentro de la misma especie o con diferentes genes en otras especies emparentadas, principalmente en relación a familias génicas o genes parálogos. Estas 68 secuencias fueron eliminadas del proceso de selección, ya que los cebadores obtenidos a partir de ellas podrían causar la aparición de varios productos de amplificación procedentes de los genes homólogos. Finalmente, se obtuvieron 132 secuencias correspondientes a 132 genes candidatos (Anexo III.3) sobre las cuales se procedió al diseño de cebadores.

Se ha demostrado que la transcripción reversa combinada con la PCR (RT-PCR) conforma un método potente para cuantificar la expresión de los genes (Murphy *et al.*, 1990; Noonan *et al.*, 1990; Horikoshi, *et al.*, 1992). El diseño de los sistemas de amplificación se realizó en función de unos criterios restrictivos que aseguraran obtener una amplificación óptima de la secuencia objetivo, que dicha secuencia correspondiera al gen candidato y que dicho gen pudiera resultar clave en el proceso de aclimatación que diera lugar a la tolerancia a heladas por parte de los genotipos tolerantes a frío. Las condiciones para el diseño de cebadores, especificadas en materiales y métodos (Apartado III.3.1.2.2), fueron establecidas como parámetros de búsqueda en el programa *PrimerExpress* (Applied Biosystems, EEUU). En base a dichos parámetros se diseñaron dos cebadores complementarios, *forward* y *reverse*, para cada uno de los 132 genes candidatos (Tabla III.10). Se seleccionaron los sistemas de amplificación que cumplieran dichas características y presentaran menor probabilidad de formación de estructuras secundarias que pudieran afectar a la amplificación. La aplicación permitió el diseño de la

sonda correspondiente a cada sistema de amplificación, no obstante no se incluye en este trabajo ya que se procedió a la realización de todos los experimentos de expresión diferencial mediante qPCR basada en química SYBR-Green.

Los 132 sistemas de amplificación diseñados se sometieron a un ensayo de amplificación en las líneas de guisante Medora y Melrose mediante PCR convencional. La ventaja de analizar los sistemas de amplificación diseñados para qPCR por PCR convencional resulta evidente en este tipo de ensayos, ya que se pudieron eliminar aquellos sistemas que mostraron amplificaciones inespecíficas o difusas bajo condiciones más restrictivas de las que se requieren en RTi-PCR, permitiendo entonces asegurar la máxima calidad de los sistemas de amplificación seleccionados tras este procedimiento. Se comprobaron las temperaturas de amplificación obtenidas *in silico* mediante la aplicación *PrimerExpress* (Applied Biosystems, EEUU) y se compararon los tamaños esperados de los diferentes amplicones. Finalmente, se eliminaron aquellos sistemas de amplificación que no permitieron obtener una banda única de amplificación nítida. De esta forma se eliminaron 23 sistemas de amplificación (Tabla IV.40), de modo que se obtuvieron resultados óptimos para un total de 109 sistemas de amplificación, disponibles para su utilización en los ensayos mediante qPCR.

Optimización de las condiciones de amplificación

En primer lugar se optimizaron las condiciones de amplificación en referencia a la concentración de los cebadores para cada uno de los 109 sistemas de amplificación diseñados y comprobados previamente mediante PCR convencional. El estudio de las concentraciones de los cebadores permite evitar que las reacciones estén limitadas por la cantidad de cebador disponible. El objetivo de este tipo de estudios se basa en que las concentraciones deseadas son aquellas a las cuales se muestra una reducción del ΔRn pero con el menor efecto sobre C_q y, por tanto, éstas deben ser las concentraciones seleccionadas.

Para la determinación de la concentración óptima de cebadores se tuvieron en cuenta aquellas concentraciones a las que se obtuvieron los máximos rendimientos de ΔRn con los mínimos valores de C_q . La Figura IV.42 muestra, como ejemplo, los resultados obtenidos para las combinaciones entre las diferentes concentraciones de cebadores del sistema de amplificación *Ps_024*. En esta gráfica se puede observar como las tres curvas de amplificación señaladas con una flecha correspondían con el mayor ΔRn , además coincidieron con el mínimo valor C_q , y por tanto, correspondieron con las concentraciones óptimas de cada uno de los cebadores. En este caso concreto, las tres curvas representan a las réplicas realizadas con la concentración óptima para ambos cebadores de 300 nM.

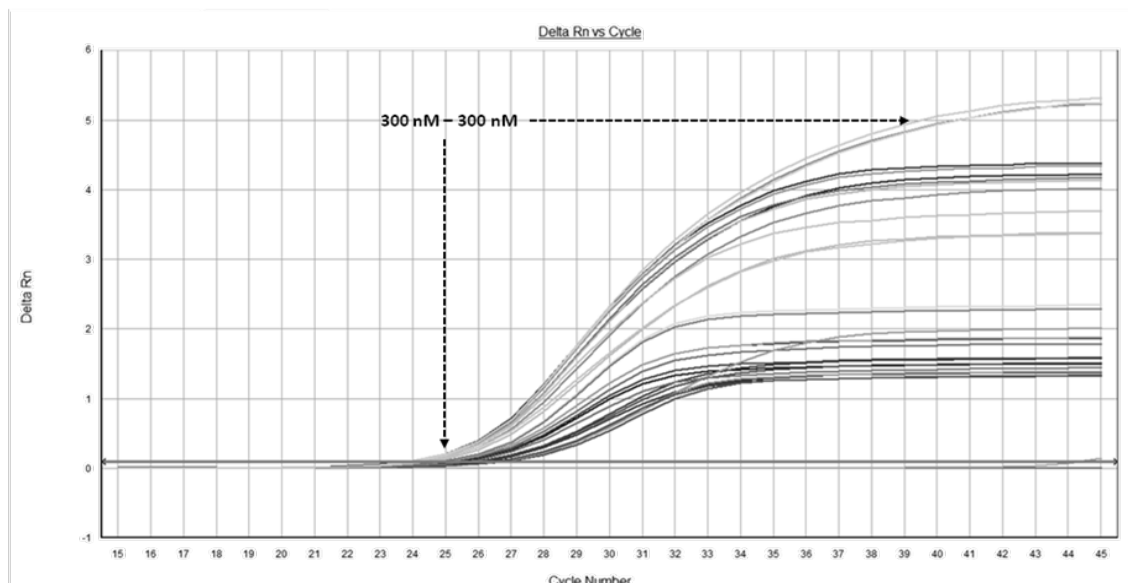


Figura IV.42. Representación ΔR_n vs ciclo de amplificación para el sistema Ps_024

Todos los sistemas de amplificación analizados mostraron como concentraciones óptimas 300 nM de cada uno de los cebadores, o combinaciones de 300 nM y 100 nM. Para estandarizar las condiciones de la mezcla de PCR, en base a los resultados obtenidos para todos los sistemas de amplificación analizados, se estableció como concentración estándar 300 nM para cada uno de cebadores, *forward* y *reverse*, de cada sistema de amplificación.

Sensibilidad y precisión de los sistemas de amplificación seleccionados

Con el objetivo de comprobar la sensibilidad y precisión en la cuantificación del sistema *18S* como gen de referencia a utilizar en los ensayos de expresión diferencial se analizaron diluciones seriadas de ADN copia procedente de ARN extraído a partir de la línea de *P. sativum* Medora. En base al ideal de 5 a 6 *logs* para comprobar la sensibilidad del sistema de cuantificación se procedió a cubrir dichas diluciones preparando un total de 9 diluciones en factor 1:10, cada una de ellas por triplicado.

Los resultados obtenidos, expresados en valores C_q para cada uno de los triplicados de las 9 diluciones se muestran en la Tabla IV.38, junto con la media, la desviación estándar y el error estándar. Los resultados obtenidos fueron analizados en primer lugar para comprobar si se podían aplicar pruebas paramétricas a los datos, en relación al cumplimiento de tres condiciones. La primera condición, variable dependiente de carácter numérico, se cumplía. La segunda condición es la normalidad, referente a la distribución normal de los valores de la variable dependiente, la cual se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La prueba de normalidad mostró una significatividad asintótica (bilateral) de 0,891, y por tanto los resultados se ajustaban a la normalidad. Por último, la tercera condición, homocedasticidad, se comprobó mediante el cálculo del estadístico de Levene que comprueba la homogeneidad de varianzas. Se obtuvo un nivel de significatividad para esta

prueba de 0,071, lo que indica que los resultados muestran varianzas iguales, es decir que cumple la condición de homocedasticidad.

Tabla IV.38. Resultados de la amplificación de diluciones seriadas de ADNc mediante *I8S*

Dilución	Log Dil/reac	Valores C_q			M	SD	ES
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
1	0,00	18,12	17,65	17,88	17,88	0,235	0,136
10^{-01}	-1,00	20,58	20,46	20,67	20,57	0,105	0,061
10^{-02}	-2,00	23,89	24,03	24,11	24,01	0,111	0,064
10^{-03}	-3,00	27,29	27,36	27,01	27,22	0,185	0,107
10^{-04}	-4,00	30,82	31,06	31,28	31,05	0,230	0,133
10^{-05}	-5,00	34,37	33,88	34,08	34,11	0,246	0,142
10^{-06}	-6,00	38,12	37,68	37,23	37,68	0,445	0,257
10^{-07}	-7,00	42,23	42,89	41,94	42,35	0,487	0,281
10^{-08}	-8,00	41,92	> 45,00	42,87	42,40	0,672	0,388

Log Dil/reac: logaritmo de la dilución de cada reacción. Rep.: repetición, M: media, SD: desviación estándar, ES: error estándar

Por tanto, el cumplimiento de todas las condiciones permitió realizar ANOVA como prueba paramétrica. Los resultados de esta prueba ($F = 588,171$; valor- $p = 0,000$) mostraban la presencia de diferencias significativas entre las diluciones seriadas en función de la variable dependiente (los valores C_q).

Para poder determinar a qué nivel o niveles se encontraban las diferencias significativas se realizaron análisis *post hoc*, basados en el tamaño muestral la media armónica (2,842) y $\alpha = 0,05$. Se aplicaron tres tipos de comparaciones múltiples de los subconjuntos: Student-Newman-Keuls, HSD de Tukey y Duncan. Todos coincidieron en la presencia de 7 grupos claramente diferenciados, correspondientes a las diluciones seriadas entre 1 y 10^{-06} y, un último grupo sin diferencias significativas que reunió a las diluciones 10^{-07} y 10^{-08} .

En base a estos resultados se pudo establecer el límite de detección (LOD) del sistema de amplificación *I8S* y su límite de cuantificación (LOQ). La definición de LOD se corresponde con el menor nivel al cual el analito, en este caso ADNc de guisante, puede ser detectado con fiabilidad en una probabilidad del 95%. En este sentido los resultados determinaron que el LOD para este sistema de referencia *I8S* se correspondía con la dilución 10^{-06} . Por otro lado, LOQ es la menor cantidad a la cual hay confianza en la precisión de la medida realizada. Basándonos en esta definición, y los análisis *post hoc*, se determinó que LOQ coincidía de nuevo con la dilución 10^{-06} .-Los límites de detección y cuantificación constituyen un amplio rango de detección y cuantificación.-Los resultados obtenidos muestran un amplio rango de linealidad comparable con resultados obtenidos por otros autores (Kim *et*

al., 2003; Nicot *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010) y permitiendo extender la cuantificación relativa dentro de un amplio rango de valores.

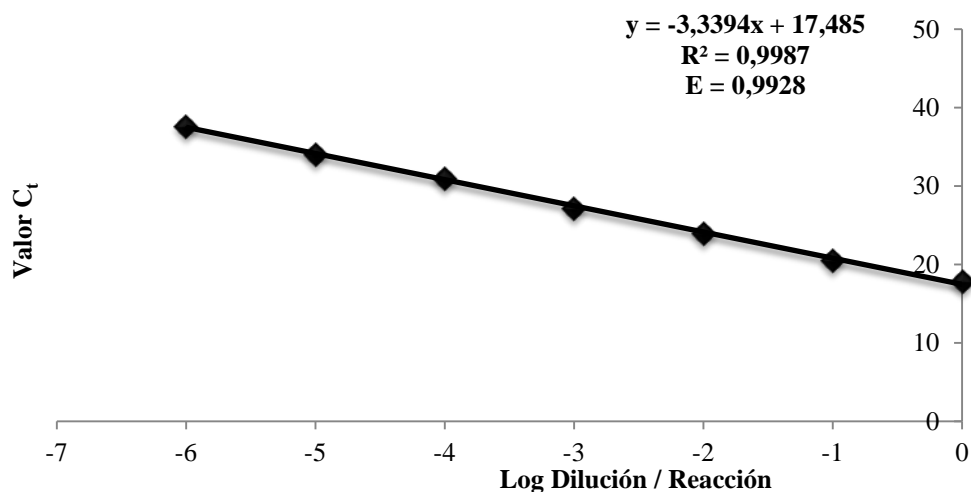


Figura IV.43. Curva estándar obtenida a partir de la amplificación de *18S* en diluciones seriadas

La construcción de la curva estándar (Figura IV.43) se realizó en base a los resultados de LOD y LOQ mencionados. Se construyó en función de las 7 primeras diluciones, obteniendo la recta mostrada en la Figura IV.45 y definida por la ecuación $y = -3,3394x + 17,485$, con un coeficiente de regresión próximo a 1 ($R^2 = 0,9987$). Todo esto indica una elevada linealidad del sistema y una eficiencia del sistema de 0,9928, también próxima a la unidad, demostrando una eficacia óptima del sistema *18S*.

Con el propósito de estandarizar la cantidad de ARN en las muestras y obtener una eficiencia uniforme en las reacciones enzimáticas se recomienda la utilización de genes constitutivos, tales como: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GADPH), albúmina, actina, tubulina, *18S* ARNr o 28s ARNr. Se ha demostrado que la expresión relativa de *18S* ARNr se mantiene bajo diferentes estados vegetativos, cultivares o tras radiación UV en especies vegetales como el arroz, a diferencia de GADPH, actina o tubulina (Kim *et al.*, 2003). En *Salvia miltiorrhiza* se ha demostrado que *18S* muestra mayores niveles de expresión con bajos valores C_q frente a otros genes de referencia, lo que refleja la alta eficiencia del sistema *18S*, aunque los autores proponen el uso combinado de actina y ubiquitina como genes de referencia en dicha especie al mostrar menores diferencias entre los diferentes tejidos vegetales, ya que *18S* mostró diferencias significativas en los niveles de expresión entre hojas y sépalos (Yang *et al.*, 2010). No obstante, varios autores recomiendan el sistema *18S* ARNr al comparar su efectividad frente a diversos genes como control interno en ensayos de cuantificación (Thellin *et al.*, 1999; Schmittgen y Zakrajsek, 2000; Blanquicett *et al.*, 2002; Bond *et*

al., 2002) y específicamente en ensayos de expresión en plantas (Kim *et al.*, 2003; Nicot *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2006).

En el trabajo de Die *et al.* 2010, los autores sugieren la combinación de hasta 4 genes de referencia para normalizar la medida en el caso de estrés abiótico (gen histona H3, β -tubulina, proteín-fosfatasa 2^a y factor de transcripción IIA). Sin embargo, sus datos muestran que este conjunto es el que presenta menor estabilidad en la expresión y mayor coeficiente de variación de la expresión relativa tras normalización de todos los sistemas propuestos. Estos condicionantes demuestran la complejidad de encontrar un sistema de normalización óptimo.

En este estudio seleccionamos *18S* ARNr ya que ha sido utilizado en numerosos trabajos de expresión (Pfaffl, 2001; Kenneth y Schmittgen, 2001; Bas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010). En base a las revisiones realizadas se trabajó siempre a partir de estípulas para evitar cualquier efecto debido a diferencias intrínsecas entre tejidos vegetales. Del mismo modo que se recogió el material tras el mismo tiempo de crecimiento para eliminar efectos debidos a estado vegetativo o de desarrollo de la planta (Yang *et al.*, 2010). Se asumió que el tratamiento de aclimatación no supone una situación altamente estresante. Todos estos los condicionantes, junto con la amplia utilización de *18S* como gen de referencia en trabajos similares, permitieron estudiar la expresión diferencial de los sistemas de amplificación diseñados en base a su estandarización mediante este gen de referencia.

En relación a cada uno de los 109 sistemas de amplificación se construyó su curva estándar, el ajuste a la recta expresado como el coeficiente de regresión (R^2) y la eficiencia de cada sistema expresado como E, tal y como se indica en el [Apartado III.3.3](#) correspondiente a materiales y métodos. Se debe establecer el rango dinámico en el cual la reacción es lineal, y debe cubrir al menos 3 órdenes de magnitud, e idealmente debe extenderse en diluciones de 5 a 6 *logs* (Bustin *et al.*, 2009). El intervalo lineal de la curva de calibración debe incluir el intervalo esperado de cuantificación de los genes objetivo. Los coeficientes de correlación (valores R^2) permiten determinar el ajuste de la curva de calibración de la linealidad, con un valor óptimo de 1.

Para determinar la ausencia de contaminación y distinguir la amplificación de productos no deseados (como el caso de dímeros de cebadores) de los productos deseados en la PCR mediante reacciones SYBR Green se añadieron NTC en cada una de las placas analizadas para cada uno de los ensayos realizados, tal y como se sugiere en Bustin *et al.* (2009). En todos los casos analizados los C_q resultantes fueron indeterminados, o mostraron valores superiores a 40, determinando que las amplificaciones eran óptimas y en ausencia de contaminaciones.

El rango de diluciones estudiado permite asegurar en todos los sistemas analizados, linealidad en la cuantificación hasta un $C_q \leq 40$. Los resultados de eficiencia y ajuste de la recta (Tabla IV.39) resultaron óptimos para todos los sistemas estudiados, a excepción de los sistemas *Ps_036*, *Ps_051*,

Ps_052 y *Ps_063*. En rojo se destacan los sistemas de amplificación que fallaron durante el proceso de comprobación (23 sistemas) y validación (4 sistemas).

Tabla IV.39. Linealidad y eficiencia en la cuantificación de los sistemas diseñados

<i>Ps_</i>	Pend	E	R ²	<i>Ps_</i>	Pend	E	R ²	<i>Ps_</i>	Pend	E	R ²	<i>Ps_</i>	Pend	E	R ²
<i>1</i>	<i>No amplificación</i>			<i>34</i>	-3,540	0,916	1,000	<i>67</i>	-3,001	1,154	0,999	<i>100</i>	-3,379	0,977	1,000
<i>2</i>	-3,551	0,912	0,999	<i>35</i>	-3,369	0,981	1,000	<i>68</i>	-3,826	0,825	0,998	<i>101</i>	-3,375	0,978	0,987
<i>3</i>	-3,361	0,984	0,999	<i>36</i>	<i>-1,883</i>	<i>2,397</i>	<i>0,603</i>	<i>69</i>	-3,980	0,784	0,999	<i>102</i>	-3,355	0,987	0,998
<i>4</i>	-3,195	1,056	0,997	<i>37</i>	-3,428	0,957	1,000	<i>70</i>	-3,204	1,052	0,997	<i>103</i>	-3,326	0,998	1,000
<i>5</i>	-3,324	0,999	0,999	<i>38</i>	-3,369	0,981	0,985	<i>71</i>	-3,231	1,040	0,996	<i>104</i>	-3,251	1,030	0,998
<i>6</i>	-3,594	0,898	0,999	<i>39</i>	-3,114	1,095	0,901	<i>72</i>	-3,071	1,116	0,822	<i>105</i>	-3,261	1,026	0,998
<i>7</i>	-3,357	0,985	0,999	<i>40</i>	<i>No amplificación</i>			<i>73</i>	-3,458	0,946	0,999	<i>106</i>	-3,307	1,006	0,999
<i>8</i>	<i>No amplificación</i>			<i>41</i>	-3,439	0,953	0,990	<i>74</i>	<i>No amplificación</i>			<i>107</i>	<i>No amplificación</i>		
<i>9</i>	-3,251	1,031	1,000	<i>42</i>	<i>No amplificación</i>			<i>75</i>	-3,299	1,010	0,999	<i>108</i>	-3,414	0,963	0,991
<i>10</i>	<i>No amplificación</i>			<i>43</i>	-3,772	0,841	1,000	<i>76</i>	-3,660	0,876	0,998	<i>109</i>	<i>No amplificación</i>		
<i>11</i>	-3,797	0,834	1,000	<i>44</i>	-3,439	0,953	0,991	<i>77</i>	-3,568	0,907	0,998	<i>110</i>	-3,350	0,988	0,999
<i>12</i>	<i>No amplificación</i>			<i>45</i>	<i>No amplificación</i>			<i>78</i>	-2,917	1,202	0,998	<i>111</i>	-3,161	1,072	0,997
<i>13</i>	-3,713	0,859	0,992	<i>46</i>	-3,546	0,914	0,999	<i>79</i>	-3,491	0,934	1,000	<i>112</i>	<i>No amplificación</i>		
<i>14</i>	-3,408	0,965	0,999	<i>47</i>	-3,531	0,920	0,999	<i>80</i>	<i>No amplificación</i>			<i>113</i>	-3,129	1,087	0,999
<i>15</i>	<i>No amplificación</i>			<i>48</i>	<i>No amplificación</i>			<i>81</i>	-3,328	0,998	0,999	<i>114</i>	<i>No amplificación</i>		
<i>16</i>	-3,243	1,034	0,992	<i>49</i>	-3,424	0,959	1,000	<i>82</i>	-3,189	1,059	0,999	<i>115</i>	-3,772	0,841	1,000
<i>17</i>	-3,528	0,921	0,969	<i>50</i>	<i>No amplificación</i>			<i>83</i>	-3,237	1,037	0,997	<i>116</i>	<i>No amplificación</i>		
<i>18</i>	-3,093	1,105	0,986	<i>51</i>	<i>-4,423</i>	<i>0,683</i>	0,999	<i>84</i>	-3,410	0,964	0,999	<i>117</i>	-3,352	0,987	1,000
<i>19</i>	-3,353	0,987	1,000	<i>52</i>	<i>-1,987</i>	<i>2,187</i>	<i>0,575</i>	<i>85</i>	-3,271	1,022	1,000	<i>118</i>	-3,074	1,115	0,989
<i>20</i>	-3,520	0,923	0,999	<i>53</i>	-3,000	1,154	0,999	<i>86</i>	-3,333	0,995	1,000	<i>119</i>	-3,182	1,062	0,998
<i>21</i>	-3,263	1,025	0,998	<i>54</i>	-3,255	1,029	1,000	<i>87</i>	-3,417	0,962	0,997	<i>120</i>	<i>No amplificación</i>		
<i>22</i>	-3,106	1,099	0,988	<i>55</i>	-3,341	0,992	1,000	<i>88</i>	-3,271	1,022	1,000	<i>121</i>	-3,291	1,013	1,000
<i>23</i>	-3,579	0,903	0,998	<i>56</i>	<i>No amplificación</i>			<i>89</i>	-3,308	1,006	0,998	<i>122</i>	-3,234	1,038	1,000
<i>24</i>	-3,357	0,986	0,998	<i>57</i>	-3,502	0,930	0,997	<i>90</i>	-3,171	1,067	0,999	<i>123</i>	-3,357	0,985	1,000
<i>25</i>	-3,347	0,990	1,000	<i>58</i>	-3,299	1,010	0,994	<i>91</i>	-3,298	1,010	0,999	<i>124</i>	-3,214	1,047	0,996
<i>26</i>	-3,478	0,939	1,000	<i>59</i>	-3,422	0,960	0,996	<i>92</i>	-3,682	0,869	1,000	<i>125</i>	<i>No amplificación</i>		
<i>27</i>	-3,404	0,967	0,999	<i>60</i>	-3,095	1,104	0,998	<i>93</i>	-3,214	1,047	0,998	<i>126</i>	-3,338	0,993	1,000
<i>28</i>	-3,410	0,964	1,000	<i>61</i>	-2,838	1,251	0,959	<i>94</i>	-3,434	0,955	0,997	<i>127</i>	-3,267	1,024	1,000
<i>29</i>	-3,177	1,064	0,994	<i>62</i>	-3,407	0,966	0,972	<i>95</i>	-3,240	1,035	1,000	<i>128</i>	-3,035	1,135	0,993
<i>30</i>	-3,260	1,027	0,999	<i>63</i>	-3,410	0,964	<i>0,220</i>	<i>96</i>	-3,275	1,020	1,000	<i>129</i>	-3,332	0,996	0,999
<i>31</i>	-3,291	1,013	0,997	<i>64</i>	-3,534	0,919	0,998	<i>97</i>	<i>No amplificación</i>			<i>130</i>	-3,427	0,958	0,997
<i>32</i>	<i>No amplificación</i>			<i>65</i>	-3,289	1,014	0,999	<i>98</i>	-2,609	1,417	0,998	<i>131</i>	-3,001	1,154	0,997
<i>33</i>	-3,602	0,895	0,998	<i>66</i>	-3,344	0,991	0,999	<i>99</i>	<i>No amplificación</i>			<i>132</i>	-2,949	1,183	0,993

Pend: pendiente de la recta, E: eficiencia, R²: coeficiente de regresión

Los ensayos de qPCR robustos y precisos están generalmente correlacionados con una elevada eficiencia en la PCR. La eficiencia de la PCR es particularmente importante cuando se trabaja en comparaciones entre amplificaciones de genes de referencia frente a genes para cuantificación relativa en base a ARNm. El método $\Delta\Delta Cq$ ha sido ampliamente aplicado para determinar las diferencias en

concentraciones entre muestras y se basa en la normalización mediante un único gen de referencia o un grupo de ellos (Winer *et al.*, 1999; Schmittgen *et al.*, 2000; Kennet y Schmittgen, 2001). Para poder aplicar este método las eficiencias del gen de referencia y de los genes a cuantificar deben ser comparables para asegurar la precisión de la cuantificación relativa.

La eficiencia en la amplificación por PCR debe ser definida en términos de curvas de calibración. Tal calibración permite obtener de forma simple, rápida y reproducible un indicativo de la eficiencia de la PCR, su sensibilidad analítica, y la robustez del ensayo. La eficiencia de la amplificación se determinó a través de la pendiente de la curva estándar *log*-linear. Específicamente, la eficiencia de la PCR (E) alcanza el máximo en 1, indicando que la cantidad de producto se duplica en cada ciclo. Los resultados obtenidos en todos los sistemas analizados, incluyendo el gen de referencia *18S*, se encuentran dentro del rango de eficiencia $E = 1,00 \pm 10\%$ permitiendo además asegurar la eficiencia de las amplificaciones por su proximidad al valor máximo, y permitiendo realizar una cuantificación relativa de forma precisa, ya que las eficiencias entre los diferentes sistemas de amplificación son comparables. Tan sólo los cuatro sistemas de amplificación mencionados (*Ps_036*, *Ps_051*, *Ps_052* y *Ps_063*) no obtuvieron niveles de eficiencia óptimos, se determinó que sus eficiencias podían comprometer la fiabilidad de la cuantificación relativa, y por tanto, fueron eliminados en esta etapa de la validación.

Los límites de detección y cuantificación no fueron determinados para los sistemas de amplificación diseñados ya que durante el estudio de la eficiencia y el establecimiento del rango dinámico lineal se observaron, para la mayoría de los sistemas, valores C_q próximos a 40 en la última dilución, 10^{-04} . Los valores C_q superiores a 40 no resultan fiables ya que están relacionados con una baja eficiencia y generalmente no deben ser tenidos en cuenta ya que pueden implicar la detección de falsos positivos (Burns y Valdivia, 2008). Por tanto, esta última dilución correspondería con los límites LOD y LOQ para todos los sistemas y se encuentran dentro del rango lineal del gen de referencia.

En resumen, todos los sistemas diseñados y el sistema de referencia *18S* han sido optimizados y comprobada su eficacia en cuantificación y detección. Como resultado de estas evaluaciones iniciales se obtuvieron un total de 105 sistemas de amplificación válidos, correspondientes a 105 genes candidatos para su cuantificación relativa en función del sistema *18S*. Estos sistemas han sido empleados en los ensayos de expresión para detectar expresión diferencial.

3. 2. Implementación de los sistemas de amplificación en la cuantificación relativa de la expresión diferencial ante la aclimatación

Análisis de la expresión diferencial en Medora y Melrose

En primer lugar se analizó la expresión diferencial entre dos genotipos diferentes de guisante en cuanto a tolerancia a heladas, por un lado Medora como variedad de primavera y susceptible a heladas y, por otro, Melrose como variedad de siembra otoño-invernal, como genotipo tolerante a heladas. La comparación de la expresión diferencial se realizó sobre las muestras sometidas al ensayo AC: dos semanas de aclimatación a 4°C. Se analizaron los niveles de expresión para cada uno de los 105 sistemas de amplificación seleccionados mediante el método $\Delta\Delta C_q$, basado en la normalización en relación al gen de referencia *18S*.

Los resultados obtenidos, expresados en ratios de diferencia entre los niveles de expresión, se muestran en la Figura IV.44. En ella se puede observar la presencia de sistemas de amplificación que mostraron expresión diferencial, tanto a nivel de subexpresión como de sobreexpresión. Estos resultados permitieron diferenciar genes que se expresaban diferencialmente bajo tratamiento dependiendo del grado de tolerancia de la variedad analizada. De esta forma, los resultados positivos indicaban una mayor expresión, sobreexpresión, mientras que los valores negativos implicaban subexpresión de dichos genes en Medora, genotipo susceptible a heladas, con respecto a Melrose, línea tolerante a heladas. Aquellos resultados que mostraron valores próximos a la unidad, en valor absoluto, correspondían a genes que no se expresaron diferencialmente según el grado de tolerancia tras el experimento de aclimatación.

La Figura IV.44 permite comparar los diferentes niveles de expresión mostrados por los dos genotipos evaluados tras el sometimiento de las plantas a dos semanas a 4°C. Los resultados permitieron observar una mayor sobreexpresión correspondiente al genotipo susceptible a heladas (Md), en varios sistemas como es el caso de *Ps_130*, *Ps_128* o *Ps_124* (valores positivos representados por las barras negras). Sin embargo, se observó también diferencias en los niveles de sobreexpresión de dichos sistemas, en los que por ejemplo el sistema *Ps_130* mostró unos niveles de expresión 35 veces superiores a los del genotipo tolerante a heladas, mientras que *Ps_124* se sobreexpresó igualmente en Medora pero con menor intensidad: triplicó los niveles de expresión de Melrose. Este mismo patrón de diferencias en los niveles de expresión se observó en los sistemas de amplificación con sobreexpresión en el genotipo tolerante a heladas (MI) con respecto al susceptible tras el proceso de aclimatación (valores negativos representados por las barras rojas).

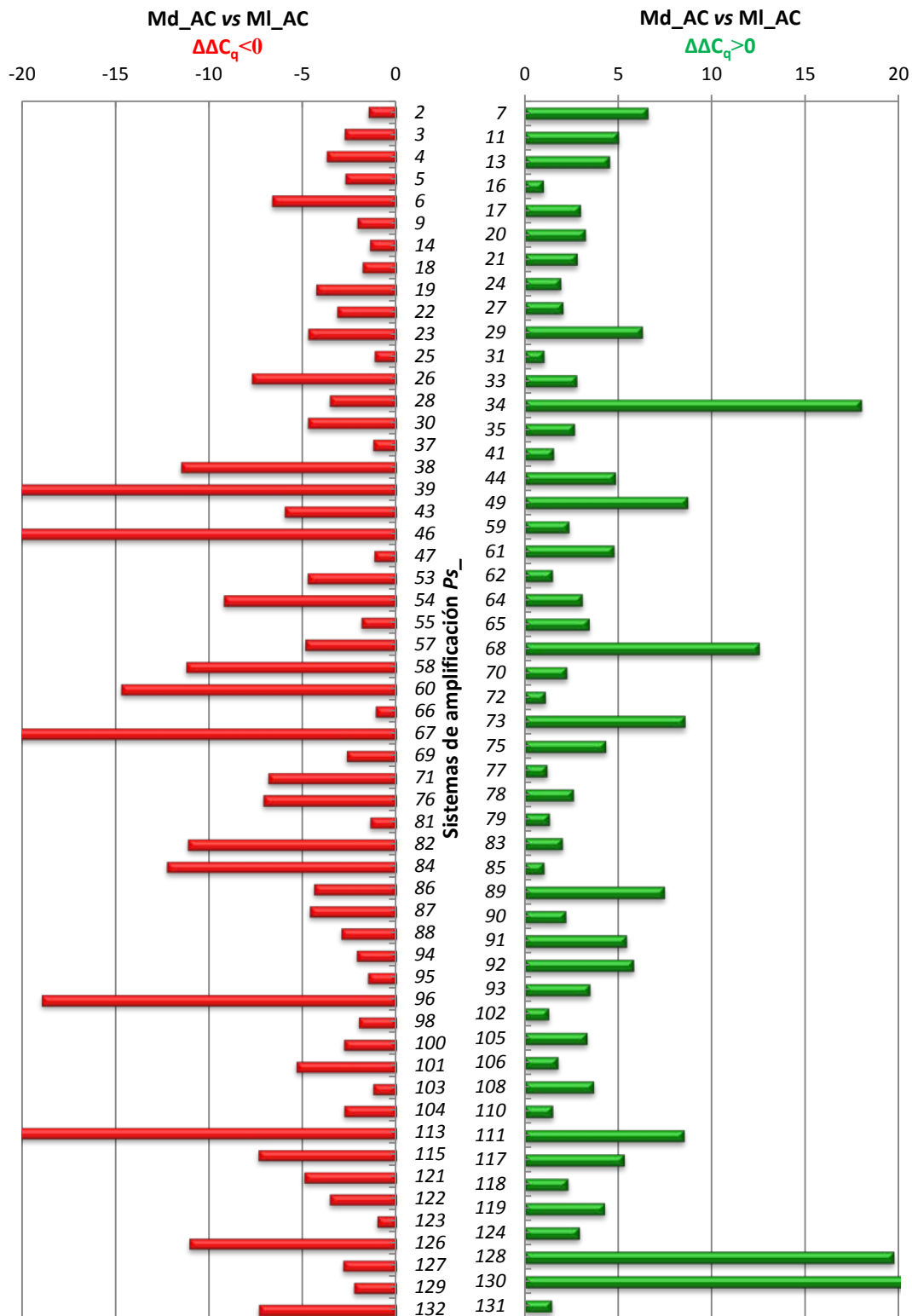


Figura IV.44. Representación gráfica del número de veces que se expresan diferencialmente los sistemas de amplificación en las líneas Medora y Melrose tras aclimatación (Md_AC vs MI_AC).

Entre todos los sistemas de amplificación representados en la Figura IV.46 se observó un elevado porcentaje de ellos con niveles de expresión diferencial reducidos, sin permitir esta representación establecer claramente que sistemas han mostrado una clara expresión diferencial entre los distintos

genotipos tras el proceso de aclimatación. Los resultados obtenidos tras el cálculo de $\Delta\Delta C_q$ mostraron valores muy diferentes dependiendo del sistema de amplificación analizado. Dentro de los 105 sistemas analizados, se seleccionaron aquellos que mostraron diferencias, en valor absoluto, de más del doble de nivel de expresión entre ambos genotipos tras dos semanas de aclimatación. Los sistemas seleccionados se detallan en la Tabla IV.40.

Por un lado se separaron aquellos sistemas que mostraron sobreexpresión de la línea tolerante, Melrose, con respecto a Medora (susceptible) y, por otro lado, los que mostraron subexpresión. Por último, se definieron como “sin efecto” a aquellos sistemas de amplificación que no mostraron diferencias claras en los niveles de expresión entre ambos genotipos. Del mismo modo, tanto subexpresión como sobreexpresión se dividieron en dos niveles. Un nivel claro de expresión diferencial, para aquellos sistemas de amplificación que mostraron valores absolutos mayores de 3, y un nivel bajo de expresión diferencial cuando los valores absolutos de $\Delta\Delta C_q$ estaban entre 2 y 3. Los valores entre -2 y 2 se consideraron como expresión similar entre los dos genotipos.

En resumen, 43 sistemas de amplificación mostraron sobreexpresión en Melrose frente a Medora tras el proceso de aclimatación. Entre los 43 sistemas con sobreexpresión, 32 mostraron niveles de sobreexpresión hasta tres veces superior en Melrose que los niveles detectados en Medora. Dentro de los 37 sistemas que mostraron subexpresión, 26 mostraron niveles superiores a tres de la línea tolerante frente a la susceptible. Sólo 25 de los sistemas analizados no mostraron niveles claramente diferentes entre ambas líneas tras aclimatación.

La ausencia de diferencias de expresión entre ambos tipos de genotipos tras aclimatación puede deberse a que los genes sean de tipo constitutivo, cuya expresión tiende a ser constante independientemente de los factores externos o correspondan a genes, que sin ser constitutivos, no se vean afectados por el proceso de aclimatación. No obstante, dentro de este grupo de genes sin diferencias en expresión, puede ocurrir que el grado de sobreexpresión o subexpresión al que se ven sometidos dichos genes sea equiparable tanto en la línea tolerante como en la susceptible, y por tanto, este tipo de análisis tendería a enmascarar dichos genes posiblemente relacionados con el proceso de aclimatación de la planta en general, independientemente del genotipo. En este sentido se buscaron diferencias significativas entre las diferencias de expresión, encontrando en los bloques de sobreexpresión y subexpresión diferencias significativas ($\alpha > 0,95$) en todos los sistemas, pero sólo cinco de los 25 sistemas de expresión descritos como “sin efecto” mostraron diferencias significativas entre Medora tratada y Melrose tratada: *Ps_024*, *Ps_047*, *Ps_055*, *Ps_072* y *Ps_079*. El 80% restante de los sistemas de amplificación del bloque sin efecto no mostraron diferencias significativas entre el genotipo tolerante y el susceptible tras la aclimatación.

Tabla IV.40. Valores $\Delta\Delta C_q$ obtenidos en la comparación de los niveles de expresión de Medora y Melrose tras aclimatación

Sobreexpresión		Sobreexpresión		Sin Efecto		Subexpresión		Subexpresión	
P_s_-	$\Delta\Delta C_q$	P_s_-	$\Delta\Delta C_q$	P_s_-	$\Delta\Delta C_q$	P_s_-	$\Delta\Delta C_q$	P_s_-	$\Delta\Delta C_q$
039	-2129,66	088	-2,97	055	-1,88	083	2,04	017	3,01
067	-114,26	127	-2,86	018	-1,83	027	2,07	064	3,11
046	-111,94	100	-2,82	095	-1,53	090	2,22	020	3,26
113	-47,30	104	-2,81	002	-1,51	070	2,26	105	3,35
096	-18,98	003	-2,79	014	-1,44	118	2,32	065	3,46
060	-14,73	005	-2,74	081	-1,42	059	2,39	093	3,51
084	-12,29	069	-2,68	103	-1,27	078	2,63	119	4,30
038	-11,54	129	-2,29	037	-1,26	035	2,68	075	4,36
058	-11,26	094	-2,14	047	-1,20	033	2,81	013	4,54
082	-11,16	009	-2,10	025	-1,18	021	2,82	061	4,79
126	-11,09	098	-2,03	066	-1,13	124	2,94	044	4,86
054	-9,26			123	-1,04			011	5,03
026	-7,74			016	1,03			117	5,34
115	-7,40			085	1,06			091	5,47
132	-7,37			031	1,06			092	5,83
076	-7,14			072	1,13			029	6,30
071	-6,87			077	1,22			007	6,61
006	-6,66			102	1,30			089	7,48
043	-5,99			079	1,36			111	8,53
101	-5,37			131	1,47			073	8,58
121	-4,94			062	1,50			049	8,72
057	-4,90			110	1,52			108	9,53
053	-4,77			041	1,57			068	12,54
030	-4,76			106	1,80			034	18,00
023	-4,73			024	1,95			128	19,73
087	-4,65							130	34,86
086	-4,43								
019	-4,32								
004	-3,74								
028	-3,58								
122	-3,58								
022	-3,18								

En rojo se destacan los sistemas de amplificación sin diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos aclimatados.

3. 3. Establecimiento de los criterios de selección y cribado de genes

La necesidad de discernir los efectos de cada uno de los factores, proceso de aclimatación y nivel de tolerancia específico de genotipo, en la expresión posterior de la tolerancia a heladas llevó a establecer nuevos parámetros en el análisis de los datos obtenidos a partir de los ensayos mediante qPCR.

Criterios establecidos

Se observó que se podía discernir qué genes podían estar implicados en el proceso de aclimatación y, dentro de éstos, cuáles podrían estar relacionados en el acondicionamiento, por parte de las plantas tolerantes, durante el proceso de aclimatación, para poder sobrellevar las heladas. Se realizaron análisis comparativos entre los niveles de expresión de los dos tipos de líneas de guisante, tolerante (MI) y susceptible (Md), con respecto al estado control, o no aclimatada (NA), frente al estado tras aclimatación (AC).

De esta forma se pudieron establecer diferentes patrones en la variación de los niveles de expresión, en función a los valores $\Delta\Delta C_q$. Estos patrones permitieron determinar diferencias en el efecto de la aclimatación en función del genotipo y/o del propio proceso de aclimatación al establecer relaciones entre las variaciones en los niveles de expresión por aclimatación, sobreexpresión, subexpresión o sin efecto en el genotipo tolerante, comparándolos con su efecto en el genotipo susceptible. El esquema que representa estos patrones y permite determinar diferencias entre genotipos se muestra en la Figura IV.45 y las pautas seguidas se describen a continuación:

- I) MI_NA vs MI_AC \approx |1|. La expresión de un gen en una línea tolerante control frente a la misma línea tolerante tratada presentaba valores absolutos próximos a la unidad.
 - a) Md_NA vs Md_AC \approx |1|. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores absolutos próximos a la unidad; región 1 de la Figura IV.45. En este caso el gen se consideró no manifestaba cambios ya que sus niveles no variaban con respecto al tratamiento o a la variedad analizada.
 - b) Md_NA vs Md_AC $>$ 1. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores positivos; región 2a de la Figura IV.45. En este caso, se consideró que el gen presentaba subexpresión ante el tratamiento de forma específica para la línea susceptible.
 - c) Md_NA vs Md_AC $<$ 1. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores negativos; región 2b de la Figura IV.45. En este caso, se consideró que el gen presentaba sobreexpresión ante el tratamiento de forma específica para la línea susceptible.

- II) MI_{NA} vs $MI_{AC} > 1$. La expresión de un gen en una línea tolerante control frente a la misma línea tolerante tratada presentaba valores positivos mayores de 1. Es decir, dicho gen mostraba subexpresión en la línea tolerante aclimatada con respecto a su estado control.
- a) Md_{NA} vs $Md_{AC} \approx |1|$. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores absolutos próximos a la unidad; región 2d de la Figura IV.45. En este caso la expresión del gen dependía no sólo del tratamiento, sino que era específico de la línea tolerante, pues sólo se reducía su expresión en Melrose aclimatada y, por tanto, resultaba ser un gen de interés.
- b) Md_{NA} vs $Md_{AC} > 1$. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores positivos; región 3 de la Figura IV.45. Es decir, ambas líneas mostraban subexpresión de dicho gen tras tratamiento:
- i) Si el ratio entre ambas respuestas se aproximaba a 1 se consideró que el gen presentaba subexpresión ante el tratamiento, independientemente del grado de tolerancia de la línea de guisante evaluada; representada por la línea amarilla de la región 3 en la Figura IV.45. Por tanto, dicho gen estaba relacionado con el proceso de aclimatación pero no era decisivo en la supervivencia de la planta ante heladas posteriores.
- ii) Si ambas líneas respondieron en proporciones diferentes, se consideró que la subexpresión era debida al tratamiento pero que afectaba más a un tipo de línea que a otro; corresponde a las zonas superior e inferior separadas por la línea amarilla de la región 3 en la Figura IV.45.
- c) Md_{NA} vs $Md_{AC} < 1$. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores negativos; región 4 de la Figura IV.45. Es decir, en este caso la línea susceptible sobreexpresaba dicho gen en condiciones de aclimatación. En este caso, se consideró que el gen presentaba sobreexpresión ante el tratamiento de forma específica para la línea susceptible, mientras se veía reprimido en la línea tolerante y, por tanto, podía ser un gen decisivo en la supervivencia a heladas.
- III) MI_{NA} vs $MI_{AC} < 1$. La expresión de un gen en una línea tolerante control frente a la misma línea tolerante tratada presentaba valores negativos menores de -1. Es decir, dicho gen mostraba sobreexpresión en la línea tolerante aclimatada con respecto a su estado control.
- a) Md_{NA} vs $Md_{AC} \approx |1|$. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores absolutos próximos a la unidad; región 2c de la Figura IV.45. En este caso la expresión del gen dependía no sólo del tratamiento, sino que era específico de la línea tolerante, pues sólo se aumentaba su expresión en Melrose aclimatada y, por tanto, resultaba ser un gen de interés.
- b) Md_{NA} vs $Md_{AC} > 1$. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores positivos; región 6 de la Figura IV.45. Es decir,

en este caso la línea susceptible subexpresaba dicho gen en condiciones de aclimatación. En este caso, se consideró que el gen presentaba subexpresión ante el tratamiento de forma específica para la línea susceptible mientras que se veía potenciado en la línea tolerante y, por tanto, podía ser un gen decisivo en la supervivencia a heladas.

c) Md_NA vs $Md_AC < 1$. La expresión del mismo gen en una línea susceptible control frente a la misma línea susceptible tratada presentaba valores negativos; región 5 de la Figura IV.45. Es decir, ambas líneas mostraban sobreexpresión de dicho gen tras tratamiento:

i) Si el ratio entre ambas respuestas se aproximaba a 1, se consideró que el gen presentaba sobreexpresión ante el tratamiento independientemente del grado de tolerancia de la línea de guisante evaluada; representada por la línea amarilla de la región 5 en la Figura IV.45. Por tanto, dicho gen estaba relacionado con el proceso de aclimatación pero no era decisivo en la supervivencia de la planta ante heladas posteriores.

ii) Si ambas líneas respondieron en proporciones similares diferentes, se consideró que la sobreexpresión era debida al tratamiento pero que afectaba más a u tipo de línea que a otro; corresponde a la zonas superior e inferior separadas por la línea amarilla de la región 5 en la Figura IV.45.

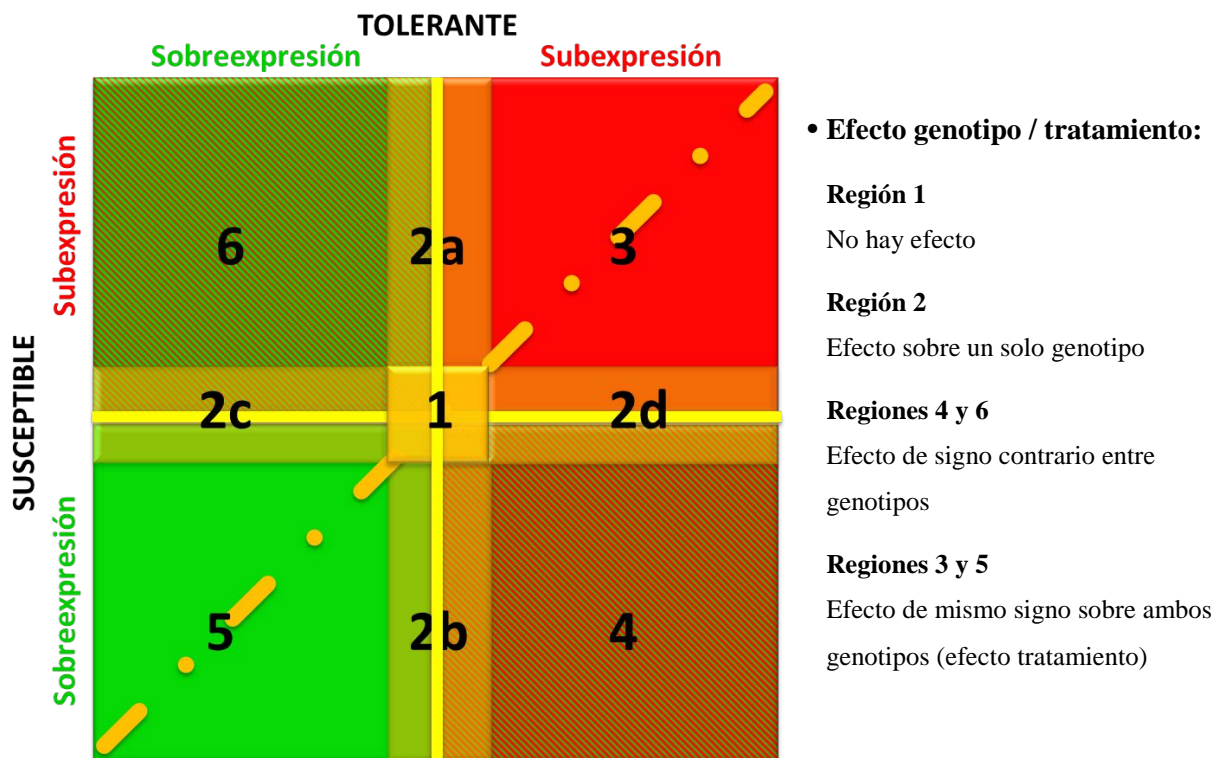


Figura IV.45. Patrones de variación en los niveles de expresión en función de los ratios $\Delta\Delta C_q$ entre cada uno de los genotipos, control y aclimatado.

Aplicación del criterio de selección en Medora y Melrose

Tabla IV.41. Resumen de los valores y ratios $\Delta\Delta C_q$ para Medora y Melrose sin aclimatar y aclimatadas con los criterios de selección y cribado de genes establecidos en este trabajo

	Md _{NA} /Md _{AC} MI _{NA} /MI _{AC}		Ratios	Efecto en Md y MI	Sobreexpresión		Subexpresión	
			MI / Md	Tratamiento	Tolerante	Susceptible	Tolerante	Susceptible
Ps_049			1,89	Sobreexpresión	Muy alto	Alto	No	No
Ps_028	-151,33	-180,47	0,84	Sobreexpresión	Muy alto	Muy alto	No	No
Ps_034	-77,85	1,53	-50,88	No	Alto	No	No	No
Ps_113	-59,07	-25071,97	0,00	Sobreexpresión	Alto	Muy alto	No	No
Ps_117	-47,57	3,92	-12,14	No	Alto	No	No	Bajo
Ps_022	-27,45	-150,18	0,18	Sobreexpresión	Alto	Muy alto	No	No
Ps_067	-24,57	-2337,96	0,01	Sobreexpresión	Alto	Muy alto	No	No
Ps_046	-23,79	-1099,16	0,02	Sobreexpresión	Alto	Muy alto	No	No
Ps_019	-20,29	-179,91	0,11	Sobreexpresión	Alto	Muy alto	No	No
Ps_100	-17,8	-81,73	0,22	Sobreexpresión	Medio	Muy alto	No	No
Ps_094	-11,38	-57,13	0,20	Sobreexpresión	Medio	Muy alto	No	No
Ps_006	-11,31	-28,58	0,40	Sobreexpresión	Medio	Alto	No	No
Ps_025	-11,07	-4,70	2,36	Sobreexpresión	Medio	Bajo	No	No
Ps_024	-10,10	-1,18	8,56	No	Medio	No	No	No
Ps_043	-7,31	-78,90	0,09	Sobreexpresión	Medio	Muy alto	No	No
Ps_078	-5,61	3,10	-1,81	No	Medio	No	No	Bajo
Ps_088	-5,09	-4,15	1,23	Sobreexpresión	Medio	Bajo	No	No
Ps_132	-4,91	-73,30	0,07	Sobreexpresión	Bajo	Alto	No	No
Ps_030	-4,76	-112,12	0,04	Sobreexpresión	Bajo	Muy alto	No	No
Ps_079	-4,73	2,40	-1,97	No	Bajo	No	No	Muy Bajo
Ps_053	-4,65	-15,24	0,31	Sobreexpresión	Bajo	Medio	No	No
Ps_020	-4,61	1,33	-3,47	No	Bajo	No	No	No
Ps_089	-4,57	16,91	-0,27	No	Bajo	No	No	Medio
Ps_090	-4,51	6,08	-0,74	No	Bajo	No	No	Medio
Ps_076	-4,46	-12,66	0,35	Sobreexpresión	Bajo	Medio	No	No
Ps_071	-4,45	1,12	-3,97	No	Bajo	No	No	No
Ps_058	-4,28	-6,79	0,63	Sobreexpresión	Bajo	Medio	No	No
Ps_023	-4,26	-9,71	0,44	Sobreexpresión	Bajo	Medio	No	No
Ps_098	-3,72	-4,42	0,84	Sobreexpresión	Bajo	Bajo	No	No
Ps_085	-3,37	1,51	-2,23	No	Bajo	No	No	No
Ps_017	-3,36	3,44	-0,98	No	Bajo	No	No	Bajo
Ps_033	-3,35	4,48	-0,75	No	Bajo	No	No	Bajo
Ps_014	-3,33	1,02	-3,26	No	Bajo	No	No	No
Ps_123	-3,09	1,18	-2,62	No	Bajo	No	No	No
Ps_038	-3,04	-54,33	0,06	Sobreexpresión	Bajo	Alto	No	No
Ps_066	-3,04	1,21	-2,51	No	Bajo	No	No	No
Ps_041	-2,85	4,82	-0,59	No	Muy bajo	No	No	Bajo
Ps_003	-2,79	-1,27	2,20	No	Muy bajo	No	No	No
Ps_104	-2,71	-2,72	1,00	No	Muy bajo	Muy bajo	No	No
Ps_092	-2,67	-1,17	2,28	No	Muy bajo	No	No	No
Ps_004	-2,65	-3,69	0,72	Sobreexpresión	Muy bajo	Bajo	No	No
Ps_110	-2,63	3,53	-0,75	No	Muy bajo	No	No	Bajo
Ps_002	-2,55	-1,84	1,39	No	Muy bajo	No	No	No
Ps_111	-2,50	-1,46	1,71	No	Muy bajo	No	No	No
Ps_127	-2,40	-4,35	0,55	Sobreexpresión	Muy bajo	Bajo	No	No
Ps_124	-2,21	9,05	-0,24	No	Muy bajo	No	No	Medio
Ps_081	-2,20	-2,06	1,07	Sobreexpresión	Muy bajo	Muy bajo	No	No
Ps_106	-2,15	1,05	-2,05	No	Muy bajo	No	No	No
Ps_009	-2,10	24,27	-0,09	No	Muy bajo	No	No	Alto
Ps_064	-2,01	-2,58	0,78	Sobreexpresión	Muy bajo	Muy bajo	No	No
Ps_031	-1,90	2,32	-0,82	No	No	No	No	Muy bajo

	Md _{NA} /Md _{AC} MI _{NA} /MI _{AC}		Ratios	Efecto en Md y MI	Sobreexpresión		Subexpresión	
			Ml / Md	Tratamiento	Tolerante	Susceptible	Tolerante	Susceptible
Ps_084	-1,83	-24,6	0,07	No	No	Alto	No	No
Ps_108	-1,82	8,46	-0,22	No	No	No	No	Medio
Ps_044	-1,81	-54,22	0,03	No	No	Alto	No	No
Ps_077	-1,73	-1,47	1,18	No	No	No	No	No
Ps_102	-1,73	1,29	-1,34	No	No	No	No	No
Ps_060	-1,71	-4,02	0,43	No	No	Bajo	No	No
Ps_069	-1,66	-1,72	0,97	No	No	No	No	No
Ps_103	-1,66	1,25	-1,33	No	No	No	No	No
Ps_037	-1,62	2,09	-0,78	No	No	No	No	Muy Bajo
Ps_070	-1,59	3,43	-0,46	No	No	No	No	Muy Bajo
Ps_055	-1,54	1,58	-0,97	No	No	No	No	No
Ps_115	-1,52	48,45	-0,03	No	No	No	No	Alto
Ps_091	-1,36	17,09	-0,08	No	No	No	No	Medio
Ps_093	-1,35	1,02	-1,32	No	No	No	No	No
Ps_131	-1,34	2,05	-0,65	No	No	No	No	Muy Bajo
Ps_126	-1,32	-69,59	0,02	No	No	Alto	No	No
Ps_061	-1,32	2,24	-0,59	No	No	No	No	Muy Bajo
Ps_105	-1,18	12,00	-0,10	No	No	No	No	Medio
Ps_082	-1,10	-3,33	0,33	No	No	Bajo	No	No
Ps_007	-1,05	25,63	-0,04	No	No	No	No	Alto
Ps_005	1,04	-1,27	-0,82	No	No	No	No	No
Ps_121	1,04	-1,13	-0,92	No	No	No	No	No
Ps_039	1,05	-1135,32	0,00	No	No	Muy Alto	No	No
Ps_059	1,08	2,87	0,38	No	No	No	No	Muy bajo
Ps_011	1,09	27,85	0,04	No	No	No	No	Alto
Ps_122	1,13	1,22	0,93	No	No	No	No	No
Ps_073	1,17	30,39	0,04	No	No	No	No	Alto
Ps_029	1,18	46,19	0,03	No	No	No	No	Alto
Ps_054	1,21	10,88	0,11	No	No	No	No	Alto
Ps_086	1,23	1,01	1,22	No	No	No	No	No
Ps_016	1,25	9,95	0,13	No	No	No	No	Medio
Ps_062	1,31	5,49	0,24	No	No	No	No	Medio
Ps_013	1,37	36,09	0,04	No	No	No	No	Alto
Ps_027	1,39	-1,09	-1,28	No	No	No	No	No
Ps_026	1,70	2,99	0,57	No	No	No	No	Muy Bajo
Ps_072	2,03	3,00	0,68	subexpresión	No	No	Muy bajo	Muy Bajo
Ps_118	2,12	17,19	0,12	subexpresión	No	No	Muy bajo	Medio
Ps_101	2,15	-39,56	-0,05	No	No	Alto	Muy bajo	No
Ps_018	2,16	5,12	0,42	subexpresión	No	No	Muy bajo	Bajo
Ps_035	2,27	17,74	0,13	subexpresión	No	No	Muy bajo	Medio
Ps_095	2,40	2,90	0,83	subexpresión	No	No	Muy bajo	Muy Bajo
Ps_119	2,59	29,39	0,09	subexpresión	No	No	Muy bajo	Alto
Ps_096	2,60	4,65	0,56	subexpresión	No	No	Muy bajo	Bajo
Ps_057	3,36	-104,42	-0,03	No	No	Muy alto	Bajo	No
Ps_083	4,13	16,65	0,25	subexpresión	No	No	Bajo	Medio
Ps_129	4,30	1,64	2,62	No	No	No	Bajo	No
Ps_075	4,36	243,46	0,02	subexpresión	No	No	Bajo	Muy Alto
Ps_048	5,50	4,86	1,13	subexpresión	No	No	Medio	Bajo
Ps_087	9,21	2,66	3,46	subexpresión	No	No	Medio	Muy Bajo
Ps_128	19,73	333	0,06	subexpresión	No	No	Medio	Muy Alto
Ps_047	19,83	10,87	1,82	subexpresión	No	No	Medio	Medio
Ps_130	34,86	26,740	1,30	subexpresión	No	No	Alto	Alto
Ps_021	71,29	335,40	0,21	subexpresión	No	No	Alto	Muy Alto
Ps_068	312,88	1,52	205,84	No	No	No	Muy alto	No

NA: No Aclimatada; AC: Aclimatada; Celdas gris claro: efecto de tratamiento; Celdas gris oscuro: efecto de genotipo.

Bajo estas pautas de comportamiento en los niveles de expresión se analizaron de nuevo los resultados obtenidos para los 105 genes y se establecieron las diferentes categorías de genes en relación a dicho comportamiento. Se establecieron las siguientes categorías: genes que no manifiestan cambios, genes relacionados con el proceso de aclimatación y genes específicos de tolerancia a heladas. En las dos últimas categorías se diferenciaron dos subcategorías atendiendo a los valores positivos (genes reprimidos) o con valores negativos (genes potenciados). Los resultados se muestran en la Tabla IV.41.

Los resultados obtenidos mostraron un total de 40 genes que se expresaban diferencialmente bajo condiciones de aclimatación dependiendo de la variedad analizada. Del total, 25 genes se sobreexpresaron en condiciones de aclimatación, es decir, se vieron potenciados. Este efecto resultó ser dependiente del genotipo, de forma que en 21 de los 25 genes la sobreexpresión resultó ser más intensa en la línea tolerante, mientras que sólo en 4 el efecto fue mayor en el genotipo susceptible.

Un total de 15 sistemas de amplificación mostraron subexpresión, y por tanto, se clasificaron como genes reprimidos por efecto del proceso de aclimatación. El efecto de subexpresión se vio acentuado en la línea tolerante frente a la susceptible para 11 de ellos, y en 4 de ellos mostraron niveles de subexpresión mayores en el genotipo susceptible frente al tolerante.

En relación a los genes asociados a estos sistemas de amplificación, se muestran en la Tabla IV.42 los genes cuya expresión se ha visto modificada por efecto del tratamiento. En esta tabla se resumen los genes que han mostrado sobreexpresión o subexpresión vinculada a la aclimatación y la posible función en la que están implicadas las proteínas codificadas por dichos genes.

Por otro lado, estos análisis permitieron intuir que la expresión diferencial de algunos genes era debida al proceso de aclimatación y sólo afectaba a uno de los genotipos. De este modo, se diferenciaron sistemas con sobreexpresión en alguno de los genotipos y sistemas de subexpresión específico de genotipo.

Se encontraron 15 genes que expresaron niveles de sobreexpresión en el genotipo tolerante mientras que en el genotipo susceptible no se detectó aumento en la expresión. Otros 2 sistemas de amplificación mostraron subexpresión tras el proceso de aclimatación de forma específica en la línea tolerante. Con respecto al genotipo susceptible, 8 genes mostraron sobreexpresión específica del mismo y 16 presentaron subexpresión específica del genotipo susceptible tras el proceso de aclimatación. Los genes relacionados con expresión diferencial dependiente de genotipo se muestran en la Tabla IV.43.

Tabla IV.42. Sistemas de amplificación, genes y posible función con expresión diferencial debida a la aclimatación en los genotipos Medora y Melrose

	Gen codificante / Proteína codificada	Número Accesión	Posible Función
	<i>Ps_004</i> Transportados auxinas	<i>AY222857</i>	Metabolismo auxinas.
	<i>Ps_006</i> Apirasa	<i>AB022319</i>	Regulación Energía (ATP extracelular)
	<i>Ps_019</i> 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (<i>acs2</i>)	<i>AF016459</i>	Síntesis de etileno
	<i>Ps_022</i> Proteína P54	<i>Y11207</i>	Proteína de almacenamiento
	<i>Ps_023</i> Factor de Transcripción MADS Box	<i>AJ223318</i>	Factor de Transcripción
	<i>Ps_025</i> Glutamina sintetasa	<i>X04763</i>	Metabolismo del nitrógeno
	<i>Ps_028</i> Albúmina	<i>M81864</i>	Proteína de almacenamiento
	<i>Ps_030</i> Inhibidor de Tripsina	<i>AJ414576</i>	Inhibidor de proteasas
	<i>Ps_038</i> Lipoxigenasa LoxN	<i>AF098270</i>	Peroxidación lipídica y Movimiento de lípidos
	<i>Ps_043</i> Glutamato deshidrogenasa (<i>gdh</i>)	<i>AM238439</i>	Metabolismo de carbono y el nitrógeno
	<i>Ps_046</i> Proteína DEAD box P68	<i>AF271892</i>	Regulación inicio de la transcripción
	<i>Ps_049</i> Citocromo P450	<i>AF218296</i>	Transporte de electrones y actividad monooxigenasa
	<i>Ps_053</i> Adenilato isopenteniltransferasa (PsIPT2)	<i>AB194605</i>	Metabolismo citoquininas. Actividad a nivel de ARN
Sobrexpresión por efecto de la aclimatación en Md y MI	<i>Ps_058</i> Homólogo de Alcohol Deshidrogenasa (<i>adh</i>)	<i>AB087831</i>	Interconversión alcoholes a cetonas o aldehídos. Regulación niveles NAD y NADPH
	<i>Ps_064</i> Proteína interruptor de ciclo celular (<i>cc52a</i>)	<i>DQ059036</i>	Proliferación y diferenciación celular. Procesos de endorreduplicación
	<i>Ps_067</i> Chalcona sintasa (<i>pschs1</i>)	<i>X63333</i>	Metabolismo secundario, compuestos fenólicos
	<i>Ps_076</i> Citosina-5-ADN metiltransferasa	<i>AF034419</i>	Metilación del ADN
	<i>Ps_081</i> Dehidrina (<i>dhn</i>)	<i>X63061</i>	Proteína anticongelante
	<i>Ps_088</i> Glucosa6-fosfato deshidrogenasa (<i>g6pdh1</i>)	<i>DQ811791</i>	Metabolismo energético (NADPH)
	<i>Ps_094</i> Proteína de Choque Térmico	<i>AY167669</i>	Plegamiento proteínas (relacionado con estrés)
	<i>Ps_098</i> Glicoproteína rica en hidroxiprolina-1 (<i>hrgp-1</i>)	<i>AB087834</i>	Desarrollo pared celular. Embriogénesis.
	<i>Ps_100</i> Proteína knox clase 1 (<i>hop1</i>)	<i>AF063307</i>	Factor de Transcripción
	<i>Ps_113</i> Proteína rica en Prolina	<i>AJ233399</i>	Proteína de almacenamiento. Relacionada con la estructura de la pared celular
	<i>Ps_127</i> Proteína transportadora de sacarosa	<i>DQ221697</i>	Transporte pasivo de sacarosa
	<i>Ps_132</i> Vicilina	<i>Y00722</i>	Proteína de almacenamiento
	subexpresión por efecto de la aclimatación en Md y MI	<i>Ps_018</i> 2-cis peroxirredoxin	<i>AJ315851</i>
<i>Ps_021</i> ácido 12-oxofitodienoico 10,11-reductasa (<i>opdar</i>)		<i>AB044940</i>	Metabolismo ácido jasmónico
<i>Ps_035</i> Proteína de poro		<i>Z73553</i>	Transporte y movilización
<i>Ps_047</i> Proteína DEAD box P72		<i>AF188678</i>	Regulación inicio de la transcripción
<i>Ps_048</i> Citoquinina oxidasa/deshidrogenasa 1 (<i>ckx1</i>)		<i>EF030477</i>	Metabolismo citoquininas
<i>Ps_072</i> Co-Z SOD		<i>AB189165</i>	Antioxidante
<i>Ps_075</i> Cisteína proteasa		<i>Z68291</i>	Metabolismo catalítico proteínas
<i>Ps_083</i> Ferredoxina I		<i>M17107</i>	Obtención de energía. Cadena respiratoria
<i>Ps_087</i> Giberelina 20-oxidasa		<i>X91658</i>	Síntesis de giberelina
<i>Ps_095</i> Proteína de Choque Térmico 22		<i>X86222</i>	Plegamiento proteínas (relacionado con estrés)
<i>Ps_096</i> Factor de Transcripción de choque térmico (<i>hsfa</i>)		<i>AJ010643</i>	Regulación inicio de la transcripción
<i>Ps_118</i> Ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa		<i>AF369887</i>	Ruta de las pentosas fosfato y fijación del carbono
<i>Ps_119</i> ORF putativo: S-adenosilmetinina descarboxilasa (<i>samdc</i>)		<i>PSU60592</i>	Biosíntesis de poliaminas (regulación hormonal)
<i>Ps_128</i> Superóxido dismutasa (SOD)	<i>AB087845</i>	Antioxidante	
<i>Ps_130</i> Tiorredoxina h (<i>trxh</i>)	<i>AJ310990</i>	Regulación red-ox	

Tabla IV.43. Sistemas de amplificación, genes y posible función con expresión diferencial debida a la diferencia entre genotipos Medora y Melrose

	Gen codificante / Proteína codificada	Número Accesión	Posible Función	
Sobreexpresión en MI	<i>Ps_014</i>	AcetilCoA carboxilasa (accA)	AB029556	Metabolismo ácidos grasos
	<i>Ps_017</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril coA	AF303583	Metabolismo esteroides. Regulación hormonal
	<i>Ps_020</i>	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (acs1)	AF016458	Síntesis etileno
	<i>Ps_024</i>	Proteína "MADS box" M2	AY884287	Factor de Transcripción
	<i>Ps_033</i>	S-adenosilmetionina sintetasa 1	AB087842	Biosíntesis de poliaminas. Regulación hormonal
	<i>Ps_034</i>	Piruvato deshidrogenasa quinasa mitocondrial isoforma 1 (pdk1)	EU153567	Regulación Piruvato deshidrogenasa. Metabolismo Energía
	<i>Ps_066</i>	Chalcona isomerasa	PSU03433	Metabolismo flavonoides. Antioxidante
	<i>Ps_071</i>	Convicilina (cvc)	AJ276875	Proteína de almacenamiento
	<i>Ps_078</i>	Nueva citocromo P450 monooxigenasa inducible por daño	PSU29333	Transporte de electrones y actividad monooxigenasa
	<i>Ps_079</i>	"dead box" ARN helicasa	AY167671	Transporte ARNm. Desarrollo. Respuesta al estrés.
	<i>Ps_085</i>	Precursor γ -glutamylcisteína sintetasa (gsh1)	AF128455	Metabolismo glutatión
	<i>Ps_089</i>	Fosfolípido Glutatión peroxidasa	AJ000508	Metabolismo glutatión. Inhibe peroxidación lipídica
	<i>Ps_090</i>	Glutatión reductasa	X98274	Antioxidante
<i>Ps_117</i>	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa	PEARUBP2	Fijación CO ₂ . Metabolismo Energía	
<i>Ps_123</i>	Proteína quinasa relacionada con snf1 (snrk1)	AJ971810	Metabolismo ABA. Respuesta ambiental	
Sobreexpresión en Md	<i>Ps_039</i>	Isoflavona sintasa	AF532999	Síntesis Isoflavonas. Metabolismo secundario
	<i>Ps_044</i>	Galactinol sintasa	AJ243815	Síntesis de rafinosa y otros azúcares
	<i>Ps_057</i>	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa	M98357	Síntesis de etileno
	<i>Ps_060</i>	Arginina descarboxilasa	Z37540	Metabolismo de aminoácidos y ciclo de la urea
	<i>Ps_082</i>	Proteína inductora de respuesta dof (erdp)	AB026297	Regulación de la transcripción
	<i>Ps_084</i>	Giberelina 20-oxidasa	U70471	Síntesis de giberelina
	<i>Ps_101</i>	Leghemoglobina	AB009844	Captador oxígeno
<i>Ps_126</i>	Estaquiosa sintasa	AJ311087	Metabolismo oligosacáridos	
Subexpresión en Md	<i>Ps_007</i>	Acorbato peroxidasa (APxI)	X62077	Antioxidante
	<i>Ps_009</i>	Aleno óxido sintasa (aos)	AB095985	Activación genes defensa
	<i>Ps_011</i>	ADP-glucosa pirofosforilasa	X96764	Síntesis de almidón
	<i>Ps_013</i>	acil-ACP:sn-glicerol-3-P-acilT	X59041	Síntesis de glicerolípidos. Desarrollo vegetal
	<i>Ps_016</i>	5,10-metilenhidrofolato DH-5,10-metiltetrahidrofolato ciclohidrolasa	AF030516	Catabolismo de nucleótidos. Metabolismo del folato
	<i>Ps_029</i>	Proteína de respuesta al ABA	Z15128	Metabolismo del ácido abscísico
	<i>Ps_041</i>	Fe- SOD 8	AY426764	Antioxidante
	<i>Ps_054</i>	Adenilato isopenteniltransferasa	AB194604	Metabolismo citoquininas. Actividad ARN
	<i>Ps_062</i>	Carboxipeptidasa	Z68130	Maduración post-transcripcional. Metab. ptoteínas
	<i>Ps_073</i>	Criptocromo 1 (cry1)	AY161310	Regulación del fototropismo y del ritmo circadiano
	<i>Ps_091</i>	Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (gapc1)	L07500	Glucólisis
	<i>Ps_105</i>	Peroxisredoxina mitocondrial (prx)	AJ717306	Antioxidante
	<i>Ps_108</i>	Fosfolipasa C	Y15253	Transducción de señales
	<i>Ps_110</i>	Fitoeno desaturasa (pds)	AJ621573	Metabolismo carotenoides
<i>Ps_115</i>	Piruvato descarboxilasa	Z66543	Glicólisis. Ciclo Krebs	
<i>Ps_124</i>	Gen snf5	DQ539420	Estructura del nucleosoma	
Sub exp. MI	<i>Ps_068</i>	Precursor de chaperonina en cloroplasto	U21139	Organización pared celular. Respuesta al estrés
	<i>Ps_129</i>	Factor de simbiosis (sym8)	EF447277	Nodulación

La Tabla IV.41 muestra la complejidad del comportamiento diferencial de cada uno de los sistemas de amplificación analizados para ambos genotipos tras los ensayos control y aclimatación. Para visualizar mejor los resultados obtenidos se representaron los valores $\Delta\Delta C_q$ en porcentajes, Figura IV.46. En la figura el 100% se corresponde con el nivel máximo de subexpresión (y -100% en el caso de sobreexpresión) de cada gen. La diferencia de tonalidades grises muestra, dentro de cada sistema de amplificación, qué proporción corresponde a cada una de las líneas y el signo de su expresión (sobreexpresión o subexpresión).

La Figura IV.46 permite observar, dentro de los niveles de sobreexpresión y subexpresión, que porcentaje correspondió a la expresión de cada uno de los genotipos y comparar así el comportamiento que presentaron los distintos genotipos frente al proceso de aclimatación. Se pudo comprobar cómo, en el caso concreto de algunos genes, ambos genotipos se comportaban de forma opuesta ante la aclimatación. En este sentido, determinados sistemas de amplificación han mostrado sobreexpresión tras aclimatación sólo en la línea tolerante, como ha sido el caso de *Ps_057*, *Ps_101*. En cambio, otros sistemas mostraron subexpresión en dichas líneas frente a la sobreexpresión detectada en el genotipo susceptible, como ejemplos destacables de este caso de los sistemas de amplificación *Ps_089*, *Ps_090* o *Ps_117*.

La mayoría de los sistemas de amplificación que mostraron expresión diferencial entre el ensayo control y el ensayo de aclimatación mostraron el mismo signo de diferenciación. Sin embargo, los niveles alcanzados en cada uno de los genotipos pudieron ser claramente diferentes, como fue el caso de los sistemas *Ps_029*, *Ps_068* y *Ps_075* como ejemplo de subexpresión en ambos genotipos, o los sistemas *Ps_046*, *Ps_067*, *Ps_075*, *Ps_113* o *Ps_126* como los ejemplos más claros de sobreexpresión en ambos genotipos. Sin embargo, aunque estos se correspondieron con ejemplos de diferente grado de expresión diferencial entre el genotipo tolerante y el susceptible, hay que destacar que el análisis es aún más complejo ya que, por ejemplo, los niveles de subexpresión fueron más elevados para el genotipo susceptible en *Ps_068* pero no así en los otros dos ejemplos.

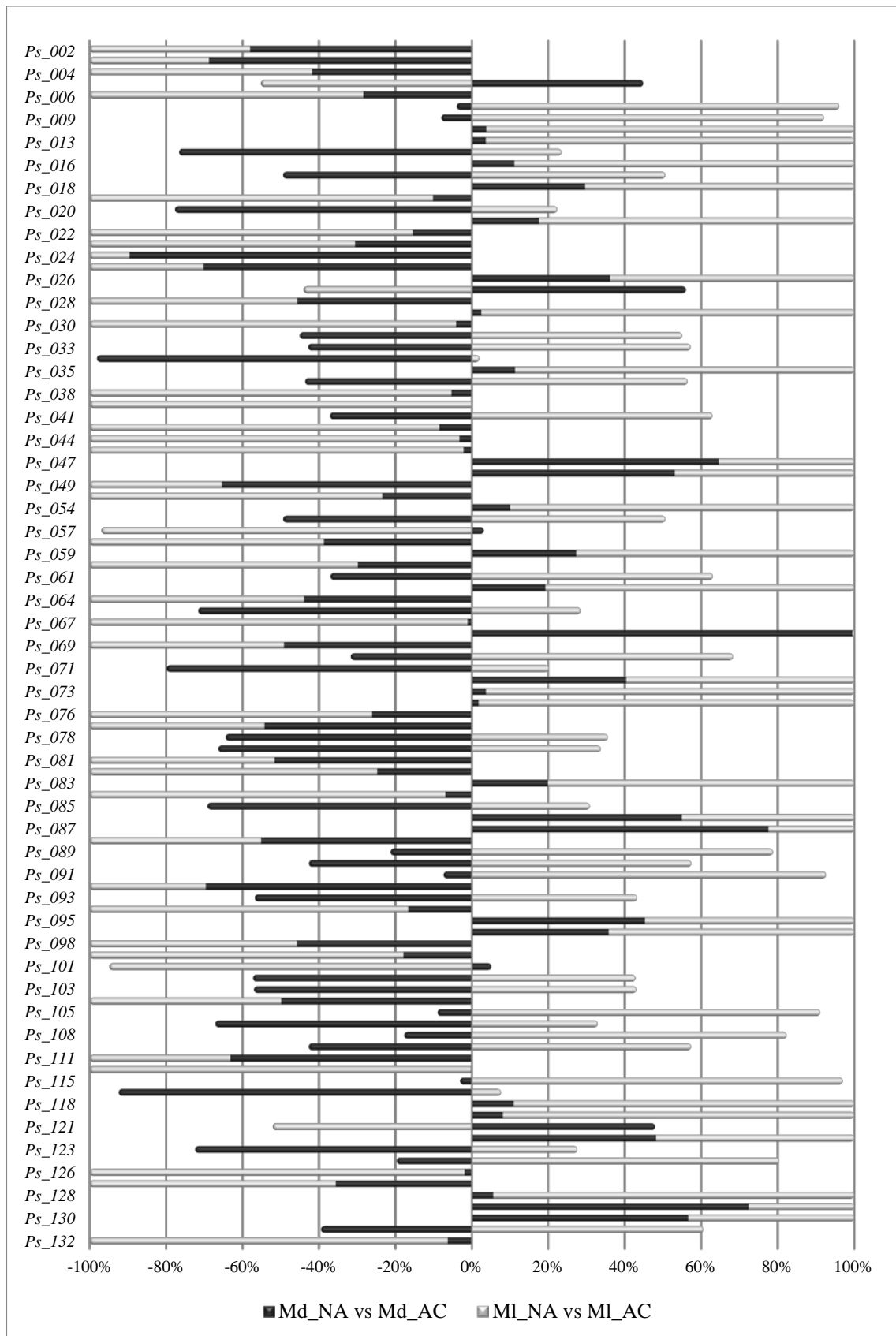


Figura IV.46. Porcentajes de expresión diferencial entre los experimentos control (NA) y aclimatación (NA)

3. 4. Análisis de la expresión diferencial en otros genotipos de guisante

Los resultados obtenidos hasta el momento han resultado complejos en su interpretación. Igualmente, sólo se han descartado 18 de los 105 sistemas de amplificación iniciales. Esta complejidad y el número elevado de sistemas afectados por la aclimatación determinaron la necesidad de establecer diferencias entre ellos que permitieran reducir su complejidad de interpretación.

Para comprobar que estos niveles y efectos se mantenían independientemente de la línea a estudio, se analizaron los 87 pares de cebadores en otros 4 genotipos. Dos de ellos susceptibles, Terese y ZP-1366, y dos tolerantes, Champagne y Cheyenne ([Anexo IV.5](#), [Anexo IV.6](#)). Se compararon con los resultados obtenidos previamente para los genotipos Medora y Melrose (Tabla IV.41).

Todos los sistemas de amplificación analizados permitieron obtener resultados cuantificables para los 6 genotipos comparados.

A partir de los valores C_q se calcularon los $\Delta\Delta C_q$ y se analizaron los resultados para comprobar:

- (1) Los niveles de expresión diferencial de los seis genotipos de guisante sin aclimatar y tras la aclimatación.
- (2) Los resultados de la evaluación por separado de genotipos susceptibles y genotipos tolerantes tras el experimento control y tras tratamiento de aclimatación.
- (3) El análisis conjunto de la expresión diferencial mostrada por las seis líneas evaluadas.

Niveles de expresión diferencial de los genotipos sin aclimatar y tras la aclimatación

A partir de la comparación entre los niveles de expresión alcanzados por los 87 genes evaluados para los seis genotipos en condiciones control (no aclimatación) y tras aclimatación se establecieron diferencias. Se pudieron determinar los genes cuya expresión se vio potenciada o reprimida por efecto de la aclimatación, tal y cómo se muestra en la Tabla IV.44, independientemente del genotipo específico.

Los resultados mostraron como el proceso de aclimatación produjo un efecto claro sobre la expresión de algunos genes a nivel de transcripción. El efecto más patente fue la sobreexpresión de genes, salvo para un único caso; (*Ps_119*) en el cual el proceso de aclimatación tuvo un efecto represor en su transcripción para todas las líneas evaluadas. Este sistema de amplificación, específico de una secuencia cuyo supuesto ORF corresponde con la S-adenosilmetionina descarboxilasa, mostró menores valores tras aclimatación que en condiciones control para todos los genotipos. La subexpresión de este gen afectaría a la biosíntesis de poliaminas, de forma que su inhibición se ha relacionado con la detección o el retardo del ciclo celular (Wang *et al.*, 2003) y su aumento suele vincularse a la senescencia de órganos vegetales (Pandey *et al.*, 2000).

Tabla IV.44. Sistemas de amplificación dependientes del proceso de aclimatación

	Gen codificante / Proteína codificada	Número Accesión	Posible Función
Sobreexpresión	<i>Ps_006</i> Apirasa	<i>AB022319</i>	Regulación Energía (ATP extracelular)
	<i>Ps_019</i> 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (<i>acs2</i>)	<i>AF016459</i>	Síntesis de etileno
	<i>Ps_022</i> Proteína P54	<i>Y11207</i>	Proteína de almacenamiento
	<i>Ps_023</i> Factor de Transcripción MADS Box	<i>AJ223318</i>	Factor de Transcripción
	<i>Ps_028</i> Albúmina	<i>M81864</i>	Proteína de almacenamiento
	<i>Ps_030</i> Inhibidor de Tripsina	<i>AJ414576</i>	Inhibidor de proteasas
	<i>Ps_038</i> Lipoxigenasa LoxN	<i>AF098270</i>	Peroxidación lipídica y Movimiento de lípidos
	<i>Ps_044</i> Galactinol sintasa	<i>AJ243815</i>	Síntesis de rafinosa y otros oligosacáridos
	<i>Ps_049</i> Citocromo P450	<i>AF218296</i>	Transporte de electrones y actividad monooxigenasa
	<i>Ps_053</i> Adenilato isopenteniltransferasa PsIPT2	<i>AB194605</i>	Metabolismo citoquininas. Actividad a nivel de ARN
	<i>Ps_058</i> Homólogo de Alcohol Deshidrogenasa (<i>adh</i>)	<i>AB087831</i>	Interconversión alcoholes a cetonas o aldehídos. Regulación niveles NAD y NADPH
	<i>Ps_060</i> Arginina descarboxilasa	<i>Z37540</i>	Metabolismo de aminoácidos y glutamato
	<i>Ps_076</i> Citosina-5-ADN metiltransferasa	<i>AF034419</i>	Metilación del ADN
	<i>Ps_084</i> GA 20 oxidasa	<i>PSU70471</i>	Regulación de Giberelina
	<i>Ps_092</i> Precursor de glutatión sintetasa (<i>gshs</i>)	<i>AF231137</i>	Síntesis glutatión (relacionado con estrés)
	<i>Ps_094</i> Proteína de Choque Térmico	<i>AY167669</i>	Plegamiento proteínas (relacionado con estrés)
	<i>Ps_100</i> Proteína knox clase 1 (<i>hop1</i>)	<i>AF063307</i>	Factor de Transcripción
	<i>Ps_111</i> Antigen nuclear de proliferación celular	<i>AB008186</i>	Protección daño oxidativo ADN
	<i>Ps_113</i> Proteína rica en Prolina	<i>AJ233399</i>	Proteína de almacenamiento. Relacionada con la estructura de la pared celular
	<i>Ps_126</i> Estaquiosa sintasa	<i>AJ311087</i>	Síntesis de oligosacáridos
	<i>Ps_127</i> Proteína transportadora de sacarosa	<i>DQ221697</i>	Transporte pasivo de sacarosa
	<i>Ps_132</i> Vicilina	<i>Y00722</i>	Proteína de almacenamiento
Subexpresión	<i>Ps_119</i> ORF putativo: S-adenosilmetinina descarboxilasa (<i>samdc</i>)	<i>PSU60592</i>	Biosíntesis de poliaminas (regulación hormonal)

Los 22 sistemas de amplificación restantes mostraron mayores niveles de amplificación tras aclimatación independientemente del genotipo analizado, por tanto, se asumió la sobreexpresión de los genes correspondientes por efecto específico del proceso de aclimatación. Entre los genes que han mostrado una mayor expresión a nivel de ARNm durante el proceso de aclimatación cabe destacar que se encontró un porcentaje elevado de genes relacionados con proteínas o su metabolismo. En menor porcentaje se encontraron genes relacionados con la síntesis y el transporte pasivo de azúcares, otros implicados en la respuesta fitohormonal o en la regulación de la expresión génica, a nivel de transcripción, y por último algunos implicados en actividad antioxidante o protectora ante el estrés oxidativo (Figura IV.47).

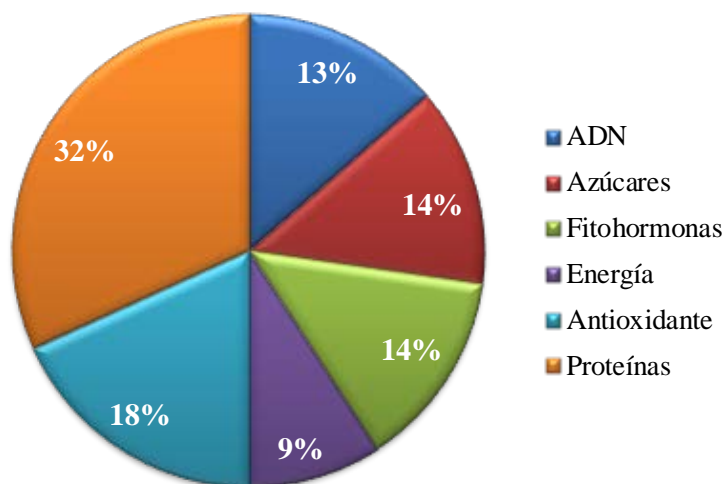


Figura IV.47. Metabolismos asociados a los sobreexpresión de genes por aclimatación en genotipos tolerantes a heladas

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran como el proceso de aclimatación favoreció la sobreexpresión de un total de 22 genes en todos los genotipos analizados, indicando que la transcripción de todos ellos es inducida por el tratamiento a 4°C durante dos semanas.

Se ha comentado previamente el elevado porcentaje de estos genes, sobreexpresados bajo condiciones de aclimatación, que se encuentran relacionados con proteínas y su metabolismo. Dentro de estos genes se agrupan varios codificantes para proteínas de almacenamiento: proteína P54, albúmina, proteínas ricas en prolina y vicilina.

La proteína P54 es una proteína presente en copia única en el genoma de guisante que se expresa normalmente durante la desecación de la semilla y desaparece tras la germinación, sin embargo se ha detectado su presencia en respuesta a estrés hídrico tras exposición a ácido abscísico, osmolitos o desecación (Castillo *et al.*, 2000). En el mismo trabajo se propone que el posible precursor de P54 pertenezca a la superfamilia de las vicilinas, y es demostrado mediante análisis de secuencia y modelado 3D por Castillo *et al.* (2005). La sobreexpresión de vicilina durante la aclimatación encontrada en este estudio puede deberse a la inducción de la transcripción de un precursor común a ambas proteínas de almacenamiento, P54 y vicilina, lo cual coincide con las características distintivas del gen codificante para la proteína P54 descritas en Castillo *et al.* (2005): inducción diferencial por ABA y por presencia de elementos de respuesta al estrés en su promotor.

Las proteínas ricas en prolina, como la correspondiente al sistema *Ps_113*, son proteínas cuya función principal está relacionada con la estabilidad de la estructura de la pared celular. La estabilidad de dicha pared es esencial para la supervivencia celular y nuestros resultados serían acordes con la necesidad de la planta de mantener dicha estructura debido a la sobreexpresión mostrada en todas las muestras aclimatadas. Peng *et al.* (2011) demostraron la importancia de este tipo específico de

proteínas en el desarrollo vegetal, al igual que en la respuesta al estrés abiótico. La sobreexpresión manifestada por el gen codificante para una proteína rica en prolina procedente de algodón en levaduras, *Schizosaccharomyces pombe*, sometidas a bajas temperaturas relaciona a este gen con la respuesta vegetal frente al estrés por frío durante del desarrollo de la semilla de algodón (Huang *et al.*, 2011).

La albúmina es una proteína soluble en agua con una elevada proporción de aminoácidos sulfurados (10,6%) (Higgings *et al.*, 1986) y es parcialmente resistente a proteasas microbianas (Spencer *et al.*, 1988). Es dependiente de la presencia de azufre en el medio debido a la presencia de promotores *downstream* (SREs: *Sulfur Responsive Elements*) (Morton *et al.*, 1998) y está relacionada con las globulinas *IIS* tipo legumina a modo de precursor (Tai *et al.*, 2001). Aunque históricamente se ha establecido el almacenamiento como su principal papel biológico, la demostración de actividad antimitótica en estudios celulares embrionarios parece indicar un papel regulador de la albúmina durante las fases iniciales del desarrollo de la semilla (Galvez *et al.*, 1999). El análisis de secuencia sobre los dominios proteicos de la albúmina en ricino (*Ricinus communis*) revelaron la presencia de un dominio de la familia de inhibidores tripsina/ α -amilasa, sugiriendo un papel de la albúmina en la resistencia ante insectos (Chen *et al.*, 2004).

En guisante se produce una reducción en la acumulación de legumina y albúmina bajo condiciones limitantes de azufre, debido a un mecanismo post-transcripcional (Beach *et al.*, 1985; Chandler *et al.*, 1984). Por tanto, el gen codificante para albúmina no sólo es expresado durante la formación de semilla, habiéndose demostrado además que sobre la síntesis de albúmina hay sistemas de regulación a diferentes niveles y debidos a diversos estreses bióticos y abióticos. Nuestros resultados muestran que ante el proceso de aclimatación los niveles de transcripción de este gen se ven potenciados, lo que parece indicar que el papel de la albúmina no sólo se limita al almacenamiento sino que su papel es más complejo y se relaciona con la respuesta a diferentes estreses, ejerciendo probablemente un control sobre la mitosis.

En relación a los análisis previos realizados en este trabajo en referencia a los QTL asociados a tolerancia a heladas, el metabolismo proteico representó un papel importante al mostrarse asociados numerosos QTL a enzimas relacionadas con la regulación de dicho metabolismo así como con el transporte de aminoácidos y péptidos. En este sentido, rasgos como la expresión de daños generales mostraron QTL en regiones asociadas a GTM para genes como *P54* o *PepTrans*. Asimismo, la expresión de daños en tallos se asoció con la expresión de *PepC*, el daño mostrado en hojas se relacionó con diversos GTM relacionados con el metabolismo proteico como *DipeptIV*, *Ptrans* o *Elsa*. Por último, la formación de brotes se asoció a dos GTM: *ThiolP* y *Peptrans*.

Durante la aclimatación también se ha comprobado la activación en la transcripción del gen codificante para un inhibidor de tripsina (*Ps_030*) y del gen codificante para una proteína de choque

térmico (*Ps_094*). La activación de proteinasas e inhibidores coincide en el tiempo o precede a un incremento en la tolerancia en trigo y pepino en el inicio de su endurecimiento. En concreto, los inhibidores de tripsina mantienen unos niveles de actividad incrementada durante todo el periodo de endurecimiento del trigo, sugiriendo que este tipo de inhibidores están relacionados con la adaptación de la planta al frío (Frolova *et al.*, 2011). Del mismo modo, se ha demostrado que casi todos los tipos de estrés inducen la producción de las proteínas de choque térmico (Al-Whaibi, 2011). Por tanto, la sobreexpresión mostrada durante la aclimatación sigue la línea de inducción de estos genes como adaptación al cambio de temperatura.

También se han observado modificaciones en el metabolismo de poliaminas, un aumento de los niveles de transcripción de la arginina descarboxilasa (*Ps_060*) frente a una disminución en la transcripción de S-adenosilmetionina descarboxilasa (*Ps_119*). Esto parece indicar una posible reducción de las poliaminas espermidina y espermina frente a una acumulación de putrescina. Esta diamina simple ha sido relacionada con la respuesta a diferentes estreses incluyendo deficiencia en K^+ , amonio, exposición a bajo pH, estrés osmótico, toxicidad por calcio o SO_2 , radiación UV-B (Galston *et al.*, 1990; Flores, 1991; Groppa y Benavides, 2008) e infecciones por patógenos (Torrighiani *et al.*, 1997). La enzima arginina descarboxilasa ha sido reconocida como enzima clave en el metabolismo de poliaminas en respuesta a estrés abiótico y biótico (Flores, 1991; Mo y Pua, 2002; Perez-Amador *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2003). Varios tipos de estreses ambientales inducen la expresión de ARNm del gen de la arginina descarboxilasa y su actividad enzimática en un diverso número de especies (Bouchereau *et al.*, 1999).

En *Arabidopsis thaliana* se han caracterizado dos genes codificantes para arginina descarboxilasa, y ambos presentan elevados niveles de transcripción ante estrés por bajas temperaturas al igual que se acumula putrescina. En este sentido, se ha observado que mutantes para ambos genes se ven afectados en su nivel de supervivencia ante estrés por congelación, el cual revierte tras la adición de putrescina al medio de crecimiento (Cuevas *et al.*, 2008; 2009). Según estos datos, los resultados en nuestro trabajo demuestran un comportamiento similar de las líneas de guisante evaluadas tras aclimatación, en la que se sobreexpresa la enzima arginina descarboxilasa de forma que se ve favorecida la formación de putrescina a partir de arginina. Sin embargo, el paso de putrescina a espermidina y espermina se ve dificultado por una reducción en la S-adenosilmetionina descarboxilasa, y por tanto las células acumularían putrescina ante el estrés por bajas temperaturas al igual que en *A. thaliana*.

En *A. thaliana* también se ha detectado regulación positiva en la expresión de algunos tipos de proteína transportadora de sacarosa (Lundmark *et al.*, 2006) por efecto de las bajas temperaturas. En nuestros ensayos de aclimatación también se detectó el aumento en los niveles de transcripción de *Ps_127*, correspondiente a una proteína transportadora de sacarosa, posiblemente relacionado con un

proceso de facilitación del transporte pasivo de sacarosa en hojas que se desarrolla a bajas temperaturas tal como sugieren los autores.

La acumulación de sacarosa promueve el crecimiento celular y la endopoliploidización, e induce el almacenamiento de almidón y proteínas en guisante (Wang y Hedley, 1993), *Vicia faba* (Weber *et al.*, 1996) y trigo (Jenner *et al.*, 1991). Los guisantes que sobreexpresan un transportador de sacarosa muestran estimulada la biosíntesis y almacenamiento de proteínas a nivel de transcritos, proteínas y cuerpos proteicos. Se ha concluido que una de las principales funciones de la sacarosa, tanto como señal o como motor, es estimular la acumulación de proteínas de almacenamiento (Rosche *et al.*, 2002; 2005). Además, se ha demostrado que la señal de sacarosa interacciona con el ácido abscísico (ABA; Finkelstein *et al.*, 2002). Posiblemente la sacarosa incremente la sensibilidad del ABA o sus niveles (Smeekens, 2000) o el ABA actúe como modulador de la respuesta a las señales de sacarosa. Mientras que la limitación de sacarosa conlleva un detrimento para la planta, un exceso de azúcar puede repercutir en la repuesta ante el estrés causada directamente por la fuente de glúcido en sí misma, por su metabolismo (Price *et al.*, 2004) o vía efecto indirecto, tal como el incremento de la captación de agua y el estrés hiperosmótico (Rolletschek *et al.*, 2002b). Tales condiciones estresantes pueden desencadenar unas respuestas múltiples y complejas en las que participen cambios hormonales, metabólicos y transcripcionales (Price *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2008; Schulaev *et al.*, 2008).

En resumen, la sobreexpresión del transportador de sacarosa, observado tras la aclimatación, puede traducirse en una acumulación de sacarosa. De esta forma, las plantas de guisante responderían ante una situación de estrés a través de la sacarosa acumulada.

El incremento observado en los niveles de transcripción de genes relacionados con la síntesis de oligosacáridos como las enzimas galactinol sintasa (*Ps_044*) y estaquirosa sintasa (*Ps_126*) parece corresponder a un patrón de comportamiento común en plantas ante diferentes estreses abióticos, de forma que la acumulación de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs), como la estaquirosa, se relaciona con la adaptación al estrés (dos Santos *et al.*, 2011; Ishibashi *et al.*, 2011). En relación al proceso de aclimatación al frío se ha observado que se produce una leve acumulación de estos RFOs en *Medicago falcata* pero no en *M. truncatula*, demostrando que una mayor acumulación de azúcares solubles, unida a una mayor transcripción de genes específicos de aclimatación, en *M. falcata*. Aunque también, este tipo de azúcares podrían ejercer como reguladores osmóticos, al igual que la sacarosa. Este efecto inductor podría conferir en una mayor tolerancia de esta especie a la congelación frente a *M. truncatula*. (Zhang *et al.*, 2011). En nuestro trabajo se muestra el mismo comportamiento en los genotipos de guisante analizados. El papel biológico de este tipo de oligosacáridos se ve relacionado con funciones de carácter antioxidante (Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2008).

El metabolismo de azúcares, así como su transporte, también ha sido relacionado en este trabajo con la expresión de rasgos asociados a la tolerancia a heladas. Los GTM como *Gs3b* asociado a daño

general y la formación de brotes, *Bfruct* y *Egll* asociados al daño en tallos y los múltiples GTM asociados al daño en hojas (*Bfruct*, *Sucsyn*, *Ugfgt*, *Sps* y *Xyft*) demuestran la relación de este metabolismo glucídico con la tolerancia a heladas evaluada en cámara climática.

Los resultados obtenidos en esta fase del trabajo, relacionan un efecto sobre la expresión de genes asociados al metabolismo de glúcidos, producido durante la fase de aclimatación y mantenido durante la fase de heladas. Su repercusión es patente a nivel fisiológico en relación a rasgos evaluables visualmente y determinantes de la tolerancia a heladas como es el grado de daño mostrado por las plantas de guisante a diferentes niveles; general, hojas y tallos.

La capacidad antioxidante parece verse aumentada, no sólo por la acumulación de los RFOs, sino porque se ha observado el aumento en la transcripción de citocromo P450 (*Ps_049*), precursor de glutatión sintasa (*Ps_092*), antígeno nuclear de proliferación celular (*Ps_111*) o la citosina-5-ADN metiltransferasa (*Ps_076*).

La regulación positiva del citocromo P450 ante estrés por bajas temperaturas ha sido descrito en diferentes especies, tal es el caso del musgo *Physcomitrella patens* (Xiaoqin *et al.*, 2009) o de la uva, *Vitis vinifera*, (Davies y Robinson, 2000). Un estudio más reciente (Woronuk *et al.*, 2010) realizado en dos especies del género *Phaseolus*, *P. vulgaris* y *P. angustissimus*, muestra que esta última especie, caracterizada por una mayor tolerancia a heladas, es capaz de mantener los niveles de expresión citocromo P450. Mientras *P. vulgaris* es incapaz de mantener los niveles de expresión, sugiriendo que la clave para la tolerancia a heladas en *Phaseolus* es el mantenimiento de los niveles de expresión de genes homeostáticos bajo condiciones de heladas.

La expresión de citocromo P450 también se encuentra relacionada con la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual también se ha visto sobreexpresada durante el proceso de aclimatación (*Ps_058*). Ambas enzimas están relacionadas con la conversión de alcohol a acetaldehído, el cual, a través de otra conversión a acetato, puede incorporarse en el Ciclo de Krebs. No obstante, el citocromo P450, a diferencia de la enzima alcohol deshidrogenada, puede formar especies reactivas del oxígeno, ROS, implicadas directamente en la peroxidación lipídica y la formación de malondialdehído (MDA).

Taylor *et al.* (2005) muestran en sus resultados como el estrés por aclimatación (36h a 4°C) produce un ligero aumento de la respiración (frente a condiciones control, o estrés químico o presencia de herbicidas), una leve reducción de la fotosíntesis y tan sólo una ligera acumulación de equivalentes MDA como indicador de la acumulación de hidroperóxidos lipídicos. Es el estrés que mayor reducción en la respiración mitocondrial produce.

Dicha acumulación de hidroperóxidos lipídicos está relacionada directamente con los procesos de peroxidación lipídica, en los que toman parte diversas enzimas, entre ellas la lipoxigenasa LoxN

(*Ps_038*). Esta enzima pertenece a la familia de las lipoxigenasas y, entre otras funciones, juega un papel crucial en la ruta de señalización del jasmonato. El jasmonato y sus derivados son considerados hormonas de base lipídica con un papel crucial en la respuesta defensiva. La sobreexpresión de este tipo de enzimas ha sido asociada a la respuesta ante estreses tanto bióticos como abióticos en diversas especies vegetales, incluyendo la respuesta al estrés por bajas temperaturas como es el caso del arbusto *Caragana jubata*, perteneciente a la familia de las leguminosas (Bhardwaj *et al.*, 2010).

El papel antioxidante del glutatión ha sido ampliamente estudiado (Diaz Vivancos *et al.*, 2010; Noctor *et al.*, 2012) y se conoce su carácter reductor en presencia de peróxido de hidrógeno. Por tanto, el aumento en los niveles de transcripción durante la aclimatación mostrada en nuestros ensayos puede ser justificado como una respuesta preventiva ante un estrés que favorece la aparición de ROS. De igual forma, en presencia de cadmio como metal pesado se ha detectado el aumento de las enzimas como la glutatión sintetasa en plantas tolerantes a este metal pesado (Zhang y Shu, 2006). El glutatión ha sido relacionado con la respuesta ante diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Mullineaux y Rausch, 2005; Ogawa, 2005; Szalai *et al.*, 2009). El aumento en la transcripción del precursor de glutatión sintetasa (*Ps_092*) detectado en nuestro trabajo parece responder a este patrón de respuesta ante diferentes tipos de estrés.

Nuestros resultados mostraron un aumento en la transcripción del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA; *Ps_111*). PCNA es una proteína nuclear que favorece la síntesis de ADN ya que es un cofactor de la δ -ADN polimerasa (Moldovan *et al.*, 2007) y actúa como factor de procesividad para esta polimerasa (Burgers, 1988; Krishna *et al.* 1994) ya que ancla esta ADN polimerasa al ADN. PCNA está también relacionada con las vías de tolerancia al daño sobre el ADN, conocidas como reparación post-replicación (Lehmann y Fuchs, 2006). Cuando existen daños en el ADN, la proteína PCNA se reubica y participa en la vía de reparación del ADN dependiente de la ruta RAD6, de reparación post-replicativa del ADN (Bishay *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2005). Varios estudios han demostrado la inducción de diferentes variantes de PCNA en diversas especies bajo diferentes situaciones de estrés: como en arroz sometido a agentes dañinos como la luz UV o H₂O₂ (Yamamoto *et al.*, 2005), o *Arabidopsis thaliana* en presencia de cadmio (Liu, *et al.*, 2008). En este sentido, se ha comprobado la elevada complejidad en la regulación de la expresión ante situaciones de estrés oxidativo que implican la regulación de PCNA y su efecto en la expresión de otros genes, como las familias multigénicas de oxidasas alternativas de forma conjunta tanto en *A. thaliana* como en soja, *Glycine max* (Ho *et al.*, 2007). En este sentido, se puede entender la sobreexpresión de PCNA en la planta de guisante sometida a aclimatación como un método preventivo de respuesta ante el estrés mediante mecanismos de reparación a nivel de ADN.

Las ADN-metiltransferasas son las principales responsables del proceso de metilación del ADN, vinculado a procesos de diferenciación celular, e inactivación de genes. En concreto, la sobreexpresión

de citosina-5-ADN metiltransferasa (*Ps_076*) detectada en nuestros experimentos podría estar relacionada con un tipo de ADN-metiltransferasas activadas en respuesta a estrés salino o por baja temperatura, del mismo modo que en arroz (Sharma *et al.*, 2009). En este sentido los autores, sugieren un papel clave de este tipo de proteínas y los procesos epigenéticos en su efecto sobre la actividad genómica durante situaciones de estrés. Parece probable que la activación en la expresión de ADN-metiltransferasas en guisante esté relacionada con una modificación del patrón de expresión génica debido al efecto de la temperatura de aclimatación, de modo que esta modificación permite modular la expresión de diferentes genes a través de la metilación.

Se observó un aumento en los niveles de expresión de factores de transcripción tipo KNOX (*Ps_100*) y MADS-box (*Ps_023*). Ambos factores de transcripción están relacionados con el proceso de diferenciación celular y procesos de organogénesis. Recientemente se ha vinculado la temperatura con la actividad transcripcional de genes tipo MADS-box en muchas plantas, lo que implicaría la sincronización de la floración con el cambio estacional, de forma que en *A. thaliana* y cereales se ha demostrado el papel de este tipo de genes en la regulación de la aceleración de la floración por vernalización (Hemming y Trevaskis, 2011). Esta relación entre la temperatura y la floración se ha establecido en guisante, en concreto, Lejeune-Henaut *et al.* (2008) han relacionado el *locus* de floración *Hr*, dependiente del fotoperiodo, con la tolerancia a la dureza invernal. Estos autores sugieren la relación entre la dureza invernal y el retraso en la floración a través de *Hr*. Por tanto, ambas líneas de estudio convergen en la hipótesis de la relación entre la expresión de estos factores de transcripción con la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva mediada por la temperatura y el fotoperiodo. De este modo, la regulación positiva en la expresión de estos factores de transcripción en las líneas de guisante sometidas a 4°C, parece corroborar esta hipótesis. No obstante, hay que tener en cuenta que en este estudio el ADN procede de tejidos en un estado vegetativo temprano, lejos del momento de cambio al estado reproductivo.

En relación a la regulación fitohormonal ya se ha comentado la regulación a nivel de poliaminas y jasmonatos ante bajas temperaturas. En este sentido, los resultados de nuestro trabajo muestran una activación en la transcripción de enzimas relacionadas con la síntesis y regulación de etileno (*Ps_019*), citoquininas (*Ps_053*) y giberelinas (*Ps_084*). La síntesis de etileno está directamente relacionada con daño en el tejido vegetal, en concreto la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa tipo 2 (ACS2) no sólo se acumula tras daño tisular sino también ante condiciones de enfriamiento en *Citrus sinensis* (Wong *et al.*, 1999) y en tabaco (Ge *et al.*, 2000).

El aumento hallado en la transcripción de adenilato isopenteniltransferasa (PsIPT2), relacionada con el metabolismo de citoquininas, concuerda con el proceso de senescencia inducible que permite aumentar la resistencia al estrés abiótico, concretamente ante estrés químico (Zhang *et al.*, 2010) en yuca (*Manihot esculenta*).

El papel de las giberelinas (GAs) en la tolerancia al estrés en plantas ha sido estudiado por diversos autores, entre ellos, se destaca una regulación negativa de las giberelinas ante diferentes condiciones estresantes (Son *et al.*, 2010). Sin embargo otros estudios muestran una regulación positiva de giberelina ante estrés por frío (Yamauchi *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un incremento en los niveles de transcripción de GA-20 oxidasa (*Ps_084*). A este respecto, hay que tener en cuenta que el tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de GAs conlleva un incremento en los transcritos de GA-20 oxidasa, mostrando una regulación en la biosíntesis de GAs del tipo retroalimentación negativa. De modo que, el tratamiento a bajas temperaturas puede producir la acumulación de GAs, como en *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2005), pudiendo participar en el proceso de vernalización que favorece la floración. Se ha demostrado el papel fundamental de las GAs en la detoxificación por metales pesados y en la tolerancia al estrés salino mediante la inducción del crecimiento vegetal, la síntesis de cloroplastos, la activación de enzimas antioxidantes y la prevención de la peroxidación lipídica (Saeidi-Sar *et al.*, 2007; Maggio *et al.*, 2010).

Sin embargo, no se ha detectado efecto sobre otras fitohormonas con auxinas o ácido abscísico (ABA). Esta ausencia de variación en los niveles de transcripción de auxinas puede deberse a que su papel se desarrolla fundamentalmente en las fases iniciales de crecimiento, siendo responsables del desarrollo del sistema radicular. En relación al ABA, cuyo papel sí se desarrolla en diferentes etapas del crecimiento de la planta, está implicado en el cierre de estomas y el bloqueo de la síntesis de carotenoides y clorofila, y por tanto, el aumento de sus niveles podría provocar efectos negativos en la respiración y coloración de la planta, los cuáles no se han detectado.

Por último, la sobreexpresión detectada en el gen apirasa (*Ps_006*) se ha encontrado bajo diferentes condiciones estresantes, principalmente de carácter abiótico en *Arabidopsis*: estrés hipertónico (Kim *et al.*, 2009), por frío o estrés osmótico (Jeter *et al.*, 2007; Roux y Steinebrunner 2007) y en otras especies como en soja (Alam *et al.*, 2010) en situación de encharcamiento, o en patata ante estrés oxidativo en general (Kim *et al.*, 2006). Su función principal es regular los niveles de ATP extracelular, estando relacionado con el crecimiento vegetal y la actividad ante ROS, de forma que algunos autores sugieren que este ATP extracelular puede tener un papel como señal potencial como respuesta a daño y estrés (Song *et al.*, 2006). En el caso concreto de nuestro trabajo, la sobreexpresión del gen codificante para la apirasa podría ser interpretada como un mecanismo de prevención, permitiendo obtener energía rápidamente a la vez que ejerce un papel protector frente al estrés oxidativo, aunque no se ha demostrado esta hipótesis.

El tratamiento realizado en líneas de guisante a 4°C durante dos semanas ha mostrado ejercer un efecto regulador de carácter positivo en varios genes. En líneas generales se han visto alterados los metabolismos proteico y glucídico así como el metabolismo hormonal. En concreto, ha habido una sobreexpresión de genes codificantes para proteínas de almacenamiento que han demostrado tener un

papel importante en la respuesta ante diferentes tipos de estrés, así como proteínas relacionadas con la estructura celular o con un papel claramente defensivo con las proteínas de choque térmico. El metabolismo de glúcidos se ha visto alterado a nivel de transportadores de sacarosa y potenciación de la síntesis de oligosacáridos tipo RFO, relacionados con procesos de aclimatación y tolerancia a heladas, además de un posible papel a nivel transcripcional.

Asimismo, los niveles de diferentes fitohormonas pueden verse comprometidos debido a la sobreexpresión de enzimas implicadas en la síntesis de etileno, citoquininas y giberelinas. Un caso particular a nivel hormonal ha sido la regulación diferencial de enzimas implicadas en la síntesis de poliaminas, favoreciendo la acumulación de putrescina debido a una sobreexpresión de las enzimas de cabeza de ruta pero con una inhibición en la expresión de enzimas subsiguientes.

Por último, destacar el efecto inductor sobre genes implicados en la respuesta antioxidante propiamente dicha. La expresión de proteínas como citocromo P450 o glutatión sintasa están directamente relacionadas con una respuesta de defensa frente a ROS. Además, otras proteínas con función antioxidante se han visto inducidas en este experimento, cuyo efecto es ejercido a diferentes niveles desde el ADN, como a nivel de división celular, o incluso ejerciendo un papel regulador sobre el ADN.

Sin embargo, estos resultados muestran el efecto del tratamiento a 4°C sobre los diferentes genotipos de guisante, pero no discriminan entre el nivel de tolerancia de dichos genotipos. Es decir, que la regulación diferencial de los genes mencionados se debe al efecto de la temperatura. Para poder discernir cuáles son las diferencias, a nivel de transcripción, que confieren la tolerancia a heladas debido a un proceso de aclimatación debemos analizar los niveles de expresión comparando genotipos tolerantes y susceptibles.

Resultados de la evaluación por separado de genotipos susceptibles y genotipos tolerantes tras el experimento control y tras tratamiento de aclimatación

Se compararon las diferencias en niveles de expresión tras aclimatación de los genotipos tolerantes con los niveles de expresión alcanzados por los genotipos susceptibles. Dicho análisis tuvo en cuenta sólo aquellos sistemas de amplificación que mostraron diferencias en los niveles de expresión entre los experimentos control y aclimatación. Con respecto a los sistemas de amplificación que expresaron diferencias en relación al nivel de tolerancia del genotipo, tolerante a heladas o susceptible, los más destacados fueron un total de 33 genes que se listan en la siguiente tabla (Tabla IV.45):

Tabla IV.45. Sistemas de amplificación con expresión diferencial dependiente del grado de tolerancia a heladas de la línea de guisante evaluada

	Gen codificante / Proteína codificada	Número Accesión	Posible Función
<i>Ps_007</i>	Acorbato peroxidasa (APxI)	<i>X62077</i>	Antioxidante
<i>Ps_009</i>	Aleno óxido sintasa (aos)	<i>AB095985</i>	Activación genes defensa
<i>Ps_014</i>	AcetilCoA carboxilasa (accA)	<i>AB029556</i>	Metabolismo ácidos grasos
<i>Ps_017</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril coA	<i>AF303583</i>	Metabolismo esteroides. Regulación hormonal
<i>Ps_020</i>	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (acs1)	<i>AF016458</i>	Síntesis etileno
<i>Ps_024</i>	Proteína "MADS box" M2	<i>AY884287</i>	Factor de Transcripción
<i>Ps_033</i>	S-adenosilmetionina sintetasa 1 (sams1)	<i>AB087842</i>	Biosíntesis de poliaminas. Regulación hormonal
<i>Ps_041</i>	Fe- SOD 8	<i>AY426764</i>	Antioxidante
<i>Ps_064</i>	Proteína interruptor de ciclo celular (cc52a)	<i>DQ059036</i>	Proliferación y diferenciación celular. Procesos de endorreplicación
<i>Ps_066</i>	Chalcona isomerasa	<i>PSU03433</i>	Metabolismo flavonoides. Antioxidante
<i>Ps_071</i>	Convicilina (cvc)	<i>AJ276875</i>	Proteína de almacenamiento
<i>Ps_072</i>	Co-Z SOD	<i>AB189165</i>	Antioxidante
<i>Ps_075</i>	Cisteína proteasa	<i>Z68291</i>	Metabolismo catalítico proteínas
<i>Ps_078</i>	Nueva citocromo P450 monooxigenasa inducible por daño (cyp82)	<i>PSU29333</i>	Transporte de electrones y actividad monooxigenasa
<i>Ps_079</i>	"dead box" ARN helicasa	<i>AY167671</i>	Transporte ARNm. Desarrollo vegetal. Respuesta al estrés.
<i>Ps_081</i>	Dehidrina (dhn)	<i>X63061</i>	Proteína anticongelante
<i>Ps_085</i>	Precursor γ -glutamilcisteína sintetasa (gsh1)	<i>AF128455</i>	Metabolismo glutatión
<i>Ps_088</i>	Glucosa6-fosfato deshidrogenasa (g6pdh1)	<i>DQ811791</i>	Metabolismo energético (NADPH)
<i>Ps_089</i>	Fosfolípido Glutatión peroxidasa	<i>AJ000508</i>	Metabolismo glutatión. Inhibe peroxidación lipídica
<i>Ps_090</i>	Glutatión reductasa	<i>X98274</i>	Antioxidante
<i>Ps_101</i>	Leghemoglobina	<i>AB009844</i>	Captador oxígeno
<i>Ps_105</i>	Peroxirredoxina mitocondrial (prx)	<i>AJ717306</i>	Antioxidante
<i>Ps_106</i>	Fenilalanina amonio-liasa	<i>PEAPAL</i>	Metabolismo aminoácidos, N, etc
<i>Ps_108</i>	Fosfolipasa C	<i>Y15253</i>	Transducción de señales
<i>Ps_110</i>	Fitoeno desaturasa (pds)	<i>AJ621573</i>	Metabolismo carotenoides
<i>Ps_115</i>	Piruvato descarboxilasa	<i>Z66543</i>	Glicólisis. Ciclo Krebs
<i>Ps_117</i>	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (rubp)	<i>PEARUBP2</i>	Fijación CO ₂ . Metabolismo Energía
<i>Ps_122</i>	Proteína "stay-green" de cloroplasto inducible por senescencia	<i>AB303331</i>	Senescencia
<i>Ps_123</i>	Proteína quinasa relacionada con snf1 (snrk1)	<i>AJ971810</i>	Metabolismo ABA. Respuesta ambiental.
<i>Ps_128</i>	SOD	<i>AB087845</i>	Antioxidante
<i>Ps_129</i>	Factor de simbiosis (sym8)	<i>EF447277</i>	Nodulación
<i>Ps_131</i>	Inhibidor de tripsina (ti)	<i>AJ296169</i>	Inhibidor de proteasas

En este análisis, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante la primera comprobación, sistemas de amplificación afectados por el proceso de aclimatación, se observó que algunos de los sistemas afectados por el proceso de aclimatación presentaban diferencias claras sobre el grado de

diferenciación en la expresión al comparar los genotipos tolerantes con los susceptibles. Este es el caso concreto de sistemas como *Ps_028*, *Ps_053* o *Ps_094*, en los que la sobreexpresión alcanzó mayores niveles en las líneas tolerantes que en las susceptibles. En este caso hubo un doble efecto sumativo, los niveles de expresión de esos genes aumentan por el efecto del proceso de aclimatación, pero se incrementaron cuando la línea era tolerante a heladas.

Los 33 sistemas de amplificación listados en la Tabla IV.43 corresponden a genes que mostraron niveles diferentes de expresión entre genotipos. De este modo, los sistemas *Ps_064* y *Ps_101* mostraron sobreexpresión en los genotipos tolerantes, mientras que la sobreexpresión fue clara en los genotipos susceptibles para un total de 12 sistemas de amplificación: *Ps_009*, *Ps_014*, *Ps_024*, *Ps_071*, *Ps_078*, *Ps_081*, *Ps_088*, *Ps_089*, *Ps_105*, *Ps_108*, *Ps_115* y *Ps_117*. En cuanto a subexpresión, se detectó en todas las líneas susceptibles sólo para el sistema *Ps_075*, y para un total de 8 sistemas (*Ps_020*, *Ps_072*, *Ps_085*, *Ps_122*, *Ps_123*, *Ps_128*, *Ps_129* y *Ps_131*) en el caso de genotipos tolerantes. Un total de 9 sistemas de amplificación mostraron niveles opuestos de expresión diferencial entre genotipos tolerantes y susceptibles, y en este sentido el patrón se repitió para todos los sistemas: subexpresión en los genotipos tolerante frente a sobreexpresión en los genotipos susceptibles a heladas (Figura IV.48). Estos últimos sistemas fueron: *Ps_007*, *Ps_017*, *Ps_033*, *Ps_041*, *Ps_066*, *Ps_079*, *Ps_090*, *Ps_106* y *Ps_110*.

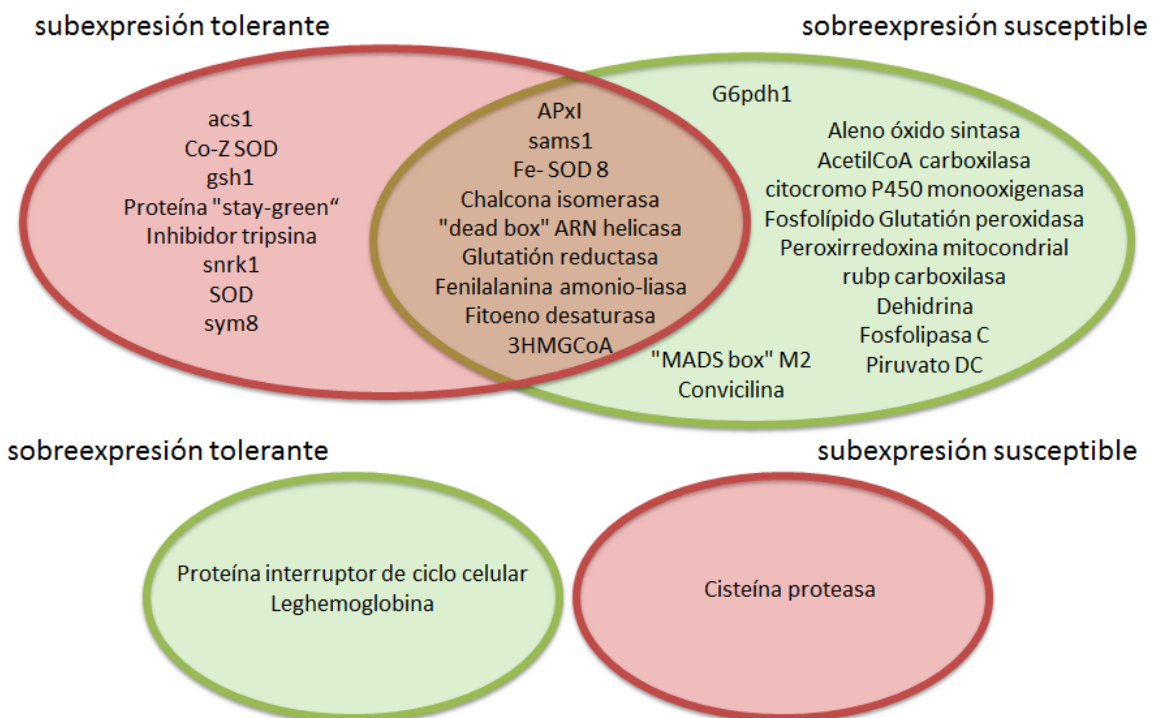


Figura IV.48. Distribución de los genes en función de la expresión diferencial mostrada tras aclimatación

En el análisis de la expresión diferencial durante la aclimatación debida al nivel de tolerancia de los genotipos, los resultados mostraron un total de 33 sistemas de amplificación con una marcada expresión diferencial.

La mayor parte de estos sistemas, un total de 21, mostraron sobreexpresión durante la aclimatación en los genotipos susceptibles a heladas. Entre ellos, destacan genes con un claro papel antioxidante como peroxirredoxina mitocondrial, citocromo P450 monooxigenasa, Fe-SOD, ascorbato peroxidasa, chalcona isomerasa o glutatión reductasa. También destacaron genes relacionados directamente con la respuesta al estrés; fosfolípido glutatión peroxidasa, aleno óxido sintasa, proteína MADS-box, convicilina, dehidrina, fosfolipasa o DEAD-box ARN helicasa y otros relacionados con el metabolismo fitohormonal: 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA (reductasa), S-adenosilmetionina sintetasa 1 o fitoeno desaturasa. Sin embargo, cabe destacar que, también se encontró sobreexpresión en otros genes, como glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, piruvato descarboxilasa o acetil CoA carboxilasa, con una mayor relación con el metabolismo primario.

En relación a los genes asociados al estrés oxidativo, el papel de la peroxirredoxina mitocondrial ante situaciones de estrés ha sido descrito en numerosas ocasiones (revisión en Dietz, 2003; Foyer y Noctor, 2009) tanto ante el propio estrés oxidativo (Hebbelmann *et al.*, 2012) como otros tipos de estrés: estrés salino (Ma *et al.*, 2012) o hídrico (Komatsu *et al.*, 2012). En guisante se ha demostrado la relación de la peroxirredoxina con la respuesta frente a estrés oxidativo (Iglesias-Baena *et al.*, 2010) así como frente a estrés salino (Martí *et al.*, 2011).

La enzima citocromo P450 monooxigenasa se ha relacionado con la respuesta ante el estrés biótico en guisante (Whitbred y Schuler, 2000). También en guisante se ha relacionado la respuesta ante estrés oxidativo por acumulación de cadmio con la sobreexpresión de Fe-SOD (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006), chalcona isomerasa (Ruiz-Lozano *et al.*, 1999) y glutatión reductasa (Dixit *et al.*, 2001). Del mismo modo, la sobreexpresión de ascorbato peroxidasa se ha relacionado con el estrés salino en guisante (Hernández *et al.*, 2000) o la sobreexpresión en guisante de chalcona isomerasa ante estrés biótico (Rivera-Becerril *et al.*, 2005).

Con respecto a la sobreexpresión de genes relacionados directamente con la respuesta al estrés, se ha vinculado dicha sobreexpresión en guisante para diferentes enzimas. En concreto, para la fosfolípido glutatión reductasa (Hernández *et al.*, 2000) en líneas tolerantes a estrés salino, para aleno óxido sintasa, enzima implicada en la síntesis de ácido jasmónico, relacionado con procesos de desarrollo y de respuesta a estrés (Yang *et al.*, 2011), para dehidrina frente a radiación UV (Liu *et al.*, 2002), fosfolipasa frente a estrés por calor (Liu *et al.*, 2006). Por último, se ha relacionado la sobreexpresión de DEAD-box helicasa en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, incluyendo bajas temperaturas (Vashisht y Tuteja, 2006).

La expresión del factor de transcripción MADS-box se ha relacionado con la floración (Taylor *et al.*, 2002) en guisante. Por otra parte, la sobreexpresión de convicilina no ha sido relacionada con ningún tipo de estrés, aunque sí se ha mostrado recientemente su vinculación con procesos tempranos de embriogénesis somática en garbanzo (Mishra *et al.*, 2012) y, previamente, se había observado una degradación más rápida que otras globulinas como vicilinas o leguminas durante la germinación en guisante (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008). Las convicilinas son proteínas de almacenamiento, presentes en todas las especies de la tribu Viciae, con la propiedad especial de contener una extensión N-terminal de aminoácidos hidrofílicos con una elevada proporción de residuos ácidos cargados, que le confiere propiedades de solidificación características (O'Kane *et al.*, 2004), y que es empleado para estudios filogenéticos (Sáenz de Miera, 1995; Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 1998; 2001; Sáenz de Miera *et al.*, 2008) pero de la que aún se desconocen otros papeles potenciales (Tompa, 2002).

Este trabajo ha detectado también la sobreexpresión, en los genotipos susceptibles tratados, de tres genes relacionados directamente con el metabolismo hormonal: 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA, S-adenosilmetionina sintetasa 1 y fitoeno desaturasa. La producción de 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA ha sido relacionada con la respuesta ante el estrés osmótico en *Brassica juncea* (Alex *et al.*, 2000). La regulación de la expresión de la enzima fitoeno desaturasa, relacionada con la biosíntesis de carotenoides, ha sido poco estudiada pero se ha vinculado su sobreexpresión a estrés hídrico en trigo (Aprile *et al.*, 2009). Se ha demostrado la sobreexpresión de S-adenosilmetionina sintetasa en *Vigna radiata* debida a estrés por heladas (Huang *et al.*, 2006). No obstante, con respecto a esta última enzima, S-adenosilmetionina sintetasa, se observó que los genotipos tolerantes mostraban regulación negativa sobre su expresión, al igual que se observó para la regulación del gen codificante para S-adenosilmetionina descarboxilasa (*Ps_119*) en todos los genotipos. Ambas enzimas están implicadas en el metabolismo de poliaminas y parece ser que hay diferencias en la regulación de este tipo de compuesto bajo condiciones de aclimatación, según el grado de tolerancia de los genotipos. Anteriormente se ha comentado la posible acumulación de putrescina en los genotipos tolerantes debida a la regulación diferencial de las enzimas S-adenosilmetionina descarboxilasa, reprimida por la aclimatación, y S-adenosilmetionina sintetasa, inducida en genotipos tolerantes.

Por último, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron sobreexpresión de enzimas relacionadas directamente con el metabolismo primario. La sobreexpresión de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, como parte del metabolismo de glucosa, se ha relacionado con la respuesta a temperaturas similares a las de aclimatación en colza (Maciejewska y Bogatek, 2002). En relación a guisante, se ha vinculado una regulación positiva de esta enzima con la respuesta al estrés por cadmio (Devi *et al.*, 2007) y frente al estrés hídrico (Gálvez *et al.*, 2005). La enzima piruvato descarboxilasa, clave en la gluconeogénesis e implicada en la regulación del ciclo de Krebs a nivel de Acetil CoA, presenta regulación positiva en condiciones de anaerobiosis (Minhas y Grover, 1999) y, en concreto, en guisante se ha detectado el aumento de la fermentación de ácido láctico en embriones (Rolletschek *et*

al., 2002a). Sin embargo, no se ha vinculado la regulación de esta enzima con la tolerancia a heladas ni otros tipos de estrés. Por último, la sobreexpresión de acetil CoA carboxilasa, enzima clave en la síntesis de ácidos grasos, ha sido relacionada con la respuesta ante el estrés hídrico en la leguminosa *Arachis hypogaea* (Kottapalli *et al.*, 2009).

Otros ocho sistemas de amplificación mostraron subexpresión en los genotipos tolerantes, relacionados en su mayor parte con la respuesta al estrés y la capacidad antioxidante con acción directa (precursor γ -glutamilcisteína sintetasa, SOD, inhibidor de tripsina). También se ha detectado la regulación negativa en los genotipos tolerantes de un gen implicado en la respuesta al estrés: proteína de coloroplasto *stay-green* inducible por senescencia, y otros relacionados con el metabolismo hormonal (1-aminociclopropano 1-carboxilato sintasa 1, proteína quinasa relacionada con *snf1*; SnrK1 y fenilalanina amonio liasa).

La reducción de los niveles de γ -glutamilcisteína sintetasa implica la acumulación de glutatión, oligopéptido con capacidad antioxidante e implicado en defensa, dentro de las células. La reducción en la expresión del precursor de γ -glutamilcisteína sintetasa ha sido vinculada en guisante al estrés por cadmio a nivel del sistema radicular (Rivera-Becerril *et al.*, 2005).

Con respecto a la subexpresión en los genotipos tolerantes sometidos a aclimatación de *Ps_131*, correspondiente a la secuencia génica codificante para un inhibidor de tripsina, podría vincularse a la regulación en la activación de proteínas. Por el contrario, en los resultados obtenidos para los genes implicados en el proceso de aclimatación, el sistema *Ps_030*, correspondiente a la secuencia codificante para un inhibidor de tripsina / quimiotripsina, mostró sobreexpresión tras aclimatación frente al control. Se ha comentado previamente que esta regulación positiva también ocurre durante el endurecimiento del trigo (Frolova *et al.*, 2011). Sin embargo, la escasa coincidencia en la cobertura y el alineamiento de ambas secuencias génicas, plantea la hipótesis de que se trate de dos genes que codifican para enzimas con diferente función. Pese a todo, la acumulación de este tipo de enzimas durante el tratamiento a 4°C señala la inducción de una respuesta frente al estrés. El hecho de que los genotipos tolerantes sobreexpresen una de las enzimas indicaría el comportamiento diferencial de los genotipos en función de su grado de tolerancia frente a heladas, es decir, la condición de 4°C no induce en los genotipos tolerantes unos niveles tan elevados de inhibidores de tripsina como los genotipos susceptibles.

Además hay que tener en cuenta, al hablar de inhibidores de tripsina, que por ejemplo su presencia es indeseada en líneas de guisante destinadas a producción de pienso animal (Domoney *et al.*, 1994; 1995), tal y como se ha comentado previamente al hacer referencia al QTL asociado a daño por heladas WFD5.1 ligado al *locus Tri* y descrito en Lejeune-Henaut *et al.* (2008). Por tanto, en relación a este tipo de actividad enzimática nuestros resultados muestran comportamientos diferentes asociados a

inhibidores de tripsina, que pese a mostrar la misma función, tanto su secuencia como su papel funcional difieren.

La enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato sintasa, ACS, es la precursora del etileno a través de la síntesis de 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC), asimismo se ha demostrado que la síntesis de etileno posee una retroalimentación negativa por acumulación de esta enzima ACC (Peck y Kende, 1998). Se han identificado varias variantes de esta enzima en diversas especies, siendo las más estudiadas, en el caso del guisante, Ps-ACS1 y Ps-ACS2. En este sentido, las variantes de esta enzima han mostrado un comportamiento diferencial en su expresión en otras leguminosas como es el caso del garbanzo (Gomez-Jimenez y Matilla, 2006). Se ha demostrado un comportamiento diferencial en guisante dependiendo del genotipo y el estado de desarrollo en el que se encuentre, en relación al grado de tolerancia, frente a la desecación en relación a la síntesis de etileno iniciada por esta enzima (Corbineau *et al.*, 2000). Basándonos en la teoría de que la adquisición de la tolerancia a la desecación en esta especie viene determinada por la acumulación de RFOs, estos autores vincularon, en tejidos susceptibles, el estrés por desecación a la incapacidad de convertir el sustrato de la enzima ACS en etileno, y al efecto de deterioro de la membrana celular debido a la producción de etano y la peroxidación lipídica. Sin embargo, los tejidos tolerantes inmaduros mostraron una acumulación de estaquiosa y rafinosa, superando a la concentración de sacarosa, vinculando esta acumulación a la función protectora de estos azúcares a nivel de la membrana celular. Tal y como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de aclimatación indujo la expresión de galactinol sintasa y estaquiosa sintasa, favoreciendo la síntesis y acumulación de estos RFOs, probablemente como respuesta al estrés por bajas temperaturas, al igual que en el caso de estrés por deshidratación.

Por otra parte, en los últimos años varias investigaciones se han focalizado en el estudio de la rizosfera asociada a guisante y la composición del suelo para mejorar el rendimiento de este cultivo. De este modo, se ha asociado la presencia de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-deaminasa, de origen bacteriano, con un aumento en el rendimiento del guisante (Zahir *et al.*, 2008; Belimov *et al.*, 2009; Vyas *et al.*, 2010). La función de esta ACC-deaminasa es desviar el sustrato de ACS evitando la formación de etileno. Por tanto, se podría relacionar la disminución de ACS con el aumento del rendimiento del cultivo de guisante y, por extensión, la subexpresión de la enzima ACS podría favorecer el rendimiento del cultivo al evitar, por un lado la síntesis de etileno, y por otro, la acumulación de etano que repercute en la viabilidad celular.

El gen *sym8* corresponde con un gen implicado en simbiosis entre guisante y organismos fijadores de nitrógeno (Albrecht *et al.*, 1998), independiente del estado fitohormonal (Pavlova *et al.*, 2000), pero determinante en la formación de los nódulos (Walker *et al.*, 2000). También se ha vinculado su actividad a la presencia de isoflavonoides como reguladores negativos de *sym8* (Novák *et al.*, 2004) y quitinasa (Ovtsyna *et al.*, 2005), esta última enzima relacionada con el papel defensivo de la planta

(Sharma *et al.*, 2011). Igualmente los isoflavonoides han sido relacionados con la respuesta a diferentes estreses (He *et al.*, 1998). La regulación de este gen en los genotipos tolerantes podría tener un efecto regulador en la capacidad de fijación de nitrógeno por la planta a través del control sobre la capacidad de simbiosis entre guisante y micorriza. Además, la regulación de este gen puede deberse a la presencia de isoflavonoides o quitinasa en la planta, que ejerzan un papel inhibitorio en la expresión de este gen.

El sistema de amplificación *Ps_128* se corresponde con un gen codificante para una superóxido dismutasa, SOD. Dentro de la gran variabilidad de SOD, este sistema de amplificación se corresponde con el gen codificante para Cu-Zn SOD en guisante (*AB189165*). Este tipo de enzimas está relacionado directamente con la capacidad antioxidante, igualmente, en guisante se ha vinculado su expresión con numerosos estreses abióticos, como la deficiencia en Zn (Pandey *et al.*, 2012) en la cual ha mostrado inhibición, ante exceso de Al (Panda y Matsumoto, 2010) en el cual hay un incremento inicial seguido de una inhibición tras 48 h. Por último, también se ha encontrado regulación negativa de Cu-Zn SOD en plantas de guisante mantenidas en presencia de cadmio (Sandalio *et al.*, 2001). Por tanto, la respuesta en el papel defensivo de esta SOD es dependiente del tipo de estrés e incluso del tiempo que dure dicho estrés. La regulación negativa de Cu-Zn SOD encontrada en este trabajo parece responder a dicho patrón dependiente de la duración del tratamiento. Sin embargo, la ausencia de alteración en los niveles de Cu-Zn SOD en los genotipos tolerantes encontrada sugiere nuevamente la ausencia de respuesta defensiva ante el tratamiento a 4°C, indicando que esta temperatura no resulta estresante a los genotipos tolerantes.

La actividad y función de la proteína de cloroplasto *stay-green* inducible por senescencia es poco conocida. No obstante, en los últimos años se han hecho avances en cuanto a su papel biológico en diferentes especies. El gen *stay-green* (*srg*), es un gen descrito por Mendel para el mantenimiento del cotiledón verde, que codifica para una proteína de cloroplasto (SRG), y es necesario para el inicio de la ruptura de la clorofila en los plástidos. SRG es inducida por senescencia se une al complejo II del fotosistema, interaccionando con dicho complejo e interrumpiendo su actividad (Sakuraba *et al.*, 2012). Asimismo, SRG está implicado en la expresión de numerosos genes involucrados en diversos procesos biológicos, entre otros, en el desarrollo de los nódulos y la senescencia (Zhou *et al.*, 2011). No obstante, en arroz se ha demostrado que la sobreexpresión de SRG conduce a la generación de singletes de oxígeno y otras ROS, generando un fenotipo de muerte celular localizada dependiente de clorofila en la hojas (Jiang *et al.*, 2011). Bajo las afirmaciones de este último trabajo, la subexpresión de la proteína de cloroplasto *stay-green* inducible por senescencia encontrada en nuestro estudio en los genotipos tolerantes, implicaría evitar la formación de dichas ROS desencadenando las reacciones típicas del estrés oxidativo.

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) está implicada en la biosíntesis de jasmonatos, así como en el metabolismo del nitrógeno y la ruta de los isoflavonoides. El gen codificante para PAL es considerado un gen relacionado con la patogénesis (Choi *et al.*, 2001). La expresión de este gen en guisante es regulada en respuesta a varios estímulos ambientales y durante las diferentes fases del desarrollo de la planta (Imura *et al.*, 2001). La actividad PAL posee un sistema de retroregulación en presencia de jasmonatos y derivados que actúan como inhibidores (Ishiga *et al.*, 2002), al igual que el fosfato inorgánico (Kawahara *et al.*, 2006) o el alcohol feniletílico (Mo y Sung, 2006). Sin embargo, las giberelinas actúan como fuertes activadores (Ohlsson y Berglund, 2001) y en el mismo sentido actúa el ácido β -amino butírico (Shailasree *et al.*, 2007; Barilli *et al.*, 2010).

A partir de la inducción de PAL, entre otras enzimas, se ha demostrado que la síntesis de isoflavonoides y derivados juega un papel central en la defensa inducida por *Rhizobium leguminosarum* en guisante frente a *O. crenata*. Como consecuencia, los productos derivados, compuestos fenólicos, acumulados en respuesta a dicha rizobacteria, confieren barreras químicas y mecánicas frente al parásito invasor (Mabrouk *et al.*, 2007). De modo similar, se ha vinculado un incremento en la actividad PAL con la respuesta defensiva frente a ascoquitosis (*Ascochyta pisi*) o al oídio (*Erysiphe poligoni*) en guisante (Sharma *et al.*, 2004). Con respecto al efecto de la temperatura en la regulación de la actividad PAL se ha relacionado el posible efecto inductor del ácido salicílico sobre PAL y la consecuente acumulación de fenoles, sugiriendo que el incremento en PAL permitiría alcanzar termotolerancia en uva (Wen *et al.*, 2008).

La ausencia de alteración en la expresión del gen codificante para PAL encontrada en los genotipos tolerantes sometidos a aclimatación indica la ausencia de respuesta ante cualquier estrés. Nuevamente, la ausencia de una sobreexpresión clara de este tipo de genes implicados en la respuesta defensiva, apoya la hipótesis de ausencia de estrés en los genotipos de guisante tolerantes a heladas bajo tratamiento a 4°C.

La enzima SnrK1 pertenece a la familia de las proteínas quinasas relacionadas con *sucrose non-fermenting-1* (*snf1*) y su papel, a diferencia del resto de subfamilias, es como regulador del metabolismo del carbono y niveles energéticos. Es la única subfamilia que no muestra dependencia clara de ácido abscísico (ABA) y calcio (Yang *et al.*, 2012). Esta enzima fosforila diversas enzimas, lo que provoca su inactivación, entre ellas, una enzima clave en el metabolismo del carbono; ADP-glucosa pirofosforilasa, que es regulada por SnRK1 a través de la modulación de su estado redox y su expresión génica. Las enzimas sacarosa fosfato sintasa (SPS: síntesis de sacarosa), α -amilasa (catabolismo glucógeno y almidón), 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa: biosíntesis esterol), nitrato reductasa (NR: asimilación de nitrógeno), tetralosa fosfato sintasa (TPS: tolerancia a la desecación, regulación) y 6-fosfofructo-2-kinasa/fuctosa-2,6-bifosfatasa (F2KP: regulación) son todas reguladas por SnRK1 a nivel de transcripción (Baena-González *et al.*, 2007;

Coello *et al.*, 2012). Además, un estudio en transcriptómica ha mostrado que SnRK1 está involucrada en la respuesta a concentraciones de glúcidos, oscuridad, y en un rango de estreses que limitan la fotosíntesis y la respiración, incluyendo herbicidas, y bajo condiciones de encharcamiento y/o hipoxia (Baena-González *et al.*, 2007). No obstante, también se ha demostrado que el ABA promueve la degradación de SnRK1 en trigo (Coello *et al.*, 2012). Los patrones de expresión de las diferentes subunidades catalíticas de SnRK1 muestran regulación positiva o negativa dependiendo del tiempo que se prolongue el estrés (Baena-González *et al.*, 2007; Coello *et al.*, 2012).

Los niveles de subexpresión detectados en los genotipos tolerantes sometidos a aclimatación indicarían un efecto sobre el metabolismo de glúcidos e incluso efectos en la arquitectura de la planta y una posible acumulación de antocianos (Baena-González *et al.*, 2007). No obstante, debido a que su expresión es dependiente del tiempo del ensayo, y que su efecto depende de la presencia de ABA y la ejecución de diversas cascadas metabólicas, su repercusión en la tolerancia frente a heladas expresada por cada genotipo no puede ser precisada en este trabajo.

En los resultados obtenidos en el análisis del efecto del tratamiento de aclimatación en guisante ya se comentó la vinculación de HMG-CoA reductasa con la respuesta ante el estrés osmótico en *Brassica juncea* (Alex *et al.*, 2000), pero también a la presencia de especies reactivas de oxígeno (Liang *et al.*, 2012). Además la inhibición de esta enzima reduce el número de nódulos en *M. truncatula* (Kevei *et al.*, 2007), induce a la senescencia temprana y reduce los niveles de esteroides (Suzuki *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha comentado la activación de esta enzima en presencia de SnRK1. Los genes que codifican a ambas enzimas han mostrado sobreexpresión en los genotipos susceptibles, mostrando que la temperatura de aclimatación ha resultado estresante para estos genotipos, de forma que han respondido a estas condiciones como ante otros estreses. Por el contrario, la subexpresión de ambas en genotipos tolerantes parece indicar que estas temperaturas no activan los mecanismos de respuesta frente al estrés en los genotipos tolerantes.

Tan sólo un gen ha mostrado menores niveles de transcripción en los genotipos susceptibles: cisteín proteasa (*Ps_075*). La proteína codificada se relaciona con el metabolismo catalítico de proteínas. Por el contrario, sólo dos genes han mostrado sobreexpresión en todos los genotipos tolerantes: leghemoglobina (*Ps_101*) y el gen codificante para una proteína interruptora del ciclo celular *ccs52A* (*Ps_064*).

Las cisteín proteasas son proteasas vinculadas con la senescencia (Kardailsky y Brewin, 1996), y muestra relación con los procesos de muerte celular programada (Vincent y Brewin, 2000) y en respuestas hipersensibles a estrés (D'Silva *et al.*, 1998; Belenghi *et al.*, 2004). Se ha demostrado que son inducidas bajo condiciones de estrés salino e hídrico (Jones y Mullet, 1995). Recientemente se ha relacionado la sobreexpresión de esta enzima con las fases tardías de infección por *Phytophthora pisi* en guisante (Hosseini *et al.*, 2012). Los genotipos tolerantes no han mostrado alteración de los niveles del

gen codificante para cisteín proteasas en este trabajo, lo que implicaría que la temperatura de 4°C en estos genotipos no afecta a su nivel de regulación.

La leghemoglobina es una proteína vinculada a la infección radicular por bacterias fijadoras de nitrógeno. Su actividad transportadora de oxígeno y nitrógeno le confiere su papel principal, extrayendo oxígeno de los nódulos de forma que se favorezca la anaerobiosis necesaria para que la nitrogenasa bacteriana fije el nitrógeno libre. De modo que se ha demostrado que la fijación de nitrógeno disminuye si la concentración de leghemoglobina se ve reducida. La reducción de leghemoglobina en guisante puede deberse a diversos factores, tales como la presencia de ABA (González *et al.*, 2001), condiciones limitantes de azufre (Scherer *et al.*, 2008) o bajo estrés salino (Bolaños *et al.*, 2006).

Se ha correlacionado positivamente la actividad de la sacarosa sintasa (SS) con la presencia de leghemoglobina (Gordon *et al.*, 1999). A pesar de la relación entre leghemoglobina y sacarosa sintasa, en soja se ha encontrado que bajo condiciones de enfriamiento (7-15°C) en oscuridad, hay un aumento de la actividad sacarosa sintasa pero no hay modificaciones en los niveles de transcripción de leghemoglobina, a pesar de que la fijación de nitrógeno sí se ve reducida (Van Heerden *et al.*, 2008). Con todo, los autores señalan que la respuesta en los niveles de leghemoglobina ante este tipo de estrés es dependiente de genotipo, de modo que el genotipo susceptible expresó menores niveles de transcripción de esta proteína durante el periodo enfriamiento.

En concreto, la sobreexpresión encontrada en los genotipos tolerantes aclimatados indicaría una potenciación de la fijación de nitrógeno por la planta, necesario para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, así como, una acción directa sobre el metabolismo glucídico vía sacarosa sintasa. La ausencia de alteración en los niveles de transcritos del gen codificante de esta proteína en los genotipos susceptibles confirma la respuesta dependiente de genotipo de la expresión de leghemoglobina ante situaciones de estrés indicada por los citados autores.

La proteína interruptora del ciclo celular CCS52A está relacionada con procesos de endorreuplicación y su sobreexpresión se asocia al estado de plántula y floración. En arroz su sobreexpresión se ha vinculado al mantenimiento de un tamaño normal de semilla al mediar la salida de la división mitótica para entrar en ciclos de endorreuplicación (Su'udi *et al.*, 2012). Asimismo, esta proteína CCS52A tiene un papel regulador en el mantenimiento de meristemas en raíz de *Arabidopsis* (Vanstraelen *et al.*, 2009) y en el fruto del tomate (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). La subexpresión del gen *ccs52A* en *Medicago truncatula* afecta drásticamente al desarrollo de nódulos, resultando en una menor ploidía, un tamaño celular reducido, una invasión reducida, y la maduración de células simbióticas, acompañada de una senescencia temprana y, finalmente, la muerte de ambos tipos celulares, bacteriano y vegetal (Vinardell *et al.*, 2003).

La sobreexpresión encontrada en nuestro trabajo del gen *ccs52A* en los genotipos tolerantes a heladas sometidos a aclimatación puede vincularse al mantenimiento de las estructuras meristemáticas y a una inhibición del proceso de endoreduplicación. En relación a la sobreexpresión de leghemoglobina, los resultados indican un refuerzo del sistema simbiótico de fijación de nitrógeno, favoreciendo en consecuencia la regulación positiva de enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos e, incluso, de glúcidos, como se ha señalado previamente vía interacción leghemoglobina y sacarosa sintasa.

Los resultados obtenidos, basándonos en las diferencias en la respuesta ante el periodo de aclimatación entre genotipos muestran como el mantenimiento de las plantas de guisante a bajas temperaturas ha tenido efectos en el sistema de regulación a nivel transcripcional mucho más notables en aquellos genotipos considerados como susceptibles. Los genotipos susceptibles han presentado regulación positiva en un número elevado de genes, al compararlo con los genotipos tolerantes. Esto sugiere que el tratamiento a 4°C afecta con mayor intensidad a los genotipos susceptibles, y produce una intensificación del sistema de regulación en la expresión de genes.

Se ha comprobado como el efecto de temperaturas de 4°C provocan en los genotipos susceptibles a heladas respuestas vinculadas a la defensa frente al estrés oxidativo, indicando la presencia de especies reactivas. El análisis global de todos los genes sobreexpresados en estos genotipos susceptibles ha permitido vincularlos a respuestas ante diversos estreses en diferentes plantas. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el tratamiento a 4°C, lejos de favorecer un proceso de aclimatación en los genotipos susceptibles de heladas en guisante somete a estos genotipos a una situación de estrés, desencadenando respuestas de defensa.

El reducido número de genes que han mostrado regulación positiva en los genotipos tolerantes, y su estrecha vinculación con la fijación de nitrógeno, limita la interpretación de los procesos que conllevan la adquisición de la tolerancia a heladas durante la aclimatación. En este sentido, el análisis realizado ha establecido una comparativa entre los niveles de tolerancia a heladas en los genotipos sometidos a tratamiento. Por tanto, no se han tenido en cuenta los niveles de expresión basales expresados por los diferentes genotipos, entendiendo estos niveles basales como los niveles de expresión detectados bajo las condiciones control, es decir, sin tratamiento.

Sin embargo, estos resultados obtenidos mediante la comparación de los diferentes genotipos en función de su grado de tolerancia no permiten determinar qué genes pueden resultar claves a la hora de alcanzar la tolerancia a heladas durante el proceso de aclimatación.

3.5. Análisis conjunto de la expresión diferencial mostrada por las seis líneas evaluadas

No obstante, no todos los sistemas de amplificación específicos de genotipos según el nivel de tolerancia parecen involucrados directamente con el proceso de aclimatación. Centrando como objetivo extraer los genes implicados en conferir tolerancia a heladas a partir del proceso de aclimatación había que diferenciar aquellos sistemas de amplificación que mostraran niveles de expresión diferentes tras el proceso de aclimatación, pero que además se repitieran dichos patrones de expresión en otros genotipos con similar nivel de tolerancia a heladas. Para obtener dichos genes, realizamos la tercera y última comprobación: (3) el análisis conjunto de la expresión diferencial mostrada por las seis líneas evaluadas.

Se comprobó el comportamiento para los diferentes sistemas de amplificación entre los diferentes genotipos susceptibles sometidos a aclimatación frente a los genotipos tolerantes aclimatados (Tabla IV.46). Posteriormente, se compararon con los niveles obtenidos en las muestras control. A partir de dicho análisis se extrajeron un total 27 sistemas de amplificación con expresión diferencial debida a nivel de tolerancia del genotipo.

Tras evaluar el experimento control frente al experimento de aclimatación, se encontró un primer grupo de sistemas de amplificación que mostraron sobreexpresión en los genotipos susceptibles frente a niveles de subexpresión detectados en los genotipos tolerantes. Los sistemas de amplificación dentro de este grupo: *Ps_007*, *Ps_017*, *Ps_033*, *Ps_041*, *Ps_066*, *Ps_078*, *Ps_079*, *Ps_090*, *Ps_110* y *Ps_131*, se corresponden con diferentes funciones celulares. Destacó el aumento en la transcripción de genes relacionados con la función antioxidante y protectora frente a daño oxidativo, al igual que hay presencia de genes relacionados con la regulación hormonal.

Del total de sistemas de amplificación evaluados, 4 sistemas de ellos (*Ps_020*, *Ps_085*, *Ps_123* y *Ps_128*) mostraron niveles de expresión inferiores tras aclimatación en los genotipos tolerantes. Todos ellos relacionados con genes y/o funciones inducidas por estrés.

Los sistemas de amplificación *Ps_009*, *Ps_044*, *Ps_071* y *Ps_064* alcanzaron niveles superiores tras aclimatación tan sólo en los genotipos susceptibles. Los genes correspondientes a estos sistemas de amplificación codifican para proteínas relacionadas con respuesta a diferentes tipos de estrés.

Por último, se obtuvo un grupo de sistemas de amplificación (*Ps_019*, *Ps_022*, *Ps_023*, *Ps_030*, *Ps_038*, *Ps_094*, *Ps_113* y *Ps_126*) los cuales mostraron en los genotipos tolerantes niveles de sobreexpresión al comparar el experimento de aclimatación frente al control. De nuevo corresponden con genes codificantes para proteínas con función vinculada a respuesta ante el estrés. No obstante conforman un grupo similar de genes al primero en el que destaca el metabolismo proteico.

Tabla IV.46. Sistemas de amplificación con expresión diferencial según nivel de tolerancia

	Gen codificante/ Proteína codificada	Número Accesión	Posible Función
Sobreexpresión en genotipos susceptibles subexpresión en genotipos tolerantes	<i>Ps_007</i>	Acorbato peroxidasa (APxI) <i>X62077</i>	Antioxidante
	<i>Ps_017</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril coA reductasa <i>AF303583</i>	Metabolismo esteroides. Regulación hormonal
	<i>Ps_033</i>	S-adenosilmetionina sintetasa 1 (<i>sams1</i>) <i>AB087842</i>	Biosíntesis de poliaminas. Regulación hormonal
	<i>Ps_041</i>	Fe- SOD 8 <i>AY426764</i>	Antioxidante
	<i>Ps_066</i>	Chalcona isomerasa <i>PSU03433</i>	Metabolismo flavonoides. Antioxidante
	<i>Ps_078</i>	Nueva citocromo P450 monooxigenasa inducible por daño (<i>cyp82</i>) <i>PSU29333</i>	Transporte de electrones y actividad monooxigenasa
	<i>Ps_079</i>	"DEAD box" ARN helicasa <i>AY167671</i>	Transporte ARNm. Desarrollo vegetal. Respuesta al estrés.
	<i>Ps_090</i>	Glutación reductasa <i>X98274</i>	Antioxidante
	<i>Ps_110</i>	Fitoeno desaturasa (<i>pds</i>) <i>AJ621573</i>	Metabolismo carotenoides
	<i>Ps_131</i>	Inhibidor de tripsina (<i>ti</i>) <i>AJ296169</i>	Inhibidor de proteasas
subexpresión en genotipos tolerantes	<i>Ps_020</i>	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (<i>acs1</i>) <i>AF016458</i>	Síntesis etileno
	<i>Ps_085</i>	Precursor γ -glutamilcisteína sintetasa (<i>gsh1</i>) <i>AF128455</i>	Metabolismo glutación
	<i>Ps_123</i>	Proteína quinasa relacionada con <i>snf1</i> (<i>snrk1</i>) <i>AJ971810</i>	Metabolismo ABA. Respuesta ambiental.
	<i>Ps_128</i>	SOD <i>AB087845</i>	Antioxidante
Sobreexpresión en genotipos susceptibles	<i>Ps_009</i>	Aleno óxido sintasa (<i>aos</i>) <i>AB095985</i>	
	<i>Ps_044</i>	Galactinol sintasa <i>AJ243815</i>	Síntesis de rafinosa y otros azúcares
	<i>Ps_071</i>	Convicilina (<i>cvc</i>) <i>AJ276875</i>	Proteína de almacenamiento
	<i>Ps_064</i>	Proteína interruptor de ciclo celular (<i>cc52a</i>) <i>DQ059036</i>	Proliferación y diferenciación celular. Procesos de endorreproducción
Sobreexpresión en genotipos tolerantes	<i>Ps_019</i>	1-aminociclopropano-1-carboxilato-sintasa 2 (<i>acs2</i>) <i>AF016459</i>	Síntesis etileno
	<i>Ps_022</i>	Proteína P54 <i>Y11207</i>	Proteína de almacenamiento
	<i>Ps_023</i>	Factor de transcripción "MADS box" <i>AJ223318</i>	Factor de Transcripción
	<i>Ps_030</i>	Inhibidor de tripsina <i>AJ414576</i>	Inhibidor de proteasas
	<i>Ps_038</i>	Lipooxigenasa LoxN <i>AF098270</i>	Peroxidación lipídica. Transporte lipídico
	<i>Ps_094</i>	Proteína de choque térmico <i>AY167669</i>	Plegamiento proteínas. Respuesta estrés
	<i>Ps_113</i>	Proteína rica en prolina <i>AJ233399</i>	Proteína de almacenamiento. Pared celular
	<i>Ps_126</i>	Estaquiosa sintasa <i>AJ311087</i>	Metabolismo oligosacáridos

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión diferencial asociada a aclimatación han demostrado la complejidad en la regulación del metabolismo a nivel de ARN causado por el tratamiento a 4°C. Los análisis comparativos han mostrado que esta complejidad se debe a factores como la propia temperatura o el genotipo individual, pero que también han mostrado relación con el grado de tolerancia a heladas mostrado por las diferentes variedades de guisante.

Asimismo, los resultados han revelado el importante papel de la expresión de determinados genes durante el proceso de aclimatación. Este papel no sólo se ha limitado a variaciones en la expresión de dichos genes en las líneas tolerantes a heladas, sino que el tratamiento a 4°C también ha producido cambios en los niveles de expresión de determinados genes en las variedades más sensibles estrés por heladas. Además, los cambios producidos en la expresión no sólo se han traducido en una sobreexpresión de los mismos, sino que se ha mostrado la presencia de efecto represivo sobre algunos de estos genes afectados por la aclimatación.

Más allá de un simple efecto de sobreexpresión o represión en la expresión de genes durante la aclimatación, presumiblemente relacionados con la tolerancia a heladas, se han encontrado diversos patrones de expresión, incluyendo efectos sumativos o represivos dependiendo de factores como el grado de tolerancia o el genotipo individual.

El análisis combinado de los niveles de expresión diferencial debido al nivel de tolerancia en relación a la aclimatación permitió extraer aquellos sistemas de amplificación determinantes en el proceso de aclimatación.

Este análisis conjunto apoya la hipótesis de que el tratamiento a bajas temperaturas provoca un cambio en la regulación de la transcripción de genes mucho más generalizado en aquellos genotipos que se comportan como susceptibles ante el estrés por heladas. De tal forma que, de los 26 sistemas de amplificación con expresión diferencial debida a la interacción aclimatación x nivel de tolerancia, cerca del 70% son genes que muestran sobreexpresión en los genotipos susceptibles o bien, subexpresión en los genotipos tolerantes. La regulación positiva a la que se han visto sometidos los genotipos susceptibles durante el tratamiento a 4°C ha afectado a genes principalmente de carácter antioxidante (SOD, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, etc.) y con función fundamentalmente defensiva ("DEAD box" ARN helicasa, aleno oxidasa, proteína interruptora de ciclo celular, etc.).

Tan sólo 4 sistemas de amplificación tuvieron regulación negativa en los genotipos tolerantes: 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa 1, precursor γ -glutamilcisteína sintetasa, proteína quinasa relacionada con *snf1* y SOD. Los cuatro genes están relacionados directamente con la respuesta ante situaciones de estrés, por lo que su reducción en los niveles de transcripción parece indicar que dichos genotipos no interpretan el proceso de aclimatación como una situación de estrés sobre la que haya que activar la transcripción de forma generalizada de genes de reparación y defensa.

Durante el tratamiento de aclimatación, los genotipos tolerantes mostraron regulación positiva a nivel de transcripción de un total de ocho genes. Los genes candidatos como genes que confieren la tolerancia a heladas obtenidos en este trabajo corresponden a genes que codifican para las proteínas: 1-aminociclopropano-1-carboxilato-sintasa 2 (ACS2), proteína P54, factor de transcripción "MADS

box", inhibidor de tripsina, lipooxigenasa LoxN, proteína de choque térmico, proteína rica en prolina y estaquiosa sintasa.

Tal y como se ha mencionado previamente, todos los genes candidatos como genes que confieren la tolerancia a heladas obtenidos en este trabajo se relacionan con una regulación del metabolismo dirigida a un proceso de aclimatación. En este sentido, la respuesta de este tipo de genotipos tolerantes difiere de la respuesta de defensa ante un estrés. Esta respuesta diferencial se ve reforzada al comprobar el carácter defensivo de los genes sometidos a regulación positiva en los genotipos susceptibles.

Estos ocho genes son los únicos que se sobreexpresan en los tres genotipos tolerantes en relación al proceso de aclimatación, y por tanto son genes de interés para su estudio en cuanto al papel que desarrollan en el proceso de aclimatación que les permite adquirir la tolerancia ante heladas. La función principal en relación a condiciones de estrés de cada uno de ellos ha sido comentada previamente.

Los genes sobreexpresados en los genotipos susceptibles a heladas engloban a genes codificantes para proteínas cuyo rol principal es la respuesta directa ante el estrés. La transcripción de genes para proteínas con capacidad antioxidante fundamentalmente se expresan en presencia de ROS, lo que podría indicar que las accesiones susceptibles evaluadas responden al tratamiento a 4°C como una situación de estrés oxidativo.

En resumen, el análisis de la expresión diferencial tras aclimatación realizado sobre dos genotipos, uno tolerante y otro susceptible, ha permitido encontrar genes cuyo patrón de transcripción variaba en el proceso de aclimatación. En cambio no ha permitido diferenciar o asegurar su papel a la hora de conferir tolerancia ante heladas en las líneas de guisante, así como podía incluir variaciones debidas a características intraespecíficas de la línea evaluada.

El mismo análisis realizado sobre varios genotipos, tres tolerantes y tres susceptibles, permitió eliminar las variaciones individuales y observar el comportamiento en los niveles de transcripción de los genes en cuanto a la aclimatación y en cuanto al grado de tolerancia de los genotipos. La evaluación de los cambios de expresión entre las condiciones control y aclimatación en los seis genotipos ha permitido describir el papel de varios genes afectados por el proceso de aclimatación *per se*.

Este análisis conjunto ha permitido discriminar aquellos genes cuya regulación a nivel de transcripción se veían afectados durante el proceso de aclimatación de forma diferencial en cuanto a la tolerancia/susceptibilidad de las líneas de guisante.

Tras evaluar los resultados obtenidos, se plantea la hipótesis de la importancia, no sólo de encontrar los genes responsables de conferir tolerancia a los genotipos tolerante a heladas, del elevado número de genes que presentan regulación positiva en los genotipos susceptibles, pudiendo ser ellos partícipes del

efecto de susceptibilidad de dichas variedades. De modo que se sugiere que igual de importante en la tolerancia a heladas en guisante pueda ser la expresión de determinados genes en las variedades tolerantes como la sobreexpresión de los genes en las líneas susceptibles.

4. Resultados globales y discusión final

A lo largo de este trabajo, los resultados obtenidos dentro de cada etapa del programa de mejora han ido marcando la necesidad de evaluaciones conjuntas e interrelacionadas de todos los análisis, para así esclarecer las pautas a seguir dentro del programa de mejora de guisante en relación a la tolerancia a heladas.

Sin embargo, los resultados muestran la necesidad de replantear la secuencia de etapas a la hora de alcanzar el objetivo de obtener variedades de guisante con dureza invernal que muestren rendimientos que resulten competitivos en el mercado, así como caracteres vinculados a calidad y factores agronómicos demandados por el consumidor.

En este sentido, este trabajo apoya la hipótesis del proceso de aclimatación como una fase necesaria para que los genotipos de guisante tolerantes a heladas adquieran el grado necesario de dureza invernal. Durante el tratamiento a 4°C todas las accesiones de guisante analizadas mostraron cambios en la expresión de un total de 23 genes, independientemente del genotipo. Del total de estos 23 genes, 13 genes mostraron sobreexpresión en su regulación de forma independiente del genotipo y tan sólo 1, *samdc*, mostró regulación negativa. Entre los 13 genes que mostraron sobreexpresión, destacaron los genes implicados en el metabolismo proteico (albúmina, inhibidor de tripsina, arginina descarboxilasa, proteínas de choque térmico, proteína rica en prolina o vicilina) pero también en relación con el metabolismo glicídico (galactinol sintasa, estaquitosa sintasa, proteína transportadora de sacarosa) y con la regulación hormonal (*acs2*, *PsIPT2*, *Ga 20 oxidasa*). No obstante, también se sobreexpresaron genes reguladores de la transcripción (*MADS Box*, citosina-5-ADN metiltransferasa, *KNOX* clase 1) y otros en respuesta directa al estrés (*apirasa*, *lopoxygenasa LoxN*, citocromo P450, *adh*, *gshs*, antígeno de proliferación celular). Los 9 sistemas de amplificación restantes han mostrado inducción durante el tratamiento a 4°C, aunque sus niveles de sobreexpresión variaban dependiendo del genotipo.

No obstante, los resultados han mostrado claras diferencias en el comportamiento ante el tratamiento a 4°C entre las líneas de guisante consideradas como susceptibles y las líneas consideradas tolerantes.

En concreto, se ha observado un mayor efecto en los niveles de expresión de distintos genes en los genotipos susceptibles, estando dichos efectos vinculados con la sobreexpresión de genes directamente

relacionados con la respuesta defensiva y ante el estrés oxidativo. Por otro lado, las líneas tolerantes han presentado regulación negativa en un gran número de genes, mientras que sólo unos genes muy concretos han mostrado sobreexpresión bajo condiciones de aclimatación.

Los genes cuya expresión se ha asociado al proceso de aclimatación, pueden ser analizados desde el punto de vista de los resultados obtenidos en el análisis de QTL asociados a caracteres de interés agronómico y a la tolerancia a heladas *per se*. En este sentido, cabe destacar el hecho de que el gen codificante para la proteína P54 ha mostrado ser inducible bajo condiciones de aclimatación en los genotipos tolerantes a heladas. Asimismo, se corresponde con un GTM, *P54*, ligado al grupo de ligamiento LGII durante los análisis de mapeo. En la región en la que se sitúa dicho *locus* se han detectado numerosos QTL, asociados no sólo a caracteres de interés agronómico como el porcentaje de nascencias o el número total de semillas, sino también caracteres asociados a tolerancia a heladas, como el daño general en el rango evaluado entre -9°C y -15°C o el daño en hojas evaluado a -15°C. Además, en la misma región se ha situado un QTL asociado al inicio de floración, siendo dicho carácter clave en la tolerancia a la dureza invernal tal y como exponen Lejeune-Henaut *et al.* (2008).

La sobreexpresión de un inhibidor de tripsina detectada en los genotipos tolerantes durante la aclimatación puede ser relacionado con el QTL WFD5.1, asociado a la tolerancia a la dureza invernal (Lejeune-Henaut *et al.*, 2008). En este sentido, ya se ha mencionado previamente que este QTL ha sido vinculado por los autores al *locus Tri*, codificante para un inhibidor de tripsina. En este caso, esta asociación parece indeseable, ya que la expresión de este gen implicaría un cambio en la composición proteica de las semillas. La selección de líneas tolerantes en base a este QTL concreto mediante MAS podría implicar la coselección de este gen, lo que provocaría una reducción de la calidad de la semilla de guisante proteaginoso, no resultando óptima para su empleo en la alimentación de animales.

Otro de los genes cuya expresión ha mostrado relación con la dureza invernal ha sido el gen codificante para ACS1, el cual ha mostrado una clara inhibición en los genotipos tolerantes durante la aclimatación. El sistema de amplificación obtenido para este gen fue diseñado a partir del número de accesión AF016458, que corresponde además con uno de los SSR mapeados en nuestro trabajo y localizado en LGI, próximo al marcador morfológico *Af*. A través de *Af*, como marcador puente, se puede determinar que en la misma región en que se sitúa este gen se localizan QTL asociados a heladas: el daño en hojas mostrado a -15°C o el porcentaje de supervivencia. Además, este gen se corresponde con un GTM definido por Aubert *et al.* (2006) como *ACs1* y que puede ser empleado para la aplicación de técnicas basadas en MAS.

En relación a la ausencia de alteración en la expresión en genotipos tolerantes, el gen codificante para SnRK1 ha mostrado inhibición en su expresión durante la aclimatación. En esta líneas, Deulvot *et al.* (2010) localizaron un SNP, *Snrk1*, en base a este gen en el grupo de ligamiento LGVI. A través de marcadores puente como *Ga2ox* (Aubert *et al.*, 2006) y *AD59* (Loridon *et al.*, 2005) se ha podido

situar dicho SNP en relación a los mapas obtenidos en este trabajo, y en dicha región se han solapado QTL asociados a diferentes caracteres de importancia agronómica como el número total de semillas o el peso total de semilla, además de otros caracteres asociados a la dureza invernal como el porcentaje de nascencias y la fecha de floración. En este sentido, se ha discutido anteriormente el papel de esta enzima a nivel del metabolismo glucídico, así como a nivel regulador sobre diversas enzimas y su relación con el control de la fecha de floración, lo cual sugiere su implicación directa con la tolerancia a heladas en guisante.

Por último, los genes que codifican para galactinol sintasa y para estaquitosa sintasa han mostrado regulación opuesta en los genotipos tolerantes durante el proceso de aclimatación. El primero ha mostrado inhibición mientras que el segundo ha mostrado inducción en su transcripción. Ambos genes están involucrados en el metabolismo glucídico y, más en concreto, con la formación de RFOs. Además ambos se localizan próximos, cerca de 1 cM, entre sí dentro del grupo de ligamiento LGV según los SPNs *GAL* y *Sts1* descritos por Deulvot *et al.* (2010). Nuestros resultados demuestran una regulación independiente de ambos genes. No obstante, debido a la proximidad de los *loci* disponibles, en este caso la aplicación de MAS puede dificultar la obtención de genotipos claramente tolerantes sin la utilización de herramientas más precisas que permitan determinar la expresión diferencial de ambos genes. Esta expresión parece estar involucrada en el proceso de aclimatación necesario para alcanzar la tolerancia a la dureza invernal.

A la hora de seleccionar genotipos que aúnen las características agronómicas y de calidad deseadas, junto con un grado de tolerancia a la dureza invernal que permita alcanzar rendimientos competitivos, no sólo se pueden aplicar técnicas basadas en MAS. Ya que, tal y como se ha demostrado en este trabajo, dicha selección basada en marcadores puede determinar la selección conjunta de otros marcadores no deseables. En este sentido, el conocimiento de los genes implicados tanto en la tolerancia a la dureza invernal como los implicados en la obtención de semilla de guisante de calidad y con un rendimiento competitivo se hace imprescindible. En la labor de selección de genotipos adaptados a diferentes estreses, la información de los genes implicados en dicha adaptación y su repercusión final en el metabolismo de la planta resultan necesarios. En este sentido, el empleo de marcadores GTM no sólo permite la selección mediante MAS, sino que además permite determinar qué genes se están seleccionando y predecir el comportamiento de cada genotipo obtenido mediante su selección. Asimismo, los GTM han demostrado presentar un grado de variabilidad óptima dentro de la especie *Pisum sativum*, lo que indica la presencia de diferentes variantes alélicas dentro del mismo taxón, que pueden ser analizadas y seleccionadas para la obtención de genotipos mejorados y adaptados a las necesidades.

Los genes implicados en el proceso de aclimatación han mostrado relación con los QTL asociados a rasgos de interés agronómico en guisante así como en QTL asociados a la dureza invernal en global así

como a las heladas *per se*. Se ha demostrado la relación de dichos genes, no sólo con la dureza invernal sino su implicación en diferentes etapas del metabolismo vegetal, afectando a otros caracteres como son el contenido proteico y glucídico, y afectando a la calidad de la semilla. La variabilidad presentada por los marcadores basados en genes permite no sólo localizar en el mapa genético los genes implicados en la dureza invernal, sino determinar la coselección de otros genes y analizar el efecto de las diferentes variantes alélicas para cada uno de los marcadores.

Capítulo V. Conclusiones

1: Exploración del fondo genético de una colección de germoplasma de trabajo representativa del género *Pisum*.

I.1: Estudiar la variabilidad genética englobada en la colección e influencia en su jerarquización y estructura de factores relacionados con la clasificación taxonómica, el origen geográfico y evolutivo, el tipo o estatus de las accesiones y la distribución de algunos caracteres morfológicos.

1. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis del género *Pisum* compuesto por tres especies: *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. sativum*., situándose *P. arvense*, *P. elatius* y *P. humile* entre ellas y postulándose posibles nexos comunes en el proceso evolutivo.
2. *P. sativum* y *P. elatius* han resultado los taxones que aportan una mayor variabilidad interna dentro de la colección estudiada, mientras que *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. humile* se han mostrado más homogéneos genéticamente y con presencia característica de varios alelos en cada uno de ellos, aunque sin implicar en ningún caso la exclusividad de los mismos.
3. En la estructura subyacente dentro del taxón *P. sativum* destaca la influencia del tipo o el estatus de las accesiones, discriminándose en general las variedades locales, las accesiones consideradas silvestres y un grupo compacto formado por materiales cultivados, cultivares y variedades comerciales, con una aportación relativamente baja de este último a la variabilidad detectada en la colección.
4. Se ha detectado la expresión de algunos caracteres morfológicos como relacionada con la estructura genética de la colección, destacando al respecto la distribución en la colección del color de la flor, mientras que el origen geográfico, si bien parece tener cierta influencia, no ha resultado un criterio adecuado cuando se considera en bruto la variación en función del continente de origen

I.2: Indagar en la información particular y conjunta aportada por distintos tipos de marcadores moleculares en el estudio de variabilidad e influencia en la detección de su estructura.

5. La detección de criterios influyentes en la estructura interna de la colección ha sido dependiente del tipo de marcador utilizado, destacando los marcadores RBIP en cuanto a la discriminación entre taxones, mientras que los marcadores de tipo GTM han contribuido a encontrar relaciones

en base al tipo o estatus de las accesiones y los SSR han facilitado el detectar la posible influencia en la estructura de criterios relacionados con el origen geográfico.

2: Estudios preliminares relacionados con el mapeo genético necesarios para aplicación futura de marcadores moleculares como apoyo en selección asistida.

2.1: Obtener mapas de ligamiento parciales en tres poblaciones de trabajo segregantes para caracteres agronómicos de interés y elaboración de un mapa compuesto a partir de ellos.

6. Se han obtenido tres mapas de ligamiento parciales en base al análisis sobre tres poblaciones segregantes diferentes, con 59, 47 y 64 marcadores anclados y tamaños estimados de 1187,9 cM, 1379 cM y 1385 cM respectivamente.
7. Se ha construido un mapa compuesto como combinación de los tres mapas anteriores, con un total de 139 marcadores, 95 de tipo SSR, 9 RBIP, 13 CAP, 10 STS, 5 Size, 2 ASP y 5 morfológicos, distribuidos en 7 grupos de ligamiento y una cobertura casi total del genoma de guisante previamente mapeado en estudios anteriores.
8. Se han anclado por primera vez un total de 21 marcadores moleculares, 10 SSR, 9 RBIP, 1 CAP y 1 STS, habiéndose confirmado la posición de otros 29 que, o bien mostraban distorsión en su segregación, o bien existían discrepancias en su localización en mapas previos.

2.2: Detectar y mapear QTL relacionados con caracteres agronómicos de interés: rendimiento y algunas de sus componentes; fenología; tolerancia a heladas; morfología.

9. Se han detectado tanto QTL asociados a la precocidad en floración como asociados a tolerancia a heladas y a dureza invernal, co-localizados con QTL relativos a rendimiento y productividad del cultivo, existiendo asimismo una relación entre los QTL asociados al porcentaje de supervivencia tras heladas evaluados en cámara de ambiente controlado con los asociados a daños por dureza invernal evaluada en campo.
10. Se ha observado relación entre la posición de QTL relativos al daño producido por heladas *con loci* relacionados con el metabolismo proteico y glucídico a través de varios marcadores GTM.
11. La distribución de los QTL asociados al daño producido por heladas y su importancia ha sido dependiente de la intensidad de heladas utilizada para el fenotipado.

3. Determinación, mediante estudio de la expresión génica, de genes candidatos relacionados con procesos de aclimatación y tolerancia a helada.

3.1: Analizar la expresión diferencial a bajas temperaturas de genes previamente publicados potencialmente involucrados con procesos de adaptación y endurecimiento.

12. Un total de 14 genes han mostrado variación en su expresión durante el tratamiento a 4°C, la mayoría implicados en el metabolismo de proteínas y glúcidos, si bien también aparecen genes involucrados en el metabolismo fitohormonal, así como genes codificantes para enzimas y factores de transcripción.

3.2: Vincular la regulación observada con posibles diferenciales de tolerancia a heladas, determinando el efecto regulador de la temperatura de aclimatación en los niveles de expresión sobre los diferentes genotipos.

13. La regulación mostrada por los genotipos tolerantes bajo condiciones de 4°C ha implicado genes relacionados con el metabolismo proteico y glucídico, así como genes implicados en la fijación de nitrógeno, mientras que los genotipos susceptibles han mostrado sobreexpresión de genes relacionados con respuestas de defensa ante situaciones de estrés.

3.3: Relacionar los genes candidatos con los QTL asociados a la tolerancia a heladas y otros caracteres agronómicos de interés, y con marcadores moleculares mapeados que puedan ser susceptibles de ser empleados en selección asistida

14. Se han relacionado los genes que han mostrado expresión diferencial en los genotipos tolerantes con QTL asociados a la tolerancia a la dureza invernal y a caracteres fenológicos, así como de rendimiento mediante marcadores GTM localizados en regiones concretas del mapa de ligamiento de guisante.

Capítulo VI. Referencias Bibliográficas

- Abbate,V., Cavallaro,V., Crinò,P., and Ranalli,P. 1997. Winter varieties of grain legumes in Italy. In: AEP (ed.). Problems and prospects for winter sowing of grain legumes in Europe. 3-4 December 1996. Dijon, France. 19-26.
- Al-Whaibi,M.H. 2011. Plant heat-shock proteins: A mini review Journal of King Saud University - Science 23(2):139-150.
- Alam,I., Lee,D.G., Kim,K.H., Park,C.H., Sharmin,S., Lee,H., Oh,K.W., Yun,B.W., and Lee,B.H. 2010. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. Journal of Biosciences 35:49-62.
- Albrecht,C., Geurts,R., Lapeyrie F., and Bisseling,T. 1998. Endomycorrhizae and rhizobial nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes PsENOD5 and PsENOD12A. Plant Journal 15(5):605-614
- Allard,R.W. 1960. Principles of Plant Breeding. John Wiley and Sons.
- Allard,R.W. 1999. History of plant population genetics. Annual Review of Genetics 33:1-27.
- Allendorf,F.W., Hohenlohe,P.A., and Luikart,G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. Nature Reviews Genetics 11:697–709.
- Alex,D., Bach,T.J., and Chye,M.-L. 2000. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive. Plant Journal 22(5):415-426.
- Ali,M., and Kumar,S. 2005: Advances in Pigeon Pea Research. Indian Institute of Pulses Research, Kanpur, India, p. 356.
- Ali,M., Kumar,S., and Singh,N.B. 2003: Chickpea Research in India, 1st edn. Indian Institute of Pulses Research, Kanpur, India.
- Andersen,R.L. and Markarian,D. 1968. The inheritance of winterhardiness in *Pisum* III. Stem branching in Autumn growth. Euphytica 17:473-478.
- Andersen,J.R. and Lubberstedt,T. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science 8(11):554-560.
- Andrews,M., Lea,P.J., Raven,J.A., and Lindsey,K. 2004. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. Annals of Applied Biology 145(1):25-40.
- Aprile,A., Mastrangelo,A.M., De Leonardis,A.M., Galiba,G., Roncaglia,E., Ferrari,F., De Bellis,L., et al. 2009. Transcriptional profiling in response to terminal drought stress reveals differential responses along the wheat genome. BMC Genomics 10:279.
- Armstead,I., Donnison,I., Aubry,S., Harper,J., Hortensteiner,S., James,C., Mani,J., Moffet,M., Ougham,H., Roberts, L., Thomas,A., Weeden,N., Thomas,H., and King,I. 2007. Cross-species identification of Mendel's I locus. Science 315:73.
- Artuso,A., Guidi,L., Soldatini,G.F., Pardossi,A., Tognoni,F. 2000. The influence of chilling on photosynthesis and activities of some enzymes of sucrose metabolism in *Lycopersicon esculentum* Mill. Acta Physiologiae Plantarum 22(2):95-101.
- Atteson,K. 1997. The performance of neighbor-joining algorithms of phylogeny reconstruction, pp:101–110. In Jiang,T., and Lee,D. (eds.), Lecture Notes in Computer Science, 1276, Springer-Verlag, Berlin.
- Aubert,G., Morin,J., Jacquin,F., Loridon,K., Quillet,M.C., Petit,A., Rameau,C., Lejeune-Henaut,I., Huguet,T., and Burstin,J. 2006. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. Theoretical and Applied Genetics 112(6):1024-1041.

- Auld,D.L., Ditterline,R.L., Murray,G.A., and Swensen,J.B.. 1983. Screening peas for winter hardiness under field and laboratory conditions. *Crop Science* 23:85–88.
- Auld,D.L., Field,L.A, and Crock,J.C. 1985. Univ. of Idaho, Exp. Stn.Prog. Report . No. 228 (citado por Murray y Swensen, 1991).
- Baena-Gonzales,E., Rolland,F., Thevelein,J.M., and Sheen,J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448:938-942.
- Baga,M., Chodaparambil,S.V., Limin,A.E., Pecar,M., Fowler,D.B., and Chibbar,R.N. 2007. Identification of quantitative trait *loci* and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Functional and Integrative Genomics* 7(1):53–68.
- Bagge,M., Xia,X., and Lubberstedt,T. 2007. Functional makers in wheat. *Current Opinion in Plant Biology* 10:211-216.
- Balackova,N.E., Lakhanov,A.P., and Zaitsev,V.N. 1986. Resistance of pea and French bean breeding material to unfavorable temperatures. *Nauchno Tekhnicheskii Byulleten Vsesoyusnogo Nauchno Issledovatel Skogo Instituta Zernobobovykh i Krupanykh Kultur*. 1986, No. 35, pp: 66-71.
- Baranger,A., Aubert,G., Arnau,G., Laine,A.L., Deniot,G., Potier,J., Weinachter,C., Lejeune-Henaut,I., Lallemand,J., and Burstin,J. 2004. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108(7):1309-1321.
- Baranyi,M. and Greilhuber,J. and Swiêcicki,W.K. 1996. Genome size in wild *Pisum* species. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 717–727.
- Barilli,E., Prats,E. and Rubiales,D. 2010. Benzothiadiazole and BABA improve resistance to *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in *Pisum sativum* L. with an enhancement of enzymatic activities and total phenolic content. *European Journal of Plant Pathology* 128: 483-493.
- Bas,A., Forsberg,. G., Hammarstrom,S., and Hammarstrom,M.L. 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde- 3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 59:566–573.
- Bayer,U. 1985. Lecture notes in earth sciences. Vol. 2. Pattern recognition problems in geology and paleontology. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Beach,L.R., Spencer,D., Randall,P.J., and Higgins,T.J., 1985. Transcriptional and post-transcriptional regulation of storage protein gene expression in sulfur-deficient pea seeds. *Nucleic Acids Research* 13:999–1013.
- Becher,S.A., Steinmetz,K., Weising,K. Boury,S., Peltier,D., Renou,J.P., Kahl,G., and Wolff,K. 2000. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 643–651.
- Becker,J., and Heun,M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology* 27:835-845.
- Belcher,S.J. 1999. Evaluation of winter and spring pea cultivars (*Pisum sativum*) sown in autumn and spring. *Aspects of Applied Biology*, 56: 135-140.
- Belenghi,B., Salomon M., and Levine,A. 2004. Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. *Journal of Experimental Botany* 55(398):889-897.
- Belimov,A.A., Dodd,I.C., Hontzeas,N., Theobald,J.C., Safronova,V.I., and Davies,W.J. 2009. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. *New Phytologist* 181(2):413-423.
- Bennetzen,J.L. 2000a. Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: microcolinearity and its many exceptions. *Plant Cell* 12:1021–1029.
- Bennetzen,J.L. 2000b. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol.* 42:251–269.

- Bennetzen, J.L., and Ramakrishna, W. 2002. Numerous small rearrangements of gene content, order and orientation differentiate grass genomes. *Plant Mol. Biol.* 48:821–827.
- Ben-Ze'ev, N. and Zohary, D. 1973. Species relationships in the Genus *Pisum*. *Israel Journal Of Botany* 22:73-91.
- Berger, A. Systematic botany of peas and their allies. Hedrick, U. *The Vegetables of New York*. 1928. Albany: State of New York, Education Department.
- Beveridge, C.A., Weller, J.L., Singer, S.R., and Hofer, J.M.I. 2003. Axillary meristem development: Budding relationships between networks controlling flowering, branching and photoperiod responsiveness. *Plant Physiology* 131:927–934.
- Bhardwaj, P.K., Kaur, J., Sobti, R.C., Ahuja, P.S., and Kumar, S. 2011. Lipoxygenase in *Caragana jubata* responds to low temperature, abscisic acid, methyl jasmonate and salicylic acid. *Gene* 483(1-2):49-53.
- Bhattacharyya, M.K., Smith, A.M., Ellis, T.H.N., Hedley, C., and Martin, C. 1990. The wrinkled seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell* 60: 115-122.
- Biddle, A. 2001. *Seed Treatment, Challenges and Opportunities*. The BCPC Publications, UK.
- Bishay, K., Ory, K., Lebeau, J., Levalois, C., Olivier, M.F., and Chevillard, S., 2000. DNA damage- related gene expression as biomarkers to assess cellular response after gamma irradiation of a human lymphoblastoid cell line. *Oncogene* 19:916-923.
- Blanquicett, C., Johnson, M.R., Heslin, M., and Diasio, R.B. 2002. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Analytical Biochemistry* 303:209–214.
- Blas, A.L., Yu, Q., Chen, C., Veatch, O., Moore, P.H., Paull, R.E., and Ming, R. 2009. Enrichment of a papaya high-density genetic map with AFLP markers. *Genome* 52(8):716-725.
- Blixt, S. 1958. Cytology of *Pisum* II. The normal karyotype. *Agri Hortique Genetica* 16: 221–237.
- Blixt, S. 1972 Mutation genetics in *Pisum*. *Agri Hortique Genetica* 30:1–293.
- Blixt, S. 1974. The pea. Vol. 2. p. 181-221. In King, R.C. (ed.). *Handbook of genetics*. Plenum Press, New York, USA.
- Boissier, E. 1872. *Flora Orientalis: Calyciflorae Polypetalae*'.
- Bohn, M., Groh, S., Khairallah, M.M., Hoisington, D.A., Utz, H.F., and Melchinger, A.E. 2001. Re-evaluation of the prospects of marker-assisted selection for improving insect resistance against *Diatraea* spp. in tropical maize by cross validation and independent validation. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1059–1067.
- Bond, B.C., Virley, D.J., Cairns, N.J., Hunter, A.J., Moore, G.B., Moss, S.J., Mudge, A.W., Walsh, F.S., Jazin, E., and Preece, P. 2002. The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan real-time RT-PCR. *Molecular Brain Research* 106:101-116.
- Bolaños, L., Martín, M., El-Hamdaoui, A., Rivilla, R., and Bonilla, I. 2006. Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant and Soil* 280(1-2):135-142.
- Bost, B., de, V.D., Hospital, F., Moreau, L., and Dillmann, C. 2001. Genetic and nongenetic bases for the L-shaped distribution of quantitative trait *loci* effects. *Genetics* 157(4):1773-1787.
- Booth, M.A., Allan, G.L., Frances, J., and Parkinson, S. 2001. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*. IV. Effects of dehulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. *Aquaculture* 196 (1/2): 67-85.
- Börner, A., Schumann, E., Fürste, A., Cöster, H., Leithold, B., Röder, M., and Weber, W. 2002. Mapping of quantitative trait *loci* determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105:921–936.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., and Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140:103-125.

- Bourion,V., Fouilloux,G., Le Signor,C., and Lejeune-Hénaut,I. 2002. Genetic studies of selection for productive and stable peas. *Euphytica* 127:261–273.
- Bourion,V., Lejeune-Henaut,I., Munier-Jolain,N., and Salon,C. 2003. Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity *European Journal of Agronomy* 19 (4): 535-548.
- Bozoglu,H., Peksen,E., Peksen,A. and Gulumser, A. 2007. Determination of the yield performance and harvesting periods of fifteen pea (*Pisum sativum* L.) cultivars sown in autumn and spring. *Pakistan Journal of Botany* 39(6):2017-2025.
- Bradshaw,A.D. 1972. Some of the evolutionary consequences of being a plant. *BMC Evolutionary Biology* 5:25–47
- Branco,C.J., Vieira,E.A., Malone,G., Kopp,M.M., Malone,E., Bernardes,A., Mistura,C.C., Carvalho,F.I., and Oliveira,C.A. 2007. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *Journal of Applied Genetics* 48(2):107-113.
- Brauner,S., Murphy,R.L., Walling,J.G., Przyborowski,J., and Weeden,N.F. 2002. STS markers for comparative mapping in legumes *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 616–622.
- Bravo,L.A., Ulloa,N., Zúñiga,G.E., Casanova,A., Corcuera,L.J., and Alberdi,M., 2001. Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Plant Physiology* 111:55–65.
- Bretag,T.W., and Ramsey,M. 2001. Foliar diseases caused by fungi. In: Kraft,J.M., Pflieger,F.L. (eds) *Compendium of pea diseases and pests*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minn., pp 24–28.
- Brown,A.H.D. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics* 52:145-157.
- Brown,A.H.D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theoretical Population Biology*15:1-42.
- Brown,W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:3605-3609.
- Burgers,P.M. 1988. Mammalian cyclin/PCNA (DNA polymerase delta auxiliary protein) stimulates processive DNA synthesis by yeast DNA polymerase III. *Nucleic Acids Research* 16:6297–6307.
- Burns,M, and Valdivia,H. 2008. Modelling the limit of the detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology* 226:1513-1524.
- Burr,B., and Burr,F.A. 1991 Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations.. *Trends in Genetics* 7: 55–60.
- Burr,B., and Burr,F.A., Thompson,K.H., Albertson,M.C., and Stuber,C.W. 1988 Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118: 519–526.
- Burstin,J, Charcosset,A, 1997. Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigation. *Heredity* 79: 477–483.
- Burstin,J., Deniot,G., Potier,J., Weinanchter,C., Aubert,G., and Baranger,A. 2001. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. *Plant Breeding* 120:311-317.
- Burstin,J., Gallardo,K., Aubert,G., Bordat,A., Marget,P., Magnin-Robert,J.B., Houtin,H., Rond,C., Martinello,M., Chauveau A., Le Signor,C., and Duc,G. 2007. Diversity in *Pisum sativum* and comparative mapping with *Medicago truncatula*. In 6th European Conference on Grain Legumes "Integrating legume biology for sustainable agriculture" (12-16 novembre 2007, Lisbon congress centre, Portugal: AEP Association Européenne des protéagineux), pp. 11.
- Burstin,J., Marget,P., Huart,M., Moessner,A., Mangin,B., Duchene,C., Desprez,B., Munier-Jolain,N., and Duc,G. 2007. Developmental genes have pleiotropic effects on plant morphology and source capacity, eventually impacting on seed protein content and productivity in pea. *Plant Physiology* 144:768-781.
- Bustin,S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169 –93.
- Bustin,S.A., Benes,V., Nolan,T., Pfaffl,M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. . *Journal of Molecular Endocrinology* 34:597-601.

- Bustin,S.A., Benes,V., Garson,J.A., Hellemans,J., Huggett,J., Kubista,M., Mueller,R., Nolan,T., Pfaffl,M.W., Shipley,G.L., Vandesompele,J., and Wittwer,C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4):611-22.
- Byrne,P.F., McMullen,M.D., Snook,M.E., Musket,T.A., Theuri,J.M., Widstrom,N.W., Wiseman,B.R., and Coe,E.H. 1996. Quantitative trait *loci* and metabolic pathways: genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(17):8820–8825.
- Caldwell,K.S., Russell,J., Langridge,P., and Powell,W. 2006. Extreme population-dependent linkage disequilibrium detected in an inbreeding plant species, *Hordeum vulgare*. *Genetics* 172: 557-567.
- Caminero., 2002. Adaptación a la siembra invernal y tolerancia al frío en guisante (*Pisum sativum* L.). PhD. Thesis. Universidad de León.
- Carrouée,B., Lesouder,C. 1992. Prévion du risque de fuite en azote derrière une culture de pois. *Perspectives Agricoles* 171: 62-68.
- Casta, P., Sombrero,A., and Caminero,C. 2005. Introducción del guisante proteaginoso en una rotación típica de cultivos en Castilla y León y su rentabilidad económica. *Tierras de Castilla y León* 114:40-52.
- Castillo,J., Rodrigo,M.I., Márquez,J.A., Zúñiga,A., and Franco,L. 2000. A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily. *European Journal of Biochemistry* 267(8):2156-2165.
- Castillo,J., Genovés,A., Franco,L., and Rodrigo,M.I. 2005. A multifunctional bicupin serves as precursor for a chromosomal protein of *Pisum sativum* seeds. *Journal of Experimental Botany* 56(422):3159-3169.
- Castonguay,Y., Nadeau,P., Lechasseur,P., and Chouinard,L. 1995. Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness. *Crop Science* 35:509–516.
- Cattell,R.B. 1966. The scree test for the number of factors. *Multivariate Behavioral Research* 1:245-276.
- Causse,M., Rocher,J.P., Henry,A.M., Charcosset,A., Prioul,J.L., and De Vienne,D. 1995. Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme *loci*. *Molecular Breeding* 1:259–272.
- Causse,M., Santoni,S., Damerval,C., Maurice,A., Charcosset,A., Deatrick,J. and De Vienne,D. 1996. A composite map of expressed sequences in maize. *Genome* 39:418–432
- Causse,M., Duffe,P., Gomez,M.C., Buret,M., Damidaux,R., Zamir,D., Gur,A., Chevalier,C., Lemaire-Chamley,M., and Rothan,C. 2004. A genetic map of candidate gene and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* 55:1671–1685.
- Cavalli-Sforza,L.L., and Bodmer,W.F. 1981. *Genética de las Poblaciones Humanas*. Ed. Omega, Barcelona.
- Cervilla,L.M., Blasco,B., Ríos,J.J., Rosales,M.A., Rubio-Wilhelmi,M.M., Sánchez-Rodríguez,E., Romero,L., Ruiz,J.M. 2009. Response of nitrogen metabolism to boron toxicity in tomato plants. *Plant biology* 11(5):671-677.
- Ceyhan,E., and Onder,M. 1999. Konya Ekolojik Sartlarında Farklı Ekim Zamanlarının Yemeklik Bezelye (*Pisum sativum* L.) Cesitlerinde Verim ve Kalite Uzerine Etkileri. *Türkiye III. Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt III Çayır Mera Yem Bitkileri ve Yemeklik Tane Baklagiller*. 15-18 Kasım, s:377-382, Adana. (citado en Bozoglu *et al.*, 2007).
- Ceyhan,E. 2006. Genetic Analysis of Cold Hardiness in Peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Plant Sciences*, 1: 138-143.
- Chandler,P., Spencer,D., Randall,P.J., and Higgins,T.J.V., 1984. Influence of sulfur nutrition on development at patterns of some major pea seed proteins and their mRNAs. *Plant Physiol.* 75, 651–657.
- Chao,S., Zhang,W., Dubcovsky,J., and Sorrells,M. 2007. Evaluation of genetic diversity and genome-wide linkage disequilibrium among U.S. wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm representing different market classes. *Crop Science* 47:1018-1030.

- Chen,G.Q., He,X., Liao,L., and McKeon,T.A. 2004. 2s Albumin Gene Expression in Castor Plant (*Ricinus communis* L.). Journal of the American Oil Chemists' Society. 81(9):867-872.
- Chen,J., Chang,S.X., and Anyia,A.O. 2012. Quantitative trait *loci* for water-use efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) measured by carbon isotope discrimination under rain-fed conditions on the Canadian Prairies. Theoretical and Applied Genetics 125(1):71-90.
- Chen,L., Zhou,A., and Yang,Y. 2005. Genetic improvement and breeding of tea plant (*Camellia sinensis*) in China: from individual selection to hybridization and molecular breeding. Euphytica 154:239-248.
- Chen,X., Salamini,F., and Gebhardt,C. 2001. A potato molecular function map for carbohydrate metabolims and transport. Theoretical and Applied Genetics 102:284–295
- Chen,X., Marcelo,A.S., Guiping,Y., Yun,S., and Dubcovsky,J. 2003. Development of Sequence Tagged Site and Cleaved Amplified Polymorphic Sequence Markers for Wheat Stripe Rust resistance Gene Yr5. Crop Science 43:2058-2064.
- Chen,X.M., Moore,M., Milus,E.A., Long,D.L., Line,R.F., Marshall,D., and Jackson,L. 2002. Wheat stripe rust epidemics and races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the United States in 2000. Plant Disease 86:39-46.
- Chen,Y., Zhang,L., and Wang,J. 2011. Effects of coumarin application on plant growth and nitrogen metabolism in leaves of *Medicago sativa*. Allelopathy Journal 28(1):105-114.
- Cheng-Che,S.K., Kai-Wun,Y., Chu-Yung,L., and Yih-Ming,C. 1998. Characterization of a pea gene responsive to low temperature. Botanical Bulletin of Academia Sinica 39:9-15.
- Chinthapalli,B., Murmu,J., and Raghavendra,A.S. 2003. Dramatic difference in the responses of phosphoenolpyruvate carboxylase to temperature in leaves of C3 and C4 plants. Journal of Experimental Botany 54(383):707-714.
- Choi, H.K., Kim,D., Uhm,T., Limpens,E., Lim,H., Mun,J.H., Kalo,P., Penmetsa,R.V., Seres,A., Kulikova,O., *et al.* 2004a. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. Genetics 166, 1463–1502.
- Choi, H.K., Mun,J.H., Kim,D.J., Zhu,H., Baek,J.M., Mudge,J., Roe,B., Ellis,N., Doyle,J., Kiss,G.B., Young,N.D., and Cook,D.R. 2004a. Estimating genome conservation between crop and model legume species. Proceedings of the National Academy of Sciences 101:15289–15294.
- Choi,J.J., Klosterman,S.J., and Hadwiger,L.A. 2001. A comparison of the effects of DNA-damaging agents and biotic elicitors on the induction of plant defense genes, nuclear distortion, and cell death. Plant Physiology 125(2):752-762.
- Cieslarová,J., Hanáček,P., Fialová,E., Hýbl,M., and Smýkal,P. 2011: Estimation of pea (*Pisum sativum* L.) microsatellite mutation rate based on pedigree and single-seed descent analyses. Journal of Applied Genetics 52:391–401.
- Clulow,S.A., Matthews,P., and Lewis,B.G. 1991. Genetical analysis of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea seedlings. Euphytica 58:183–189.
- Coello,P., Hirano,E., Hey,S.J., Muttucumar,N., Martinez-Barajas,E., Parry,M.A.J., and Halford,N.G. 2012. Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. Journal of Experimental Botany 63(2):913-924.
- Collard,B.C.Y, Jahufer,M.Z.Z, Brouwer,J.B, and Pang,E.C.K 2005 An introduction to markers, quantitative trait *loci* (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica. 142:169-196.
- Collins,A., Milbourne,D., Ramsay,L., Meyer,R., Chatot-Balandras,C., Oberhagemann,P., De Jong,W., Gebhardt,C., Bonnel,E., and Waugh,R. 1999. QTL for field resistance to late blight of potato are strongly correlated with maturity and vigour. Molecular Breeding 5:387–398.
- Corbineau,F., Picard,M.A., Fougereux,J.A., Ladonne,F., and Côme,D. 2000. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. Seed Science Research 10(3):329-339.

- Cousin,R., 1976. Amélioration génétique du pois d'hiver. *Annales de l'Amelioration des Plantes* 26: 235-263.
- Cousin,R. 1983. In *Perspectives for Peas and Lupin as Protein Crops*. Thompson,R., and Casey,R. (eds). Nijhoff, Netherlands, pp 146-164.
- Cousin,R., Messenger,A., and Vingere,A. 1985. Breeding for yield in combining peas. In: Hebblethwaite,P.D., Heath,M.C., and Dawkins,T.C.K. *The pea crop. A basis for improvement*. Butterworths, London, pp. 115-129.
- Cousin,R., Burghoffer,A., Marget,P., Vingere,A., and Eteve,G. 1993. Morphological, physiological and genetic basis of resistance in pea to cold and drought. In: Singh,K.B., and Saxena,M.C. (eds), *Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes*. John Wiley and Sons, Sayce Publishing and ICARDA, West Sussex, pp 311–321
- Cousin,R., 1997. Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research* 53: 111-130.
- Coyne,C.J., Inglis,D.A., Whitehead,S.J., McClendon,M.T., and Muehlbauer,F.J. 2000: Chromosomal location of Fwf, the Fusarium wilt race 5 resistance gene in *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* 32:20-22.
- Craig,J., Lloyd,J.R., Tomlinson,K., Barber,L., Edwards,A., Wang,T.L., Martin,C., Hedley,C.L., and Smith,A.M. 1998, Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10:413–426
- Craig,J., Barratt,P., Tatge,H., Déjardin,A., Handley,L., Gardner,C.D., Barber,L., Wang,T.L., Hedley,C., Martin,C., and Smith,A.M. 1999. Mutations at the *rug4 locus* alter carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant Journal* 17:353–362
- Crane, M. B. *The origin and behaviour of cultivated plants*. Huxley, J. S. *The New Systematics*. 1940. London, Oxford University Press.
- Csencsics,D., Brodbeck,S., and Holderegger,R. 2010. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf Bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *Journal of Heredity* 101:789-793.
- Cuevas,J.C., López-Cobollo,R., Alcázar,R., Zarza,X., Koncz,C., Altabella,T., *et al.* 2008. Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology* 148:1094-1105.
- Cuevas,J.C., López-Cobollo,R., Alcázar,R., Zarza,X., Koncz,C., Altabella,T., *et al.* 2009. Putrescine as a signal to modulate the indispensable ABA increase under cold stress. *Plant Signaling and Behavior* 4:219-220.
- D'Silva,I., Poirier,G.G., and Heath,M.C. 1998. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response - A form of programmed cell death. *Experimental Cell Research* 245(2):389-399.
- Dalmanndóttir,S., Helgadóttir, Á., and Gudleifsson,B.E. 2001. Fatty acid and sugar content in white clover in relation to frost tolerance and ice-encasement tolerance. *Annals of Botany* 88:753–759.
- Darwin,C. 1859. *On the Origin of Species*. John Murray. Londres, Reino Unido.
- Datta,S., and Datta,S. 2003. Comparisons and validation of statistical clustering techniques for microarray gene expression data. *Bioinformatics* 19(4):459-466.
- Datta,S., and Datta,S. 2006. Methods for evaluating clustering algorithms for gene expression data using a reference set of functional classes. *BMC Bioinformatics* 7(397)
- Datta,S., Kaashyap,M., and Kumar,S. 2010. Amplification of chickpea-specific SSR primers in *Cajanus* species and their validity in diversity analysis. *Plant Breeding* 129:334–340.
- Davies,C., and Robinson,S.P. 2000. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiology* 122(3):803-812.
- Davies,D.R., Berry,G.J., Heath,M.C., and Dawkins,T.C.K. *Pea (Pisum sativum L.)*. Summerfield,R.J. and Roberts,E.H. *Grain Legume Crops*. 1985. London, UK, Williams Collins Sons and Co.
- Davis, P. H. *Pisum L.* Davis, P. H. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. [3]. 2012. Edinburg,UK, Edinburg University Press.

- De Vienne,D. 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Paris, INRA Editions.
- Delgado,I.J., Wang,Z., de Rocher,A., Keegstra,K., Raikhel,N.V. 1998. Cloning and characterization of AtRGP1: A reversibly autoglycosylated *Arabidopsis* protein implicated in cell wall biosynthesis. *Plant Physiology* 116:1339-1349.
- Delye,C., Straub,C., Michel,S., and Le,C., V. 2004. Nucleotide variability at the acetyl coenzyme A carboxylase gene and the signature of herbicide selection in the grass weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.). *Molecular Biology and Evolution* 21(5):884-892.
- Dempster,A.P., Laird,N.M., and Rubin,D.B. 1977 Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society* 39:1-38.
- Dereuddre,J., and Gazeau,C. 1992. Les végétaux et les très basses températures. In: Côme, D. (Ed.), *Les végétaux et le froid*. Hermann, pp. 107-175.
- Dettori, M.T., Quarta,R. and Verde,I. 2001. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs and morphological markers. *Genome*, 44:783-790.
- Deulvot,C., Charrel,H., Marty,A., Jacquin,F., Donnadieu,C., LejeuneHénaut,I., Burstin,J., and Aubert,G. 2010. Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea. *BMC Genomics* 11: 468-478.
- Devi,R., Munjral,N., Gupta,A.K., and Kaur,N. 2007. Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Environmental and Experimental Botany* 61(2):167-174.
- Dexter,S.T., Tottingham,W.E., and Graber,L.F. 1932. Investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiology* 7(1):63–78.
- Diatchenko,L., Lau,Y.C., Campbell,A.P., Chenchik,A., Moqadam,F., Huang,B., Lukyanov,S., Lukyanov,K., Gurskaya,N., Sverdlov,E.D. and Siebert,P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6025–6030.
- Diaz Vivancos,P., Wolff,T., Markovic,J., Pallardó,F.V., and Foyer,C.H. 2010. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochemical Journal* 431(2):169-178.
- Die,J.V., Román,B., Nadal,S., and González-Verdejo,C.I. 2010. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta* 232:145-153.
- Dietz, K.J. 2003. Plant Peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology* 54:93-107.
- Dirlewanger,F., Issac,P.G., Ranade,S., Belajouza,M., Cousin,R.D.E., and Vienne,D. 1994 Restriction fragment length polymorphism analysis of *loci* associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 17–27.
- Dita,M.A., Rispaill,N., Prats,E., Rubiales,D., and Singh,K.B. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147:1-24.ç
- Diwan,N., Bhagwat,A.A., Bauchan,G.R., and Cregan,P.B. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40:887-895.
- Dixit,V., Pandey,V., Shyam,R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52(358):1101-1109.
- Doebley,J. 2006. Plant science. Unfallen grains: how ancient farmers turned weeds into crops. *Science* 312(5778):1318-1319.
- Doebley,J.F., Gaut,B.S., and Smith,B.D. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127(7):1309-1321.
- Domoney,C., Welham,T., Ellis,N. and Hellens,R. 1994. Inheritance of qualitative and quantitative trypsin inhibitor variants in *Pisum*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:387-391.

- Domoney,C., Welham,T., Sidebottom,C., and Firmin,J.L. 1995. Multiple isoforms of *Pisum* trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. *FEBS Letters* 360:15-20.
- Dordio,A.M. 1997. Winter varieties on grain legumes in Portugal. In: AEP (ed.) Problems and prospects for winter sowing of grain legumes in Europe. 3-4 December 1996. Dijon, France. 15-18.
- Doré,T., Meynard,J.M., and Sebillotte,M. 1998. The role of grain number, nitrogen nutrition and stem number in limiting pea crop (*Pisum sativum*) yields under agricultural conditions. *European Journal of Agronomy* 8(1-2): 29-37.
- dos Santos,T.B., Budzinski,I.G.F., Marur,C.J., Petkowicz,C.L.O., Pereira,L.F.P., and Vieira,L.G.E. 2011. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(4):441-448.
- Dowker,B.D. 1969. Field methods of assessing winter hardiness in peas. *Euphytica* 18: 398-402.
- Doyle,J.J., Doyle,J.L., 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Doyle,J.J., Doyle,J.L., Ballenger,J.A., Dickson,E.E., Kajita,T., Ohashi,H. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American Journal of Botany* 84:541-554.
- Dreher,K., Khairallah,M., Ribaut,J., and Morris,M. 2003. Money matters (I): Costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. *Molecular Breeding* 11:221-234.
- Dubreuil,P. and Charcosset,A. 1999. Relationships among maize inbred lines and populations from European and North American origins as estimated using RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99:473-480.
- Duke,J.A. 1981. Hand book of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York. p. 199-265.
- Dumolin,V.B., Denis,J.B., Henaut,I.L., and Eteve,G. 1996. Interpreting Yield Instability in Pea Using Genotypic and Environmental Covariates. *Crop Science*, 36: 1154.
- Dumont,E., Fontaine,V., Vuylsteker,C, Sellier,H., Bodèle,S., Voedts,N., Devaux,R., Frise,M., Avia,K., Hilbert,J.L., Bahrman,N., Hanocq,E., Lejeune-Hénaut,I., and Delbreil,B. 2009. Association of sugar content QTL and PQL with physiological traits relevant to frost damage resistance in pea under field and controlled conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 118(8):1561-71.
- Dumont,E., Bahrman,N., Goulas,E., Valot,B., Sellier,H., Hilbert,J.L., Vuylsteker,C., Lejeune-Hénaut,I., and Delbreil,B. 2011. A proteomic approach to decipher chilling response from cold acclimation in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Science* 180(1):86-98.
- East,E.M. 1916. Studies on Size Inheritance in *Nicotiana*. *Genetics* 1(2):164-176.
- Efron,B., and Gong,G. 1983. A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *Journal of the American Statistical Association* 37:36-48.
- Ehrlich,J., Sankoff,D., and Nadeau,J.H. 1997. Synteny conservation and chromosome rearrangements during mammalian evolution. *Genetics* 147(1):289-296.
- Ellis,M.H., Spielmeyer,W., Gale,K.R., Rebetzke,G.J., and Richards,R.A. 2002. Perfect markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 105:1038-1042.
- Ellis,T.H.N., Turner,L., Helleus,R.P., Lee,D., Harker,C.L., Enard,C. *et al.* 1992 Linkage maps in pea. *Genetics* 130, 649-663.
- Ellis,T.H.N., Hellens,R.P., Turner,L., Lee,C., Domoney,C., and Welham,T. 1993. On the pea linkage map. *Pisum Genetics* 25: 5-12
- Ellis,T.H., Poyser,S.J., Knox,M.R., Verzhinin,A.V., and Ambrose,M.J. 1998. Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Molecular and General Genetics* 260(1):9-19.
- Ellis,T.H. and Poyser,S.J. 2002. An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist* 153:17-25.

- Ellis, T.H.N. *Pisum*. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*; Kole, C., (ed.) Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, Germany, 2011; capítulo 12, pp. 237–248.
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C., and Hancock, J.F. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology & Systematics* 30:359-363.
- Elvira-Recuenco, M. 2000. Sustainable control of pea bacterial blight: approaches for durable genetic resistance and biocontrol by endophytic bacteria. Tesis Wageningen University.
- Erskine, W., Tufail, M., Russell, A., Tyagi, M.C., Rahman, M.M., and Saxena, M.C. 1994. Current and future strategies in breeding lentil for resistance to abiotic and biotic stresses. *Euphytica* 73:127-135.
- Esquinas-Alcazar, J.T. and Gulick, P.J. 1983. 'Genetics resources of Cucurbitaceae: A Global Report'. International Board for Plant Genetic Resources.
- Eteve, G. 1985. In *The Pea Crop: A Basis for Improvement*. Hebblethwaite, P.D., Heath, M.C., and Dawkins, T.C.K., (eds). Butterworths. London, UK, pp 131-136.
- Eujayl, I., Sledge, M.K., Wang, L., May, G.D., Chekhoyskiy, K., Zwonitzer, J.C., and Mian, M.A.R. 2004. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 414–422.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Ewing, E.E., Simko, I., Smart, C.D., Bonierbale, M.W., Mizubuti, E.S.G.G., May, D., and Fry, W.E. 2000. Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Molecular Breeding* 6:25-36.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Fabrigar, L.R., Wegener, D.T., MacCallum, R.C., and Strahan, E.J. 1999. Evaluating the use of exploratory factor analysis in psychological research. *Psychological Methods* 3:272-299.
- Falahati-Anbaran, M., Habashi, A.A., Esfahany, M., Mohammadi, S.A., and Ghareyazie, B. 2007. Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. *Journal of Genetics* 86(1):59-63.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked *loci* and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7:574-578.
- FAOSTAT. 2010 Food and Agricultural Organization of the United Nations. Data, various years <http://faostat.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>. (Accessed 30th July 2012).
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Ferre, L., 1995. Selection of components in principal component analysis: a comparison of methods. *Computing and Statistical Data Analysis* 19:669–682.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., and Rock, C.D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell (Suppl)* 14: S15–S45.
- Finnegan, D. J. 1992. Transposable elements. *Current Opinion in Genetics and Development* 2:861–867.
- Flavell, A.J., Dunbar, E., Anderson, R., Pearce, S.R., Hartley, R., and Kumar, A. 1992. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Research* 20(14):3639-3644.
- Flavell, A.J., Knox, M.R., Pearce, S.R., and Ellis, T.H. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant Journal* 16(5):643-650.

- Flores, H.E. 1991. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: Slocum RD, Flores HE, Eds. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Boca Raton: CRC Press, pp 213-228.
- Fondevilla, S., Fernández-Aparicio, M., Satovic, Z., Emeran, A.A., Torres, A.M., Moreno, M.T., and Rubiales, D. 2010. Identification of quantitative trait *loci* for specific mechanisms of resistance to *Orobanche crenata* in pea. *Molecular Breeding* 25:259-272.
- Fondevilla, S., Küster, H., Krajinski, F., Cubero, J., and Rubiales, D. 2011a. Identification of common genomic regions controlling resistance to *Mycosphaerella pinodes*, earliness and architectural traits in different pea genetic backgrounds. *Euphytica* 18:43-52.
- Fondevilla, S., Martín-Sanz, A., Satovic, Z., Fernández-Romero, M-D., Rubiales, D. and Caminero, C. 2011b. Identification of quantitative trait *loci* involved in resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*.
- Ford, R., Le Roux, K., Itman, C., Brouwer, J.B., and Taylor, P.W.J. 2002. Genome-specific sequence tagged microsatellite site (STMS) markers for diversity analysis and genotyping in *Pisum* species. *Euphytica* 124: 397 – 405.
- Foucher, F., Morin, J., Courtiade, J., Cadioux, S., Ellis, N., Banfield, M.J., and Rameau, C. 2003. Determinate and late flowering are two terminal flower1/centroradialis homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell* 15(11):2742–2754.
- Fontaine, V., Cabané, M., and Dizengremel, P. 2003. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress. *Physiologia Plantarum* 117(4):445-452.
- Fourmont, R. Les varieties de pois (*Pisum sativum* L.), Cultives en France. 1956. French National Institute for Agricultural Research (INRA).
- Fowler, D.B. 1979. Selection for winter hardiness in wheat (*Triticum aestivum* L.). 2. Variation within field trials. *Crop Science* 19: 773 775.
- Fowler, D.B., Chauvin, L.P., Limin, A.E., and Sarhan, F. 1996. The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature induced genes in wheat and rye. *Theoretical and Applied Genetics* 93:554–559
- Fowler, D.B., Breton, G., Limin, A.E., Mahfoofi, S., and Sarhan, F. 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature induced gene expression in barley. *Plant Physiology* 127:1676–1681
- Fowler, C. and Hodgkin, T. 2004. Plant genetic resources for food and agriculture: Assessing global availability. *Annual Review of Environment and Resources* 29:143-179.
- Foyer, C.H., and Noctor, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 11(4):861-905.
- Francia, E., Rizza, F., Cattivelli, L., Stanca, A.M., Galiba, G., Toth, B., Hayes, P.M., Skinner, J.S., and Pecchioni, N. 2004. Two *loci* on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a ‘Nure’ (winter) x ‘Tremois’ (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics* 108:670–680
- Frankel, O.H. 1947. The theory of plant breeding for yield. *Heredity* 1:109-120/123.
- Frankel, O.H. 1958. Plant breeding. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 24(112):123.
- Franklin, G., Pius, P.K., and Ignacimuthu, S. 2000. Factors affecting in vitro flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 115: 65–73.
- Franssen, S.U., Shrestha, R.P., Bräutigam, A., Bornberg-Bauer, E., and Weber, A.P. 2011. Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing. *BMC Genomics* 11:12:227.
- Frary, A., Xu, Y., Liu, J., Mitchell, S., Tedeschi, E., and Tanksley, S.D. 2005. Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theoretical and Applied Genetics* 111:291-312.
- Frew, T.J., Russell, A.C., and Timmerman-Vaughan, G.M. 2002. Sequence tagged site markers linked to the sbm1 gene for resistance to pea seedborne mosaic virus in pea. *Plant Breeding* 121:512–516.

- Frewen,B.E., Chen,T.H., Howe,G.T., Davis,J., Rohde,A., Boerjan,W., Bradshaw,H.D. 2000. Quantitative trait *loci* and candidate gene mapping of bud set and bud flush in populus. *Genetics* 154(2):837–845.
- Frolova,S.A., Titov,A.F., and Talanova,V.V. 2011. Effect of low-temperature hardening on activities of proteolytic enzymes and their inhibitors in the leaves of wheat and cucumber seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(2):248-252.
- Fuchs,J., Kühne,M. and Schubert,I. 1998. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma* 107: 272–276
- Fukuta,Y., Sasahara,H., Takamura,K., and Fukuyama,T. 2000. RFLP linkage map included the information of segregation distortion in a wide-cross population between Indica and Japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science* 50:65-72.
- Galiba,G., Quarrie,S.A., Sutka,J., Morgounov,A., Snape,J.W. 1995. Rflp Mapping of the Vernalization (*Vrn1*) and Frost-Resistance (*Fr1*) Genes on Chromosome 5a of Wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1174-1179.
- Gallardo,K., Le Signor,C., Vandekerckhove,J., Thompson,R.D., Burstin,J. 2003. Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiology* 133:664-682.
- Galston,A.W., and Sawhney,R.K.1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* 94:406-10.
- Galton,F. 1886. Regression towards mediocrity in hereditary stature. *Journal of the Anthropological Institute* 15:246-263.
- Galton,F. 1889. 'Natural Inheritance'. Macmillan and Co.
- Galvez,A.F., and de Lumen,B.O. 1999. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotechnology* 17:495-500.
- Gálvez,L., González,E.M., and Arrese-Igor,C. 2005. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *Journal of Experimental Botany* 56(419):2551-2561.
- Gao,Z., Eyers,S., Thomas,C., Ellis,N. and Maule,A. 2004. Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetics* 109:488-494.
- Gardiner,J.M., Coe,E.H., Melia-Hancock,S., Hoisington,D.A., and Chao,S. 1993. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F2 population. *Genetics* 134(3):917-930.
- Garris,A.J., McCouch,S.R., and Kresovich,S. 2003. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the *xa5 locus* of rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 165:759-769.
- Garvin,D.F., McKenzie,N., Vogel,J.P., Mockler,T.C., Blankenheim,Z.J., Wright,J., Cheema,J.J., Dicks,J., Huo,N., Hayden,D.M., Gu,Y., Tobias,C., Chang,J.H., Chu,A., Trick,M., Michael,T.P., Bevan,M.W., and Snape,J.W. 2010. An SSR-based genetic linkage map of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Genome* 53(1):1-13.
- Gasser,C.S. and Fraley,R.T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244(4910):1293-1299.
- Ge,L., Liu,J.Z., Wong,W.S., Hsiao,W.L.W., Chong,K., Xu,Z.K., Yang,S.F., *et al.* 2000. Identification of a novel multiple environmental factor-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, NT-ACS2, from tobacco. *Plant, Cell and Environment* 23(11):1169-1182.
- Gepts,P. 2012. A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetics engineering. *Crop Science* 42:1780-1790.
- Ghafoor,A., McPhee,K. 2012. Marker assisted selection (MAS) for developing powdery mildew resistant pea cultivars. *Euphytica* (DOI 10.1007/s10681-011-0596-6).
- Ghanem,M.E., Martinez-Andujar,C., Albacete,A., Pospíšilova,H., Dodd,I.C., Perez-Alfocea,F., and Lutts, S. 2011. Nitrogen Form Alters Hormonal Balance in Salt-treated Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 30(2):144-157.
- Gibault,G. 1912. 'Histoire des légumes'. Librairie Horticole.

- Gilmour,S.J., Hajela,.R.K., and Thomashow,M.F. 1988. Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 87: 745-750.
- Gilmour,S.J., and Thomashow,M.F. 1991. Cold acclimation and cold regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana* . *Plant Molecular Biology* 17: 1233-1240.
- Gilpin,B.J., McCallum,J.A., Frew,T.J., and Timmerman-Vaughan,G.M. 1997. A linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics* 95:1289-1299.
- Gomez-Jimenez,M.C., and Matilla,A.J. 2006. Cloning of a cDNA-encoding ACC synthase and its mRNA expression during zygotic embryogenesis of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Plant Growth Regulation* 50(1) :01-110.
- González,E.M., Gálvez,L., and Arrese-Igor,C. 2001. Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany* 52(355):285-293.
- González,M.C., Sánchez,R., and Cejudo,F.J. 2003. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta* 216(6):985-992.
- Gordon,A.J., Minchin,F.R., James,C.L., and Komina,O. 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology* 120(3):867-877.
- Gostimskii,S.A., Kokaeva,Z.G., and Konovalov,F.A. 2005. Studying Plant Genome Variation Using Molecular Markers. *Russian Journal of Genetics* 41(4): 480–492.
- Guo,X.R., Zu,Y.G., and Tang,Z.H. 2012. Physiological responses of *Catharanthus roseus* to different nitrogen forms. *Acta Physiologiae Plantarum* 34(2):589-598.
- Govorov, L. I. Pea. *Flora of Cultivated Plants*. 1937. Moscow and Leningrad, USSR, State Printing Office.
- Grandbastien,M.A., Lucas,H., Morel,J.B., Mhiri,C., Verhettes,S., and Casacuberta,J.M. 1997. The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defence response. *Genetica* 100: 241–252.
- Graner,A., Ludwig,W.F., and Melchinger, A.E. 1994. Relationships among European barley germoplasm. *Crop Science* 34:1199-1205.
- Greilhuber,J. and Ebert,I. 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37(4):646-655.
- Gritton, E. T. Field pea hybridization of crop plants. Fehr, W. R. and Hadley, H. H. 347-356. 1980. Wisconsin, USA, American Society of Agronomy, Inc; and Crop Science Society of America. Inc.
- Groppa,M.D., and Benavides,M.P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34:35-45.
- Gualtieri,G., Bisseling,T. 2002. Microsynteny between *Medicago truncatula* SYM2-orthologous genomic region and another region located on the same chromosome arm. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 771–779.
- Guenin,S., Mauriat,M., Pelloux,J., Van Wuytswinkel,O., Bellini,C., and Gutierrez,L. 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany* 60:487-493.
- Guerrero,A. 1999. Guisantes secos. En: *Cultivos herbáceos intensivos*. Guerrero,A. (ed). Mundi-prensa.
- Gulumser, A., F. Seyis and H. Bozoglu. 1994. Samsun Ekolojik Sartlarında Kışlık ve Yazlık Olarak Ekilen Bezelye Cesitlerinin Konservelik Ozellikleri ile Tane Verimlerinin Tespiti. *Tarla Bitkileri Kongresi*, 25-29 Nisan Cilt 1, Agronomi Bildirileri, s: 87-90, İzmir (citado en Bozoglu *et al.*, 2007).
- Gul,S., Ahmad,H., Khan,I.A., and Alam,M. 2012. Assessment of genetic diversity in tea genotypes through RAPD primers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10:2609-2611.
- Gupta,K., Balyan,S., Edwards,J., Isaac,P., Korzun,V., Roder,M., Gautier,M.F., Joudrier,P., Schlatter,R., Dubcovsky,J., De La Pena,C., Khairallah,M., Penner,G., Hayden,J., Sharp,P., Keller,B., Wang,C., Hardouin,P., Jack,P., and Leroy,P. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) *loci* in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 105(2-3):413-422.

- Gupta,P.K., Varshney,R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with special emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Gupta,P.K., Rustgi,S., Sharma,S., Singh,R., Kumar,N., and Balyan,H.S. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 270(4):315-323.
- Gupta,P.K. and Rustgi,S. 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional & Integrative Genomics* 4:139-142.
- Gupta,P.K., Balyan,H.S., and Varshney,R.K. 2010. Quantitative genetics and plant genomics: an overview *Molecular Breeding* 26(2):133-134.
- Gupta,S., Chakraborti,D., Rangi,R.K., Basu,D., and Das,S. 2009. A molecular insight into the early events of chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. *Phytopathology* 99(11):1245-1257.
- Gutierrez,L., Mauriat,M., Guenin,S., Pelloux,J., Lefebvre,J.F., Louvet,R., *et al.* 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal* 6:609 –18.
- Guy,C.L., Niemi,K.J., and Brambl,R. 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proceedings of the National Academy of Science* 82:3673-3677.
- Guy,C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 4 (1): 187-223.
- Guy,C.L., Haskell,D.W., Neven,L.G., Klein,P.A., and Smefeser,C. 1992. Hydration-state-responsive protein link cold and drought stress in spinach. *Planta*: 188, 265-70.
- Guy,C., Kaplan,F., Kopka,J., Selbig,J., and Hinch,D.K. 2008. Metabolomics of temperatura stress. *Physiologia Plantarum* 132:220–235.
- Haldane,J.B. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between linked factors. *Journal of Genetics* 8:299-309.
- Hall,K.J., Parker,J.S., Ellis,T.H.N. 1997. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. I. Standard and translocation karyotypes. *Genome* 40: 744 –754
- Hallauer, A. R. Selection and breeding methods. Frey, K. J. *Plant Breeding* II. 1981. Amaes, IA, Iowa State University Press.
- Halward,T., Stalker,H.T., and Rochert,G. 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. *Theoretical and Applied Genetics* 87(3):379-384.
- Hardy,G.H. 1908. Mendelian Proportions in a mixed population. *Science* 28(706):49-50.
- Harlan, J. R. Origin and processes of domestication. Chapman, G. P. *Grass evolution and domestication*. 1992. Cambridge, Cambridge University Press.
- Harrison,C.J., Hedley, L., and Wang,T.L. 1998. Evidence that the *rug3 locus* of pea (*Pisum sativum* L.) encodes a plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *Plant Journal* 13:753–762
- Harushima,Y., Yano,M., Shomura,A., Sato,M., Shimano,T., Kubobi,Y., Yarnamoto,S.Y., Lin,B.A., Antonio,A., Parco,H., and Kajiya,N.H.K.Y.Y.N.N.K.G.S. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics* 148:474-494.
- Hauggaard-Nielsen,H., Gooding,M., Ambus,P., Corre-Hellou,G., Crozat,Y., Dahlmann,C., Dibet,A., von Fragstein,P., Pristeri,A., Monti,M., and Jensen,E.S., 2009. Pea-barley intercropping for efficient symbiotic N₂-fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crops Research* 113: 64-71.

- He, X.Z., Reddy, J.T., and Dixon, R.A. 1998. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase. *Plant Molecular Biology* 36(1):43-54.
- Heath, M.C., and Hebblethwaite, P.D. 1985. Agronomic problems associated with pea crop. In: Hebblethwaite, P.D., Heath, M.C., and Dawkins, T.C.K. (eds.), *The Pea Crop*. Butterworths, London, UK. pp. 19-29.
- Hebbelmann, I., Selinski, J., Wehmeyer, C., Goss, T., Voss, I., Mulo, P., Kangasjärvi, S., *et al.* 2012. Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany* 63(3):1445-1459.
- Hecht, V., Foucher, F., Ferrandiz, C., Macknight, R., Navarro, C., Morin, J., Vardy, M.E., Ellis, N., Beltran, J.P., Rameau, C., and Weller, J.L. 2005. Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes. *Plant Physiology* 137:1420–1434.
- Hekneby, M., Antolín, M.C., and Sánchez-Díaz, M. 2006. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Experimental Botany* 55:305–314.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A., and Nien-De León, J. 2012. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 72:761-769.
- Hemming, M.N., and Trevaskis, B. 2011. Make hay when the sun shines: The role of MADS-box genes in temperature-dependant seasonal flowering responses. *Plant Science* 180(3):447-453.
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P., and Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment* 23(8):853-862.
- Hickling, D., 2003. *Canadian Feed Peas Industry Guide*. 3rd Edn., Pulse Canada, Winnipeg, Manitoba, Canada.
- Higgins, T.J.V., Chandler, P.M., Randall, P.J., Spencer, D., Beach, L.R., Blagrove, R.J., Kortt, A.A., and Inglis, A.S. 1986. Gene structure, and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds. *Journal of Biological Chemistry* 261:11124–11130.
- Higgins, T.J.V., Newbigin, E.J., Spencer, D., Llewellyn, D.J and Craig, S. 1988. The sequence of a pea vicilin gene and its expression in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 11:683–695.
- Highton, R. 1993. The Relationship between the Number of *Loci* and the Statistical Support for the Topology of UPGMA Trees Obtained from Genetic Distance Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2(4):337–343.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., and Kanda, M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7783–7788.
- Hirotsu, N., Murakami, N., Kashiwagi, T., Ujiie, K., and Ishimaru, K. 2010. Protocol: a simple gel-free method for SNP genotyping using allele-specific primers in rice and other plant species. *Plant Methods* 6:12.
- Hittalmani, S., Shashidhar, H.E., Bagali, P.G., Huang, N., Sidhu, J.S., Singh V.P., and Khush, G.S. 2002. Molecular mapping of quantitative trait *loci* for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. *Euphytica* 125:207-214.
- Ho, L.H.M., Giraud, E., Lister, R., Thirkettle-Watts, D., Low, J., Clifton, R., Howell, K.A., *et al.* 2007. Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development *Plant Physiology* 143(4):1519-1533.
- Hoey, B.K., Crowe, K.R., Jones, V.M. and Polans, N.O. 1996. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 92–100.
- Hodgkin, T. Some current issues in the conservation and use of plant genetic resources. Ayad, W. D, Hodgkin, T., Jaradat, A., and Rao, V. R. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. 9-10-1995. Rome, IPGRI workshop. Huang, L., Brooks, S.A., Li, W., Fellers, J.P., Trick, H.N., and Gill, B.S. 2003. Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164(2):655-664.
- Hofer, J., Gourlay, C., Michael, A., and Ellis, T.H.N. 2001 Expression of a class I knotted-1 like homeobox gene is down-regulated in pea compound leaf primordia. *Plant Molecular Biology* 45, 387–391.

- Holaday,A.S., Martindale,W., Alred,R., Brooks,A.L., and Leegood,R.C. 1992. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. *Plant Physiology* 98:1105–1114.
- Horikoshi,T., Danenberg,K.D., Stadlbauer,T.H., Volkenandt,M., Shea,L.C., Gerlach,J.H. *et al.* 1992. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction *Cancer Research* 52:108-116.
- Hosseini,S., Karlsson,M., Jensen,D.F., Heyman,F. 2012. Quantification of *Phytophthora pisi* DNA and RNA transcripts during in planta infection of pea. *European Journal of Plant Pathology* 132(3):455-468.
- Huang,B., Chu,C.H., Chen,S.L., Juan,H.F., and Chen,Y.M. 2006. A proteomics study of the mung bean epicotyl regulated by brassinosteroids under conditions of chilling stress. *Cellular and Molecular Biology Letters* 11(2):264-278.
- Huang,G., Gong,S., Xu,W., Li,P., Zhang,D., Qin,L., Li,W., and Li,X. 2011. GhHyPRP4, a cotton gene encoding putative hybrid proline-rich protein, is preferentially expressed in leaves and involved in plant response to cold stress. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43(7):519-527.
- Huggett,J., Dheda,K., Bustin,S., Zumla,A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6:279–84.
- Humphry,M., Konduri,V., Lambrides,C., Magner,T., McIntyre,C., Aitken,E., and Liu,C. 2002. Development of a mungbean (*Vigna radiata*) RFLP linkage map and its comparison with lablab (*Lablab purpureus*) reveals a high level of colinearity between the two genomes. *Theoretical and Applied Genetics* 105(1):160–166.
- Hunter,P.J., Ellis,N., and Taylor,J.D. 2001. Association of dominant *loci* for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* with linkage groups II, VI and VII of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* 103:129–135.
- Iglesias-Baena,I., Barranco-Medina,S., Lázaro-Payo,A., López-Jaramillo,F.J., Sevilla,F., and Lázaro,J.J. 2010. Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *Journal of Experimental Botany* 61(5):1509-1521.
- Ijaz,S., and Khan,I.A. 2009. Molecular characterization of wheat germplasm using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 8:809-815.
- Imura,Y., Seki,H., Toyoda,K., Ichinose,Y., Shiraishi,T., and Yamada,T. 2001. Contrary operations of Box-I element of pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1 promoter for organ-specific expression. *Plant Physiology and Biochemistry* 39(5):355-362.
- Irzykowska,L., Wolko,B., and Swiecicki,W.K. 2001 The genetic linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular, biochemical and morphological markers. *Pisum Genetics* 33, 13–18.
- Irzykowska,L., Wolko,B., Swiêcicki,W.K., 2002. Interval mapping of QTLs controlling some morphological traits in pea. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7(2A): 417–423.
- Irzykowska,L., and Wolko,B. 2004 Interval mapping of QTLs controlling yield-related traits and seed protein content in *Pisum sativum*. *Journal of Applied Genetics* 45, 297–306.
- Ishibashi,Y., Yamaguchi,H., Yuasa,T., Iwaya-Inoue,M., Arima,S., and Zheng,S.H. 2011. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology* 168(13):1562-1567.
- Ishiga,Y., Funato,A., Tachiki,T., Toyoda,K., Shiraishi,T., Yamada,T., and Ichinose,Y. 2002. Expression of the 12-oxophytodienoic acid 10,11-reductase gene in the compatible interaction between pea and fungal pathogen. *Plant and Cell Physiology* 43(10):1210-1220.
- Ishimaru,K., Yano,M., Aoki,N., Ono,K., Hirose,T., Lin,S.Y., Monna,L., Sasaki,T., and Ohsugi,R. 2001. Toward the mapping of physiological and agronomic characters on a rice function map: QTL analysis and comparison between QTLs and expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics* 102:793–800.
- Jackson,D.A., 1993. Stopping rules in principal component analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology* 74, 2204–2214.
- Jain,A.N., Tokuyasu,T.A., Snijders,A.M., Segreaves,R., Albertson,D.G., and Pinkel,D. 2002. Fully automatic quantification of microarray image data. *Genome Research* 12:325-332.

- Jain,M., Nijhawan,A., Tyagi,A.K., and Khurana,J.P. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(2):646-651.
- Janila,P. and Sharma,B. 2004. RAPD and SCAR markers for powdery mildew resistance gene in pea. *Plant Breeding* 123, 271-274.
- Jarvis,P., Lister,C.K., Szabo,V., and Dean,C. 1994 Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 24: 685-687.
- Jenner,C.F., Ugalde,T.D., and Aspinall,D. 1991. The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* 18:211-226.
- Jenczewski,E., Gherardi,M., Bonnin,I., Prospero,J.M., Olivieri,I., and Huguet,T. 1997. Insight on segregation distortions in two intraspecific crosses between annual species of *Medicago* (Leguminosae). *Theoretical and Applied Genetics* 94:682-691.
- Jeter,C.R., Tang,W., Henaff,E., Butterfield,T., and Roux,S.J. 2004. Evidence of a novel cell signaling role for extra cellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2652–2664.
- Jiang,H., Chen,Y., Li,M., Xu,X., Wu,G. 2011. Overexpression of SGR Results in Oxidative Stress and Lesion-mimic Cell Death in Rice Seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology* 53(5):375-387.
- Jing,R.C., Knox,M.R., Lee,J.M., Vershinin,A.V., Ambrose,M., Ellis,T.H.N., and Flavell,A.J. 2005. Insertional polymorphism and antiquity of PDR1 retrotransposon insertions in *Pisum* species. *Genetics* 171:741–752
- Jing,R., Bolshakov,V.I., and Flavell,A.J. 2007. The Tagged Microarray Marker (TAM) method for high throughput detection of single nucleotide and indel polymorphisms. *Nature Protocols* 2:168–177.
- Jing,R., Vershinin,A., Grzebyta,J., Shaw,P., Smykal,P., Marshall,D., Ambrose,M.J., Ellis,T.H., and Flavell,A.J. 2010. The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology* 10:44.
- Jing,R., Ambrose,M.A., Knox,M.R., Smykal,P., Hybl,M., Ramos,A., Caminero,C., Burstin,J., Duc,G., van Soest,L.J., Swiecicki,W.K., Pereira,M.G., Vishnyakova,M., Davenport,G.F., Flavell,A.J., and Ellis,T.H. 2012. Genetic diversity in European *Pisum* germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics* 125(2):367-380.
- Jones, G. H., 1987 Chiasmata, pp. 213–244. In Moens,P.(ed.), *Meiosis*. Academic Press, New York.
- Jones,C.J., Edwards,K.J., Castiglione,S., *et al.* 1997. Reproducibility Testing of RAPD, AFLP and SSR Markers in Plants by a Network of European Laboratories. *Molecular Breeding* 3:381–390.
- Jones,J.T., and Mullet,J.E. 1995. A salt- and dehydration-inducible pea gene, Cyp15a, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases. *Plant Molecular Biology* 28(6):1055-1065.
- Jung,M., Ching,A., Bhatramakki,D., Dolan,M., Tingey,S., Morgante,M., and Rafalski,A. 2004. Linkage disequilibrium and sequence diversity in a 500-kbp region around the *adh1 locus* in elite maize germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 109:681-689.
- Kaeppler,S.M., Kaeppler,H.F., and Rhee,Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation. *Plant Molecular Biology* 43:179–188.
- Kahraman,A., Kusmenoglu,I., Aydin,N., Aydogan,A., Erskine,W., and Muehlbauer,F.J. 2003. Genetics of winter hardiness in 10 lentil recombinant inbred line populations. *Crop Science* 44:5–12.
- Kahraman,A., Kusmenoglu,I., Aydin,N., Aydogan,A., Erskine,W., and Muehlbauer,F.J. 2004. QTL mapping of winter hardiness genes in lentil. *Crop Science* 44:13–22.
- Kaiser,H. F. 1958. The Varimax Criterion for Analytic Rotation in Factor Analysis. *Psychometrika* 23:187–200.
- Kaiser,H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement* 20:141-151.
- Kaiser,H. 1970. A second generation little jiffy. *Psychometrika* 35(4): 401-415

- Kalo,P., Seres,A., Taylor,S.A., Jakab,J., Kevei,Z., Kereszt,A., Endre,G., Ellis,T.H., and Kiss,G.B. 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Molecular and Genetetics Genomics* 272:235–246
- Kalendar,R., Tanskanen,J., Immonen,S., Nevo,E., and Schulman,A. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6603–6607
- Kalendar,R. and Schulman,A.H. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1(5):2478-2484.
- Kalendar,R., Antonius,K., Smykal,P., and Schulman,A.H. 2010. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 1419–1430.
- Kalinowski,S.T. 2011. The computer program STRUCTURE does not reliably identify the main genetic clusters within species: simulations and implications for human population structure. *Heredity* 106(4):625-32.
- Kaló,P., Endre,G., Zimányi,L., Csanádi,G., and Kiss,G.B. 2000. Construction of an improved linkage map diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 100:641-657.
- Kardailsky,I.V., and Brewin,N.J. 1996. Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(8):689-695.
- Katoch,V., Sharma,S., Pathania,S., Banayal,D.K., Sharma,S.K., and Rathour,R. 2010. Molecular Mapping of pea powdery mildew resistance gene er2 to pea linkage group III. *Molecular Breeding* 25:229–237.
- Kaur,G., Kumar,S., Nayyar,H., and Upadhyaya,H.D. 2008. Cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on quantitative and qualitative components of seeds. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194(6):457-464.
- Kawahara,T., Namba,H., Toyoda,K., Kasai,T., Sugimoto,M., Inagaki,Y., Ichinose,Y., and Shiraishi,T. 2006. Induction of defense responses in pea tissues by inorganic phosphate. *Journal of General Plant Pathology* 72(3):129-136.
- Kay,D. 1979. Food legumes. Tropical Products Institute (TPI).TPI Crop and Product Digest 3:26-47.
- Kenneth,J.L. and Schmittgen,T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402-408.
- Kevei,Z., Lougnon,G., Mergaert,P., Horváth,G.V., Kereszt,A., Jayaraman,D., Zaman,N., *et al.* 2007. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 19(12):3974-3989.
- Khan,H.A., Arif,I.A., Bahkali,A.H., Al Farhan,A.H., and Al HomaidanA.A. 2008. Bayesian, Maximum Parsimony and UPGMA Models for Inferring the Phylogenies of Antelopes Using Mitochondrial Markers. *Evolutionary Bioinformatics Online* 4:263–270.
- Khlestkina,E.K. and Salina,E.A. 2006. SNP Markers: Methods of Analysis, Ways of Development, and Comparison on an Example of Common Wheat. *Russian Journal of Genetics* 42(6): 725–736.
- Kim,B.R., Nam,H.Y., Kim,S.U., Kim,S.I., and Chang,Y.J. 2003: Normalization of reverse transcripcion quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters* 25(21):1869-1872.
- Kim,H.S., and Diers,B.W. 2000. Inheritance of partial resistance to Sclerotinia root rot in soybean. *Crop Science* 40:55-61.
- Kim,S., Plagnol,V., Hu,T.T., Toomajian,C., Clark,C. *et al.*, 2007 Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 39:1151-1155.
- Kim,S.H., Yang,S.H., Kim,T.J., Han,J.S., and Suh,J.W. 2009. Hypertonic stress increased extracellular ATP levels and the expression of stress-responsive genes in arabidopsis thaliana seedlings. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73(6):1253-1256.
- Kim,S.Y., Sivaguru,M., and Stacey,G. 2006. Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiology* 142(3):984-992.

- Kimura, M., and Crow, J.F. 1963. The measurement of effective population numbers. *Evolution* 17:279-288.
- Knight, T.A. 1799. Experiments on the Fecundation of Vegetables. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 89:504-509.
- Knox, M.R., and Ellis, T.H.N. 2001. Stability and inheritance of methylation states at *PstI* sites in *Pisum*. *Mol. Genet. Genomics* 265:497-507.
- Knox, M.R. and Ellis, T.H. 2002. Excess heterozygosity contributes to genetic map expansion in pea recombinant inbred populations. *Genetics* 162(2):861-873.
- Koebner, R. and Summers, R. 2002. The impact of molecular markers on the wheat breeding paradigm. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7(2B):695-702.
- Koebner, R.M. 1995. Predigestion of DNA template improves the level of polymorphism of random amplified polymorphic DNAs in wheat. *Genetic Analysis* 12(1):63-67.
- Koebner, R.M. and Summers, R.W. 2003. 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? *Trends Biotechnol.* 21(2):59-63.
- Komatsu, S., Hiraga, S., and Yanagawa, Y. 2012. Proteomics techniques for the development of flood tolerant crops. *Journal of Proteome Research* 11(1):68-78.
- Konovalov, F., Toshchakova, E., and Gostimsky, S. 2005. A CAPS Marker Set for Mapping in Linkage Group III of Pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters* 10(1): 163–171.
- Konovalov, F.A., Toshchakova, E.V., and Gostimsky, S.A. 2009. CAPS Markers for the Identification of Garden Pea (*Pisum sativum* L.) Cultivars. *Russian Journal of Genetics* 45(2):251–254.
- Köpje, U., and Nemecek, T. 2010. Ecological services of faba bean. *Field crops Research* 115:217-233.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Annals of eugenics* 12:172-175.
- Kosterin, O.E., and Bogdanova, V.S. 2008. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:735-755.
- Kottapalli, K.R., Rakwal, R., Shibato, J., Burow, G., Tissue, D., Burke, J., Puppala, N., *et al.* 2009. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell and Environment* 32(4):380-407.
- Kovach, W.L. 1993. MVSP Plus: multivariate statistical package, version 2.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Anglesey.
- Kozhukhova, N.E., and Sivolap, Y.M. 2006. Molecular Markers in Genetics and Breeding Studies of Maize. *Tsitol Genetics* 40(5):69–80.
- Kraft, M., Dunne, B., Goulden, D., and Armstrong, S. 1998. A search for resistance in peas to *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Disease* 82:251–253.
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., and Popova, L. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 165(9):920-931.
- Krishna, T.S., Kong, X.P., Gary, S., Burgers, P.M., and Kuriyan, J. 1994. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79:1233–1243.
- Kubis, S., Schmidt, T., and Heslop-Harrison, J.S. 1998. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany* 82:45-55.
- Kubis, S.E., Castilho, M.M.F., Vershinin, A.V., and Heslop-Harrison, J.S. 2003. Retroelements, retrotransposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology* 52: 69-79.
- Kumar, A., Pearce, S.R., McLean, K., Harrison, G., Heslop-Harrison, J.S., Waugh, R., and Flavell, A.J. 1997. The Ty1-copia group of retrotransposons in plants: genomic organization, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100:205-217.

- Kumar,A, and Hirochika,H. 2001. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. Trends in Plant Sciences 6:127-134.
- Kumar,S., and Ali,M. 2006: GE interaction and its breeding implications in pulses. The Botanica 56:31-36.
- Kumar,J., Mir,R.R., Kumar,N., Kumar,A. Mohan,A., Prabhu,K.V., Balyan,H.S., and Gupta,P.K. 2010. Marker-assisted selection for pre-harvest sprouting tolerance and leaf rust resistance in bread wheat. Plant Breeding 33:145-217.
- Kumar,J., Choudhary,A.K., Solanki,R.K., and Pratap,A. 2011. Towards Marker-Assisted Selection in Pulses: A Review. Plant Breeding 130(3):297-313.
- Kunze,R., Saedler,H., and Lonning,W.E. 1997. Plant transposable elements. Advances in Botanical Research 27:331–470.
- Kuraparthi,V., Sood,S., and Gill,B.S. 2009. Molecular genetic description of the cryptic wheat-*Aegilops geniculata* introgression carrying rust resistance genes Lr57 and Yr40 using wheat ESTs and synteny with rice. Genome 52(12):1025-1036.
- Laucou,V., Haurogne,K., Ellis,N., and Rameau,C. 1998 Genetic mapping in pea.1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. Theoretical and Applied Genetics 97, 905–915.
- Ladizinsky,G. 1985. Founder effect in crop-plant evolution. Economic Botany 39:191-199.
- Lafarga,A., Delgado,J., and Eslava,V: 2005. Economic benefits of increasing the contribution of grain legumes in European agriculture shown in EU studies - Focus on Spanish results. 49-66. In: Progress in grain legume research for EU agriculture. AEL, AEP (eds.).27 October 2005. Madrid, Spain.
- Laguna,R., Ramos,A., González,M.R., Caminero,C. and Martín,J.A. 1997. El cultivo del guisante protegino. Agricultura Febrero:135-141
- Lamkey, K. R. and Lee, M. Quantitative genetics, molecular markers, and plant improvement. Imrie, B. C. and Hacker, J. B. Focused Plant Improvement: Towards Responsible and Sustainable Agriculture . 1993. Camberra, Proc. Tenth Australian Plant Breeding Conference. 18-4-1993.
- Lamprecht,H.L. 1948. Variation of linkage and the course of crossing over. Agri Hortique Genetica 6:10-48.
- Lamprecht,H. 1950. The degree of ramification in *Pisum* caused by polymeric genes. Agri Hortique Genetica 8:1-6.
- Lamprecht,H. 1952. Polymere Gene und Chromosomenstruktur bei *Pisum*. Agri Hortique Genetica 10:158-168.
- Lanaud,C., Risterucci,A.M., Pieretti,I., N’Goran,J.A.K., and Forgeas,D. 2004. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). Molecular Breeding 13:211–227
- Lande,R. and Thompson,R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. Genetics 124(3):743-756.
- Lander,E.S., Green,P. 1987. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 84(8):2363-2367.
- Lander,E.S., Green,P., Abrahamson,J., Barlow,A., Daly,M.J., Lincoln,S.E., and Newberg,L.A. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1(2):174-181.
- Langridge, P. and Chalmers, K. Techniques for marker development. Slinkard, A. E. Proc 9th Int.Wheat Genet.Symp. 1, 107-117. 1998. Univ. of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, Univ. Extension Press.
- Langridge,P., Lagudah,E., Holton,T., Appels,R., Sharp,P., and Chalmers,K. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: A review. Australian Journal of Agricultural Research 52:1043-1077.
- Lardy,G.P., Loken,B.A., Anderson,V.L., Larson,D.M., Maddock-Carlin,K.R., Ilse,B.R., Maddock,R., Leupp,J.L., Clark,R., Paterson,J.A., and Bauer,M.L. 2009. Effects of increasing field pea (*Pisum sativum*) level in high-concentrate diets on growth performance and carcass traits in finishing steers and heifers. Journal of Animal Science 87:3335–3341.

- Latzko,E., and Kelly,J. 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Physiologie Vegetale* 21:805-15.
- Lázaro,A., and Aguinalgalde,I., 2006. Genetic variation among Spanish pea landraces revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: its application to establish a core collection. *Journal of Agricultural Science* 144:53-61.
- Le May,C. 2002. Effet de la structure du couvert végétal du pois protéagineux sur le développement spatio-temporel de l'antracnose à *Mycosphaerella pinodes*. Conséquences sur l'élaboration du rendement. PhD thesis, ENSA de Rennes, Rennes, France.
- Lee,B.H., Henderson,D.A., and Zhu,J.K. 2005. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* 17(11):3155-75.
- Lee,D.L., Ellis,T.H., Turner,L., Hellens,R.P., and Cleary,W.G. 1990. A copia-like element in *Pisum* demonstrates the uses of dispersed repeated sequences in genetic analysis. *Plant Molecular Biology* 15: 707–722.
- Lehmann,A.R., and Fuchs,R.P. 2006. Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. *DNA Repair (Amst.)* 5(12):1495-1498.
- Lejeune-Hénaut,I., Bourion,V., Etévé,G., Cunot,E., Delhayé, and Desmyter,C., 1999. Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. *Euphytica* 109:201-211.
- Lejeune-Hénaut, I., Hanocq,E., Béthencourt,L., Fontaine,V., Delbreil,B., Morin,J., Petit,A., Devaux,R., Boilleau,M., Stempniak,J.J., Thomas,M., Lainé,A.L., Foucher,F., Baranger,A., Burstin,J., Rameau,C., and Giauffret,C. 2008. The flowering *locus Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 116(8):1105–1116.
- Lester,D.R., Ross,J.J., Davies,P.J., and Reid, J. B. 1997. Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3 β -hydroxylase. *Plant Cell* 9: 1435–1443.
- Leymarie,J., Bruneaux,E., Gibot-Leclerc,S., and Corbineau,F. 2007. Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *J Exp.Bot.* 58(3):425-437.
- Levitt,J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York
- Levitt,J. 1980. Chilling, freezing, and high temperature stresses. In: Responses of Plants to Environmental Stresses, vol. 1, second ed. Academic Press, New York, pp. 67-346.
- Liang,C.G., Chen,L.P., Wang,Y., Liu,J., Xu,G.L., and Li,T. 2011. High Temperature at Grain-filling Stage Affects Nitrogen Metabolism Enzyme Activities in Grains and Grain Nutritional Quality in Rice. *Rice Science* 18(3):210-216.
- Liang,Z.S., Yang,D.F., Liang,X., Zhang,Y.J., Liu,Y., and Liu,F.H. 2012. Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Reports*, 31(5):873-883.
- Liesenfeld,D.R., Auld,D.L., Murray,G.A., and Swensen,J.B. 1986. Transmittance of winterhardiness in segregated populations of peas. *Crop Science* 26:49–54
- Lincoln,S., Daly,M., and Lander,E. 1992 Constructing Genetic Maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3rd edition.
- Lincoln,S.E. and Lander,E.S. 1992. Systematic detection of errors in genetic linkage data. *Genomics* 14(3):604-610.
- Link,W., Dixens,C., Singh,M., Schwall,M., and Melchinger,A.E. 1995 Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:27-32.
- Linnaeus,C. 1753. 'Species Plantarum'. Lars Salvius.
- Liu,C.J., Witcombe,J.R., Pittaway,T.S., Nash,M., Busso,C.S., and Gale,M.D. 1994. An RFLP-based genetic map of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Theoretical and Applied Genetics* 89:481-487.
- Liu,B., and Wendel,J.F. 2000. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome Research* 14:860–869.

- Liu,H.T., Liu,Y.Y., Pan,Q.H., Yang,H.R., Zhan,J.C., and Huang,W.D. 2006. Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP 2-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Experimental Botany* 57(12):3337-3347.
- Liu,L., White,M., and MacRae,T. 2002. Identification of ultraviolet-B responsive genes in the pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell Reports* 20(11):1067-1074.
- Liu,W., Yang,Y.S., Francis,D., Rogers,H.J., Li,P., and Zhang,Q. 2008. Cadmium stress alters gene expression of DNA mismatch repair related genes in *Arabidopsis* seedlings. *Chemosphere* 73(7):1138-1144.
- Liu,X.M., Smith,C.M., Gill,B.S., and Tolmay,V. 2001. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102:504-510.
- Lombard,V., and Delourme,R. 2001. A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): Construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 491–507.
- López,M.M., Llop,P., Olmos,A., Marco-Noales,E., Cambra,M., and Bertolini,E. 2008. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Current Issues in Molecular Biology* 11:13-46.
- Loridon,K., McPhee,K., Morin,J., Dubreuil,P., Pilet-Nayel,M.L., Aubert,G., Rameau,C., Baranger,A., Coyne,C., Lejeune-Hénaut,I., and Burtin,J. 2005. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111:1022–1031
- Losey,J.E., Rayor,L.S., and Carter,M.E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399(6733):214.
- Lu,C., Shen,L., He,P., Chen,Y., Zhu,L., Tan,Z., and Xu,Y. 1997. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 94(1):145-150.
- Lu,H. and Bernardo,R. 2001. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. *Theoretical and Applied Genetics* 103:613-617.
- Lu,H.Y., Liu,Z.X., Liu,B.Z., Saito,Y., and Berne,S. 2000. Millennial-scale variability of the Kuroshio Current for the last 20000 a in Okinawa Trough. *Acta Oceanologica Sinica* 22:211-219.
- Lu,J., Knox,M.R., Ambrose,M.J., Brown,J.K.M., and Ellis T.H.N. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1103–1111.
- Lundmark,M., Cavaco,A.M., Trevanion,S., and Hurry,V. 2006. Carbon partitioning and export in transgenic *Arabidopsis thaliana* with altered capacity for sucrose synthesis grown at low temperature: A role for metabolite transporters *Plant, Cell and Environment* 29 (9):1703-1714.
- Ma,H., Song,L., Shu,Y., Wang,S., Niu,J., Wang,Z., Yu,T., *et al.* 2012. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes. *Journal of Proteomics* 75(5):1529-1546.
- Ma,K.H., Kim,N.S., Lee,G.A., Lee,S.Y., Lee,J.K., Yi,J.Y., Park,Y.J., Kim,T.S., Gwag,J.G., and Kwon,S.J. 2009. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119(7):1247-1254.
- Mabrouk,Y., Simier,P., Delavault,P., Delgrange,S., Sifi,B., Zourgui,L., Belhadj,O. 2007. Molecular and biochemical mechanisms of defence induced in pea by *Rhizobium leguminosarum* against *Orobanche crenata*. *Weed Research* 47(5):452-460.
- Maciejewska,U., and Bogatek,R. 2002. Glucose catabolism in leaves of cold-treated winter rape plants. *Journal of Plant Physiology* 159(4):397-402.
- Maggio,A., Barbieri,G., Raimondi,G., and Pascale,S.D. 2010. Contrasting effects of GA3 treatments on tomato plants exposed to increasing salinity. *Journal of Plant Growth Regulation* 29:63-72.
- Mahajan,S., and Tuteja,N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139–158
- Mahfoozi,S., Limin,A.E., and Fowler,D.B. 2001. Developmental regulation of low-temperature tolerance in winter wheat. *Annals of Botany* 87:751–757.

- Mahler, R.L., Saxena, M.C. and Aeschlimann, J. 1988. Soil fertility requirements of pea, lentil, chickpea and faba bean. pp.279-289. In: R.J. Summerfield (ed.), *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Makasheva, R.K. 1983. *The Pea*. Oxonian Press. Calcuta. New Delhi.
- Makasheva, R.K. 1984. *The pea*. Balkema, A.A., Rotterdam.
- Malhotra, R.S., and Singh, K.B. 1990. The inheritance of cold tolerance in chickpea. *Journal of Genetics and Breeding* 44:227-230.
- Malyshev, S.V. and Kartel', N.A., 1997. Molecular Markers in Genetic Mapping of Plants. *Molecular Biology* 31(2):197-208.
- Manel, S., Brthier, P., and Luikart, G. 2002. Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* 16:650-659.
- Manninen, O., Kalendar, R., Robinson, J., and Schulman, A.H. 2000. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular and General Genetics* 264: 325-334.
- Mar, J.C., Wells, C.A., and Quackenbush, J. 2011. Defining an informativeness metric for clustering gene expression data. *Bioinformatics* 27(8):1094-1100.
- Markarian, D. and R.L. Andersen. 1966. The inheritance of winter hardiness in *Pisum*. I. *Euphytica* 15:102-110.
- Martí, M.C., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbó, M., Lázaro, J.J., Sevilla, F., and Jiménez, A. 2011. Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany* 62(11):3863-3874.
- Martin, J. 1990. Guisante proteaginoso. *Agricultura Febrero*:120-121.
- Martin, C., and Smith, A.M. 1995. Starch biosynthesis. *Plant Cell* 7:971-985.
- Martin, A., Lee, J., Kichey, T., Gerentes, D., Zivy, M., Tatout, C., Dubois, F., Balliau, T., Valot, B., Davanture, M., *et al.* 2006. Two glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* 18:3252-3274.
- Martin-Sanz, A., Caminero, C., Jing, R., Flavell, A.J., and Perez de la Vega, M. 2011. Genetic diversity among Spanish pea (*Pisum sativum* L.) landraces, pea cultivars and the World *Pisum* sp. core collection assessed by retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIPs). *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(1):166-178.
- Martín-Sanz, A., de la Vega, M.P., Murillo, J., and Caminero, C. 2013. Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from Pea Are Phylogenetically and Pathogenically Diverse. *Phytopathology* 103(7):673-81.
- Martínez-Villaluenga, C., Gulewicz, P., Frías, J., Gulewicz, K., y Vidal-Valverde, C. 2008. Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect on germination. *European Food Research and Technology* 226: 1465-1478.
- Martins, J.M., Riottot, M., de Abreu, M.C., Lança, M.J., Viegas-Crespo, A.M. Almeida, J.A., Freire, J.B., Bento, O.P. 2004. Dietary raw peas (*Pisum sativum* L.) reduce plasma total and LDL cholesterol and hepatic esterified cholesterol in intact and ileorectal anastomosed pigs fed cholesterol-rich diets. *Journal of Nutrition* 134(12):3305-12.
- Marx, G.A., Schroeder, W.T., Provvidenti, R., and Mishanec, W. 1972. A genetic study of tolerance in pea (*Pisum sativum* L.) to *Aphanomyces* root rot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97:619-621.
- Mathieu-Rivet, E., Gévaudant, F., Sicard, A., Salar, S., Do, P.T., Mouras, A., Fernie, A.R., *et al.* 2010. Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *Plant Journal* 62(5):727-741.
- Maxted, N. and Ambrose, N. Peas (*Pisum* L.) Chapter 10. 2000. Maxted, N. and Bennett, N. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. Pp. 181-190.

- McCallum, J., Timmerman-Vaughan, G., Frew, T., Russell, A., 1997. Biochemical and genetic linkage analysis of green seed color in field pea. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 218–225.
- McCallum, I.W., Newell, L.E., Cruz-Suarez, D., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Davis, A., Thiessen, D., Campbell, L., Meyer-Willerer, A.O., Phillips, C., and Hickling, D. 2000. Uso de arvejón (feed pea, chicharo) *Pisum sativum* en alimentos para camarones (*Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) y trucha (*Orcorhynchus mykiss*). *Advances en Nutrición Acuicola V, Memorias del Quinto Symposium, Internacional de Nutrición. Mérida, Yucatán, Mexico.*
- McClendon, M.T., Inglis, D.A., McPhee, K.E. and Coyne, C.J. 2002. DNA markers linked to Fusarium wilt race 1 resistance in pea. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:602–607.
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y., Huang, N., Ishii, T., and Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35: 89–99.
- McPhee, K. 2005. Garden Pea, *Journal of New Seeds* 6(2-3):277-288.
- McPhee, K., Inglis, D., Gundersen, B., and Coyne, C.J. 2012. Mapping QTL for Fusarium wilt Race 2 partial resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Breeding* 131(2):300-306.
- Menancio-Hautea, D., Fatokum, C.A., Kumar, L., Danesh, D., and Young, N.D. 1993. Comparative genome analysis of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walpers) using RFLP mapping data. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 797–810.
- Mendel, J.G. 1865. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verh. Naturforsch. Ver. Brunn* 4:3-47.
- Mendel, G. 1866. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn* 4:3-47.
- Menéndez, C.M., Hall, A.E., and Gepts, P., 1997. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95:1210-1217.
- Metais, I., Hamon, B., Jalouzot, R., and Peltier, D. 2012. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1346-1352.
- Michaelson, M.J., Price, H.J., Ellison, J.R. and Johnston, J.S. 1991. Comparison of plant DNA contents determined by feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *American Journal of Botany* 78: 183 –188.
- Michelmore, R., 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 33: 393–427.
- Michener, C.D., and Sokal, R.R. 1957. A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution* 11:490-499.
- Minhas, D., and Grover, A. 1999. Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Science* 146(1):41-51.
- Mishra, S., Sanyal, I., Amla, D.V. 2012. Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. *Biologia Plantarum* 56(4):613-619.
- Mo, E.K., Sung, C.K. 2006. The effect of phenylethyl alcohol on PAL mRNA and enzyme activity in strawberries. *Postharvest Biology and Technology* 42(3):290-292.
- Mo, H., and Pua, E.C. 2002. Upregulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiologia Plantarum* 114:439-49.
- Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129:665-679.
- Monti, L., Biddle, A.J., Moreno, M.T., and Plancquaert, P. 1994. Biotic and abiotic stresses of pulse crops in Europe. In: Muehlbauer, F.J., and Kaiser, W.J. (eds), *Expanding the production and use of cool season food legume.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 204–217
- Morgante, M. Salaminiz, K. 2003. From plant genomics to breeding practice. *Current Opinion in Biotechnology* 14:214–219.

- Morrell,P.L., and Clegg,M.T. 2007. Genetic evidence for a second domestication of barley (*Hordeum vulgare*) east of the Fertile Crescent Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:3289-3294.
- Morton,R.L., Ellery,A.J., and Higgins,T.J.V. 1998. Downstream elements from the pea albumin 1 gene confer sulfur responsiveness on a reporter gene. *Molecular and General Genetics* 259:309-316
- Muehlbauer,F.J. 1991. Incorporation of useful characters from germplasm resources into cultivars of food legumes. In: Smith, A., and Robertson,R.S. (eds.), *Legume Genetic Resources in the Semi-Arid Temperate Environments*. ICARDA, Aleppo, Syria. pp. 363-393.
- Muehlbauer,F.J., and Kaiser,W.J. 1994. Using host plant resistance to manage biotic stresses in cool season food legumes. 1994. p. 233-246. In: Muehlbauer,F.J., and Kaiser,W.J. (eds.), *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Mullineaux,P.M., and Rausch,T. 2005. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research* 86(3):459-474.
- Munier-Jolain,N., and Carrouee,B. 2003. Considering pea in sustainable agriculture: agricultural and environmental arguments. *Cahiers Agricultures* 12(2): 111-120.
- Munier-Jolain,N., Biarnès,V., Chaillet,I., Lecoer,J., Jeuffroy,M.H., Benoît Carrouée , Crozat,Y., Guilioni,L., Lejeune,I. and Tivoli,B. 2010. *Physiology of the Pea Crop*. CRC Press. Enfield, NH.
- Murphy,L.D., Herzog,C.E., Rudick,J.B., Fojo,A.T., and Bates,S.E. 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry* 29:10351-10356.
- Murray,G.A., and Swensen,J.B. 1991. Winterhardiness in pea. *Pisum Genetics* 23:4-13.
- Murray,G.A., Eser,D., Gusta,L.V.,and Etévé,G., 1988. Winterhardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In: Summerfield,R.J. (Ed.), *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.831-843.
- Murray,M.G., and Thompson,W.F. 1982. Repeat sequence interspersion in coding DNA of peas does not reflect that in total DNA. *Plant Molecular Biology* 1: 143–153.
- Nadal,S.,Moreno,M.T. and Cubero,J.I. 2004. *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa.
- Naidu,S.L., and Long,S.P. 2004. Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: An in vivo analysis. *Planta* 220(1):145-155.
- Nandi,S., Subudhi,P.K., Senadhira,D., Manigbas,N.L., Sen-Mandi,S., and Huang,N. 1997. Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol.Gen.Genet.* 255(1):1-8.
- Narvel,J.M., Fehr,W.R., Chu,W., Grant,D., and Shoemaker,R.C. 2000. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. *Crop Science* 40:1452-1458.
- Nasiri,J., Haghazari,A., and SabaJ. 2009. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on SSR markers. *African Journal of Biotechnology* 8(15):3405-3417.
- Nayyar,H., Kaur,G., Kumar,S., and Upadhyaya,H.D. 2007. Low temperature effects during seed filling on chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.): Probing mechanisms affecting seed reserves and yield. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193(5):336-344.
- Nei,M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:283-292.
- Nei,M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(12): 3321-3323.
- Nei,M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 76: 379-390.
- Nemecek,T, von Richthofen,J.S., Dubois,G., Casta,P, Charles,R., and Pahl,H. 2008. Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy* 28: 380-393.

- Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., and Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56(421):2907-2914.
- Nilsson, N.O., Sall, T., and Bengtsson, B.O. 1993. Chiasma and recombination data in plants: are they compatible? *Trends Genet.* 9(10):344-348.
- Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y., and Shigeoka, S. 2008. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant Signaling and Behavior* 3(11):1016-1028.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., and Foyer, C.H. 2012. Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant, Cell and Environment* 35(2):454-484.
- Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A., Chin, J.E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Gazdar, A.F., Willman, C.L., Griffith, B., Von-Hoff, D.D., and Robinson, I.B. 1990. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:7160-7164.
- Nordborg, M., Borevitz, J.O., Bergelson, J., Berry, C.C., Chory, J., *et al.*, 2002 The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 30:190-193.
- Novák, K., Lisá, L., Škrdleta, V. 2004. Rhizobial nod gene-inducing activity in pea nodulation mutants: Dissociation of nodulation and flavonoid response. *Physiologia Plantarum* 120(4):546-555.
- Nybohm, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol.Ecol.* 13(5):1143-1155.
- O’Kane, F.E., Happe, R.P., Vareijken, J.A., Gruppen, H., and van Boekel, M.A.J.S. 2004. Characterization of pea vicilins. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3149-3154.
- O’Leary, M.H. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist’s view. *Annual Review of Plant Biology* 33:297-315.
- Ohlsson, A.B., and Berglund, T. 2001. Gibberellic acid-induced changes in glutathione metabolism and anthocyanin content in plant tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64(1):77-80.
- Oldach, K.H., Becker, D., and Lorz, H. 2001. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol.Plant Microbe Interact.* 14(7):832-838.
- Olien, C.R. 1967. Freezing stresses and survival. *Annual Review of Plant Physiology* 18:387-408.
- Olson, M., Hood, L., Cantor, C., and Botstein, D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245(4925):1434-5.
- Osterberg, M.K., Shavorskaya, O., Lascoux, M., and Lagercrantz, U. 2002. Naturally occurring indel variation in the *Brassica nigra* COL1 gene is associated with variation in flowering time. *Genetics* 161(1):299-306.
- Ogawa, K. 2005. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxidants and Redox Signaling* 7(7-8):973-981.
- Ovtsyna, A.O., Dolgikh, E.A., Kilanova, A.S., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., and Staehelin, C. 2005. Nod factors induce Nod factor cleaving enzymes in pea roots. Genetic and pharmacological approaches indicate different activation mechanisms. *Plant Physiology* 139(2):1051-1064.
- Ozias-Akins, P. and van Dijk, P.J. 2007. Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annual Review of Genetics* 41:509-537.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- Page, D., Aubert, G., Duc, G., Welham, T., and Domoney, C. 2002. Combinatorial variation in coding and promoter sequences of genes at the *Tri* locus in *Pisum sativum* accounts for variation in trypsin inhibitor activity in seeds. *Mol Genet Genomics* 267(3):359-369.

- Pan,A., Hayes,P.M., Chen,F., Chen,T.H.H., Blake,T., Wright,S., Karsai,I., and Bedo,Z. 1994. Genetic-analysis of the components of winterhardiness in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 89:900–910.
- Panda,S.K., and Matsumoto,H. 2010. Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. *BioMetals* 23(4):753-762.
- Pandey,M., Wagner,C., Friedt,W., Ordon,F. 2006. Genetic relatedness and population differentiation of Himalayan hullless barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces inferred with SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 113:715-729.
- Pandey,N., Gupta,B., Pathak,G.C. 2012. Antioxidant responses of pea genotypes to Zinc deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology* 59(2):198-205.
- Pandey, S., Ranade, S.A., Nagar, P.K., Kumar, N. 2000. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Biosciences* 25(3):291-299.
- Paran,I., Goldman, I. Tanksley,S.D., and Zamir,D. 1995 Recombinant inbred lines for genetic mapping in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 542–548.
- Paran,I., Horowitz,M., Zamir,D., and Wolf,D. 2012. Random amplified polymorphic DNA markers are useful for purity determination of tomato hybrids. *HortScience* 30(2):377.
- Paredes,M. and Gepts,P. 1995. Extensive introgression of Middle American germplasm into Chilean common bean. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42:29-41.
- Paterson,A.H., Bowers,J.E., Burow,M.D., Draye,X., Elsik,C.G., Jiang,C.X., Katsar,C.S., Lan,T.H., Lin,Y.R., Ming,R. *et al.* 2000. Comparative genomics of plant chromosomes. *Plant Cell* 12: 1523–1540
- Parzysz,H. and Przybylska,J. 1984. Isoenzyme Variation in the Genus *Pisum* II. Electrophoretic Patterns of Alcohol Dehydrogenase and Isocitrate Dehydrogenase from Cotyledons of Ungerminated Seeds. *Genetica Polonica* 25:255-260.
- Pavlova,Z.B., Dobrodumova,V.V., Kravchenko,L.V., and Lutova,L.A. 2000. Characterization of pea symbiotic mutants for traits related to hormonal status. *Russian Journal of Genetics* 36(6) :56-60.
- Peng,H., Feng,Y., Zhang,H., Wei,X., and Liang,S. 2011. Molecular Cloning and Characterisation of Genes Coding for Glycine- and Proline-Rich Proteins (GPRPs) in Soybean. *Plant Molecular Biology Reporter* 30(3):1-12.
- Peres-Neto,P.R., Jackson,D.A., and Somers,K.M. 2005. How Many Principal Components? Stopping Rules for Determining the Number of Non-trivial Axes Revisited. *Computational Statistics and Data Analysis* 49:974-997.
- Pérez,P., Morcuende,R., Martín del Molino,I., Sánchez de la Puente,L., and Martínez-Carrasco, R., 2001. Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clovers. *Plant Physiology* 112:478–486.
- Pearce,S.R., Harrison,G., Li,D., Heslop-Harrison,J.S., Kumar,A., and Flavell,A.J. 1996. The Ty1-copia group of retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Molecular and General Genetics* 205:305–315.
- Pearce,S.R., Stuart-Rogers,C., Knox,M.R., Kumar,A., Ellis,T.H.N., and Flavell,A.J. 1999. Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. *Plant Journal* 19: 711–717.
- Pearce,R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* 29:47–76.
- Pearce,S.R., Knox,M., Ellis,T.H.N., Flavell,A.J., and Kumar,A. 2000. Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. *Mol.Gen.Genet.* 263(6):898-907.
- Pearson,K. 1906. 'Walter Frank Raphael Weldon 1860–1906: A Memoir Reprinted from *Biometrika*'. Cambridge University Press.
- Peck,S.C., and Kende, H. 1998. Differential regulation of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in etiolated pea seedlings: Effects of indole-3-acetic acid, wounding, and ethylene. *Plant Molecular Biology* 38(6):977-982.

- Pelleschi,S., Guy,S., Kim,J.Y., Pointe,C., Mahé,A., Barthes,L., Leonardi,A., and Prioul,J.L. 1999. Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Molecular Biology* 39:373–380
- Pelsy,F. 2007. Untranslated leader region polymorphism of Tv1, a retrotransposon family, is a novel marker useful for analyzing genetic diversity and relatedness in the genus *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* 116(1):15-27.
- Peng,J., Richards,D.E., Moritz,T., Cano-Delgado,A., and Harberd,N.P. 1999. Extragenic suppressors of the *Arabidopsis* gai mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* 119(4):1199-1208.
- Perez-Amador,M.A., Leon,J., Green,P.J., and Carbonell,J. 2002. Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130:1454-1463.
- Pérez de la Vega,M., García,P., Sáenz de Miera,L.E., and Vences,F.J., 1994. Genetic diversity in inbreeding species. Proc Eucarpia Genetic Resource Section Meeting. Balfourier,F., and Perretant,M.R. (eds). Clermont-Ferrand. pp 83-90.
- Perera,L., Russell,J.R., Provan,J., and Powell,W., 2000. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome* 43(1):15-21.
- Peters,J.L., Cnudde,F., and Gerats,T. 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends in Plant Science* 8:484–491.
- Petit,J., Bourgeois,E., Stenger,W., Bes,M., Droc,G., Meynard,D., Courtois,B., Ghesquiere,A., Sabot,F., Panaud,O., and Guiderdoni,E. 2009. Diversity of the Ty-1 copia retrotransposon Tos17 in rice (*Oryza sativa* L.) and the AA genome of the *Oryza* genus. *Mol.Genet.Genomics* 282(6):633-652.
- Pfaffl,M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9):2002-2007.
- Pfaff,T., and Kahl,G. 2003. Mapping of gene-specific markers on the genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 269:243–251.
- Pflieger,S., Lefebvre,V., Caranta,C., Blattes,A., Goffinet,B., and Palloix,A. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper/pathogen interactions. *Genome* 42:1100–1110
- Philips, R. L. and Vasil, I. K. DNA-based markers in plants. Philips, R. L. and Vasil, I. K. DNA-based markers in plants. 497. 2001. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. Ref Type: Book Chapter
- Phillips,R.L. 2006. Genetic tools from nature and the nature of genetic tools. *Crop Science* 46:2245-2252.
- Pilet-Nayel,L., Muehlbauer,F.J., McGee,R.J., Kraft,J.M., Baranger,A., and Coyne,C. J. 2002. Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theoretical and Applied Genetics* 106:28-39.
- Polans,N.O., and Saar,D.E. 2000. ITS sequence variation in wild species and cultivars of pea. *Pisum Genetics* 32: 42-45.
- Polhill, R. M. and Van der Maesen, L. J. G. Taxonomy of grain legumes. Summerfield, R. J. and Roberts, E. H. Grain Legume Crops. 2012. London, UK, Collins.
- Pollock,C.J., and Lloyd,E.J., 1987. The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. *Annals of Botany* 60:231-235.
- Posvec,Z, and Griga,M, 2000. Utilization of isozyme polymorphism for cultivar identification of 45 commercial peas (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 113:251–258.
- Potokina,E., Caspers,M., Prasad,M., Kota,R., Zhang,H., Sreenivasulu,N., Wang,M., Graner,A. 2004. Functional association between malting quality trait components and cDNA array based expression patterns in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding* 14:153–170
- Podani,J. 1994. Multivariate data analysis in ecology and systematics. SPB Academic Publishing bv., The Hague.

- Prasad,T.K. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal* 10:1017–1026.
- Prasad,M., Varshney,R.K., Roy,J.K., Baylan,H.S., and Gupta,P.K. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100:584-592.
- Price,J., Laxmi,A., St Martin,S.K., and Jang,J.C. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2128-2150.
- Prieur,R., and Cousin,R. 1978. Contribution to establishing a technique for selecting for cold resistance in winter pea. *Annales de F Amelioration des Plantes* 28: 57-63.
- Prioul,S., Frankewitz,A., Deniot,G., Morin,G, and Baranger,A. 2004. Mapping of quantitative trait *loci* for partial resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.), at the seedling and adult plant stages. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1322–1334.
- Prioul-Gervais,S., Deniot,G., Receveur,E.M., Frankewitz,A., Fourmann,M., Rameau,C., Pilet-Nayel,M.L., and Baranger,A. 2007. Candidate genes for quantitative resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 114(6):971-84.
- Pritchard,J.K., and Donnelly,P. 2001. Case– control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology* 60: 227–237.
- Pritchard,J.K., and Wen,W. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Version 2. Disponible en: <http://pritch.bsd.uchicago.edu>.
- Pritchard,J.K., Stephens,P., and Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945 – 959.
- Puchta,H., and Hohn,B. 1996 From centiMorgans to base pairs: homologous recombination in plants. *Trends in Plant Science* 1: 340–348.
- Qi,X.Q., Stam,P. and Lindhout,P. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome* 39:379-394.
- Qi,X., Niks,R.E., Stam,P., and Lindhout,P. 1998. Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 96:1205-1215.
- Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2N = 40. O'Brien, S. J. *Genetic Maps*. 149-156. 1993. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Rameau,C., Denoué,D., Fraval,F., Haurongé,K., Josserand,J., Laucou,V., Batge,S., and Murfet,I.C. 1998. Genetic mapping in pea. 2. Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture. *Theoretical and Applied Genetics* 97:916–928.
- Ramos,A. 1996. El guisante. In: *El cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León*. Franco,F. and Ramos,A (ed.). Junta de Castilla y León. Consejería de agricultura y ganadería. pp 77-140.
- Ramsey,J. and Schemske,D.W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:589-639.
- Reddy,M.R.K., Rathour,R., Kumar,N., Katoch,P., and Sharma,T.R. 2010. Cross-genera legume SSR markers for analysis of genetic diversity in *Lens* species. *Plant Breeding* 129(5):514–518.
- Rees,H., and Narayan,R.K.J. 1988 Chromosome constraints: chiasma frequency and genome size, pp. 231–239. In Brandham,P.E.(ed.), *Kew Chromosome Conference III*. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Reinprecht,Y., Poysa,V.W., Yu,K., Rajcan,I., Ablett,G.R., and Pauls,K.P. 2006. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm. *Genome* 49(12):1510-1527.
- Remington,D.L., Thornsberry,J.M., Matsuoka,Y., Wilson,L.M., Whitt,S.R., Doebley,J., Kresovich,S., Goodman,M.M., and Buckler,E.S. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the

- maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11479-11484.
- Ren,X., Wang,X., Yuan,H., Weng,Q., Zhu,L., and He,G. 2004. Mapping quantitative trait *loci* and expressed sequence tags related to brown planthopper resistance in rice. *Plant Breeding* 123:342–348.
- Ribaut,J.M., Hu,X., Hoisington,D., and Gonzalez-De-Leon,D. 1997. Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in marker-assisted selection backcross scheme. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 156–164.
- Ribaut,J.M., and Betran,J. 1999. Single large-scale marker-assisted selection (SLS-MAS). *Molecular Breeding* 5:531–541.
- Ribaut,J.M., and Hoisington,D. 1998. Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Trends in Plant Science* 3: 236–239.
- Ribaut,J.M., Monneveux,P., Glaszman,J.C., Leung,H., Van Hintum,T., de Vicente,C. 2008. International programs and the use of modern biotechnologies for crop improvement plant genetics and genomics: crops and models. *Genomics of Tropical Crop Plants* 1:21–61.
- Rispail,N, Dita,M.A., González-Verdejo,C.I., Pérez-de-Luque,A., Castillejo,M.A., Prats,E., *et al.* 2007. Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New Phytology* 173:703–712.
- Rivera-Becerril,F., Van Tuinen,D., Martin-Laurent,F., Metwally,A., Dietz,K.J., Gianinazzi,S., and Gianinazzi-Pearson,V. 2005. Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16(1):51-60.
- Robertson,D.S. 1985. A possible technique for isolating genic DNA for quantitative traits in plants. *Journal of Theoretical Biology* 117:1–10.
- Rodríguez-Serrano,M., Romero-Puertas,M.C., Zabalza,A., Corpas,F.J., Gómez,M., Del Río,L.A., and Sandalio,L.M. 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment* 29(8):1532-1544.
- Rolletschek,H., Borisjuk,L., Koschorreck,M., Wobus,U., and Weber,H. 2002a. Legume embryos develop in a hypoxic environment. *Journal of Experimental Botany* 53(371):1099-1107.
- Rolletschek,H., Hajirezaei,M., Wobus,U., and Weber,H. 2002b. Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars, causes higher uptake of water and amino acids which leads to higher protein content. *Planta* 214: 954-964.
- Rolletschek,H., Borisjuk,L., Radchuk,R., Miranda,M., Heim,U., Wobus,U. and Weber,H. 2004. Seed-specific expression of a bacterial phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* increases protein content and improves carbon economy. *Plant Biotechnology Journal* 2:211-219.
- Rongwen,J., Akkaya,M.S., Bhagwat,A.A., Lavi,U., and Cregan,P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics* 90:43-48.
- Rosche,E., Blackmore,D., Tegeder,M., Richardson,T., Schroeder,H., Higgins,T.J., Frommer,W.B., Offler,C.E., and Patrick,J.W. 2002. Seed-specific overexpression of a potato sucrose transporter increases sucrose uptake and growth rates of developing pea cotyledons. *Plant Journal* 30:165-175.
- Rosche,E., Blackmore,D., Offler,C.E., and Patrick,J.W. 2005. Increased capacity for sucrose uptake leads to earlier onset of protein accumulation in developing pea seeds. *Functional Plant Biology* 32:997-1007.
- Rosenberg,N.A., Burke,T., Elo,K, Feldman,M.W., Freidlin,P.J. *et al.* 2001. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* 159: 699 –713.
- Roux,S.J., and Steinebrunner,I. 2007. Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends in Plant Science* 12:522–527.
- Roy Davies,D. 1995. *Pisum sativum* (Leguminosae-Papilionoideae). In: *Evolution of crop plants*. Smartt,J. and Simmonds,N.W. (eds.) 294-296. Logman Group, Harlow, Essex.

- Rozov,S.M., Kosterin,O., Borisov,A.Y., and Tsyganov,V. 1999. The history of the pea gene map: last revolutions and the new symbiotic genes. *Pisum Genetics* 31:55-57.
- Rubiales,D., Fernández-Aparicio,M., Pérez-de-Luque,A., Castillejo,M.A., Prats,E., Sillero,J.C., Risipail,N., and Fondevilla,S. 2009a. Breeding approaches for crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) management in pea (*Pisum sativum* L.). *Pest Management Science* 65(5):553-559.
- Rubiales,D., Fernández-Aparicio,M., Moral,A., Barilli,E., Sillero,J.C., and Fondevilla,S. 2009b. Disease resistance in pea (*Pisum sativum* L.) types for autumn sowings in Mediterranean environments - a review. *Czech Journal of Genetics and Plant-Breeding* 45:135-142.
- Rubiales,D.,Ambrose,M.J., Domoney, C., and BurstinJ. 2011. Chapter 1: Pea (*Pisum sativum* L.). En: *Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes*. Perez de la Vega, M., Torres A.M., Cubero,I.J., and Kole,C. (eds.)1-49. CRC Press, Science Publishers, Enfield.
- Ruelland,E., Vaultier,M.N., Zachowski,A., and Hurry,V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* 49:35–150.
- Ruiz-Lozano,J.M., Roussel,H., Gianinazzi,S., and Gianinazzi-Pearson,V. 1999. Defense genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and Rhizobium sp. in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(11):976-984.
- Russel,J.R., Fuller,J.D., Macauley,M., Hatz,B.G., Jagoor,A., Powell,W., and Waugh,R. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accession detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95:714-722.
- Russel,J.R., Ellis,R.P., Thomas,W.T.B., Waugh,R., Provan,J., and Booth,A. 2000. A retrospective analysis of spring barley germplasm development from 'foundation genotypes' to currently successful cultivars. *Molecular breeding* 6:553-568.
- Saccardy,K., Cornic,G., Brulfert,J., and Reyss,A. 1996. Effect of drought stress on net CO₂ uptake by Zea leaves. *Planta* 199(4):589-595.
- Saeidi-Sar,S., Khavari-Nejad,R., Fahimi,H., Ghorbanli,M., and Majd,A. 2007. Interactive effects of gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in Glycine max seedlings under nickel stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:74-79.
- Saénz de Miera,L.E. 1995. Genes de vicilinas en el género Lens: número, estructura y evolución. Tesis doctoral, Universidad de León.
- Saénz de Miera,L.E., y Pérez de la Vega,M. 1998. A comparative study of vicilin genes in Lens: negative evidence of concerted evolution. *Molecular Biology and Evolution* 15: 303–311.
- Saénz de Miera,L.E., y Pérez de la Vega,M. 2001. Evidence that the N-terminal extension of the Viciae convicilin genes evolved by intragenic duplications and trinucleotide expansions. *Genome*, 44: 1022–1030.
- Saénz de Miera,L.E., Ramos,J. y Pérez de la Vega,M. 2001. A comparative study of convicilin storage protein gene sequences in species of the tribe Viciae. *Genome* 51: 511–523.
- Saitou,N., y Nei,M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sakai,A., y Larcher,W. 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *Ecological Studies* 62, Springer-Verlag, Berlin, 321 p
- Sakar,D., Durutan,N., and Meyveci,K. 1988. Factors which limit the productivity of cool season food legumes in Turkey. In: Summerfield, R.J. (ed.) *World Crops: Cool Season food legumes*. Kluwer, The Netherlands, 137-146.
- Sakuraba,Y., Schelbert,S., Park,S.Y., Han,S.H., Lee B.D., Andrès,C.B., Kessler,F., *et al.* 2012. STAY-GREEN and chlorophyll catabolic enzymes interact at light-harvesting complex II for chlorophyll detoxification during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* 24(2):507-518.
- Saliba-Colombani,V., Causse,M., Gervais,L., and Philouze,J. 2000. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP Markers for the Construction of an Intraspecific Map of the Tomato Genome. *Genome* 43(1):29–40.

- Salinas,J., Matassi,G., Montero,L.M., Bernardi,G. 1988. Compositional compartmentalization and compositional patterns in the nuclear genomes of plants. *Nucleic Acid Research* 16: 4269-4285.
- Samec,P., and Našinec,V. 1995. Detection of DNA polymorphism among pea cultivars using RAPD technique. *Biology Plantarum* 37: 321-327.
- Samec,P., Posvec,Z., Stejskal,J., Nasinec,V., Griga,M. 1998. Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isozymes. *Biology Plantarum* 41: 39-48.
- Sandalio,L.M., Dalurzo,H.C., Gómez,M., Romero-Puertas,M.C., and Del Río,L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52(364):2115-2126.
- SanMiguel,P., and Bennetzen,J.L. 1998. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany* 82:37-44.
- Santalla,M., Amurrio,J.M., De Ron,A. M. 2001. Food and feed potential breeding value of green, dry and vegetable pea germplasm. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 601-610.
- Sanchez,H., Siahpoosh,M.R., Roessner,U., Udvardi,M., and Kopka,J. 2008. Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. *Physiologia Plantarum* 132:209-219.
- Sánchez,R., Flores,A., and Cejudo,F.J. 2006. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta* 223(5):901-909.
- Sarikamiş G, Yanmaz R, Ermiş S, Bakir M, and C Yüksel. 2010. Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. *Genetics and Molecular Research* 9(1):591-600.
- Sarkar,R.K., Panda,D., Reddy,J.N., Patnaik,S.S.C., Mackill,D.J., and Ismail,A.M. 2009. Performance of submergence tolerant rice (*Oryza sativa*) genotypes carrying the Sub1 quantitative trait locus under stressed and non-stressed natural field conditions. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 79:876-883.
- Savitch,L.V., Gray,G.R., and Huner,N.P.A., 1997. Feedbacklimited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. *Planta* 201:18-26.
- Sax,K. 1923. The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8(6):552-560.
- Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W., and Brown,P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270(5235):467-70.
- Saxena,R.K., Prathima,C., Saxena,K.B., Hoisington,D.A., Singh,N.K.n and Varshney,R.K. 2010: Novel SSR Markers for polymorphism detection in pigeon pea (*Cajanus* spp.). *Plant Breeding* 129:142-148.
- Scherer,H.W., Pacyna,S., Spoth,K.R., and Schulz,M. 2008. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biology and Fertility of Soils* 44(7):909-916.
- Schmid,K.J., Sørensen,T.R., Stracke,R., Tőrejék,O., Altmann,T., Mitchell-Olds,T., and Weisshaar,B. 2003. Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* 13:1250-1257.
- Schmittgen,T.D., and Zakrajsek, B.A. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46(1-2): 69-81.
- Schmittgen,T.D., Zakrajsek,B.A., Mills,A.G., Gorn,V., Singer,M.J., and Reed,M.W. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry* 285:194-204.
- Schneider,S., and Excoffier,L. 1999. Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079-1089.

- Sin'kevich,M.S., Sabel'nikova,E.P., Deryabin,A.N., Astakhova,N.V., Dubinina,I.M., Burakhanova,E.A., and Trunova,T.I. 2008. The changes in invertase activity and the content of sugars in the course of adaptation of potato plants to hypothermia. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(4):449-454.
- Singh,V.K., Sangar,R.B.S, and Singh,R.N. 1996. Effect of varieties and sowing dates on disease incidence and productivity of fieldpea (*Pisum sativum*). *Indian Journal of Agronomy* 41(3):451-453.
- Singh,W., Hjorleifsson,E., and Stefansson,G. 2011. Robustness of fish assemblages derived from three hierarchical agglomerative clustering algorithms performed on Icelandic groundfish survey data. *ICES Journal of Marine Science* 68:189–200.
- Shannon,C.E., and Weaver,W. 1949. *The mathematical theory of communication*. Univ of Illinois Press, Urbana.
- Shapiro,S.S., and Wilk, M.B., & Chen, H. J. 1968. A comparative study of various tests of normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63, 1343-1372.
- Sharma,P., Sharma,N., and Deswal,R. 2005. The molecular biology of the low-temperature response in plants, *BioEssays* 27:1048–1059.
- Sharma,N., Sharma,K.P., Gaur,R.K., and Gupta,V.K. 2011. Role of Chitinase in Plant Defense. *Asian Journal of Biochemistry* 6:29-37.
- Sharma,R., Kant,A., and Kaushal,R.P. 2004. Generation of pea mutants for resistance to *Ascochyta* blight and powdery mildew and their characterization using isozyme markers. *Journal of Genetics and Breeding* 58(2):149-156.
- Sharma,R., Mohan Singh,R.K., Malik,G., Deveshwar,P., Tyagi,A.K., Kapoor,S., Kapoor,M. 2009. Rice cytosine DNA methyltransferases - Gene expression profiling during reproductive development and abiotic stress. *FEBS Journal* 276(21):6301-6311.
- Shi,S., Qiu,Y., Wu,L., and Fu,Ch. 2006. Interspecific relationships of *Lycoris* (*Amaryllidaceae*) inferred from inter-simple sequence repeat data. *Scientia Horticulturae* 110:285-291.
- Shulaev,V., Cortes,D., Miller,G., and Mittler,R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum* 132:199-208.
- Simioniuc,D., Uptmoor,R., Friedt,W., and Ordon,F. 2002. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding* 121:429–435.
- Simon,C.J., and F.J. Muehlbauer, 1997. Construction of a chickpea linkage map and its comparison with maps of pea and lentil. *Journal of Heredity* 88: 115-119.
- Slinkard,A.E., Bascur, G. and Hernandez-Bravo,G. 1994. Biotic and abiotic stresses of cool season food legumes in the western hemisphere. In: Muehlbauer.F.J. and Kaiser,W.J. (eds.), *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 195-203.
- Shailasree,S., Ramachandra,K.K., Shetty,S.H. 2007. β -Amino butyric acid-induced resistance in pearl millet to downy mildew is associated with accumulation of defence-related proteins. *Australasian Plant Pathology* 36(2):204-211.
- Shereena,J., and Salim,N. 2006. Chilling Tolerance in *Pisum sativum* L. Seeds: An Ecological Adaptation. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5: 1047-1050.
- Smartt,J. 1990. 'Grain Legumes: Evolution and Genetic Resources'. Cambridge University Press.
- Smeekens,S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:49-81.
- Smith,D.C. 1944. Pollination and seed formation in grasses. *Journal of Agricultural Research* 68:79-95.
- Smykal,P. 2006. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *Journal of Applied Genetics* 47: 221–230.
- Smykal,P., Hybl,M., Corander,J., Jarkovsky,J., Flavell,A.J., and Griga,M. 2008a. Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 117(3):413-424.

- Smýkal,P., Horáček,J., Dostálová,R., Hýbl,M. 2008b.Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *Journal of Applied Genetic* 49: 155-166.
- Smýkal,P., Kenicer,G., Flavell,A.J., Corander,J., Kosterin,O., Redden,R.J., Ford,R., Coyne,C.J., Maxted,N., and Ambrose,M.J. 2011. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* 9: 4-18.
- Sneath,I.H.A., and Sokal,R.R. 1973. *Numerical taxonomy*. Freeman,W.H., and Company, San Francisco.
- Soleimani,V.D., Baum,B.R., and Johnson,D.A. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp *durum* (Desf.) Husn.]. *Theoretical and Applied Genetics* 104:350-357.
- Song,C.J., Steinebrunner,I., Wang,X., Stout,S.C., and Roux,S.J. 2006. Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140(4):1222-1232.
- Son,O., Hur,Y.S., Kim,Y.K., Lee,H.J., Kim,S., Kim,M.R., Nam,K.H., *et al.* 2010. ATHB12, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of *Arabidopsis*, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene. *Plant and Cell Physiology* 51(9):1537-1547.
- Soussi,M., Ocaña,A., and Lluch,C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany* 49(325):1329-1337.
- Spencer,D., Higgins,T.J.V., Freer,M., Dove,H. and Coombe,J.B. 1988. Monitoring the fate of dietary proteins in rumen fluid using gel electrophoresis. *British Journal of Nutrition* 60:241-247.
- Stam,P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3:739-744.
- Stam,P., Van Ooijen,J.W. 1995. JoinMap™ version 2.0: software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen.
- Staub,J.E., Serquen,F.C., and Gupta,M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31:729-471.
- Steiger,D., Nagal,C., Moore,P., Morden,C., Osgood,R., and Ming,R. 2002. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 105:209-215.
- Stein,H.H.; Bohlke,R.A. 2007. The effects of thermal treatment of field peas (*Pisum sativum* L.) on nutrient and energy digestibility by growing pigs. *Journal of Animal Science* 85: 1424-1431.
- Steponkus,P.L. 1978. Cold hardiness and freezing injury of agronomic crops. *Advances in Agronomy* 30: 51-98.
- Strand,A., Foyer,C.H., Gustafsson,P., Gardeström,P., and Hurry,V. 2003. Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell and Environment* 26:523–535.
- Studier,J.A., and Keppler,K.J. 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular Biology and Evolution* 5:729-731.
- Sturtevant,A.H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology* 14:43-59.
- Su,Y., Rao,Y., Hu,S., Yang,Y., Gao,Z., Zhang,G., Liu,J., Hu,J., Yan,M., Dong,G., Zhu,L., Guo,L., Qian,Q., and Zeng,D. 2011. Map-based cloning proves qGC-6, a major QTL for gel consistency of japonica/indica cross, responds by Waxy in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 123(5):859-867.
- Su'udi,M., Cha,J.Y., Jung,M.H., Ermawati,N., Han,C., Kim,M.G., Woo,Y.M., and Son,D. 2012. Potential role of the rice OsCCS52A gene in endoreduplication. *Planta* 235(2):387-397.
- Suharyanto,S., and Susumu,S. 2011. Nucleotide Diversities and Genetic Relationship in the Three Japanese Pine Species; *Pinus thunbergii*, *Pinus densiflora*, and *Pinus luchuensis*. *Diversity* 3(1):121-135.
- Sunnucks,P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15(5):199-203.

- Suzuki,M., Kamide,Y., Nagata, N., Seki,H., Ohyama,K., Kato,H., Masuda,K., Sato,S., Kato,T., Tabata,S., Yoshida,S., and Muranaka,T. 2004. Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. *Plant Journal*, 37(5):750-761.
- Swensen, J.B. 1980. Development of freezing tolerance and changes in tissue moisture during hardening of *Pisum sativum* (L.) and *Pisum sativum* subsp. M.S. Thesis, University of Idaho, Moscow, USA.
- Swofford,D.L., Olsen,G.J., Waddell,P.J., and Hillis,D.M. 1996. Phylogenetic Inference. In *Molecular Systematics*. Hillis,D.M., Moritz,C. and Mable,B.K. (eds.). Sinauer Associates, Sunderland, USA. pp. 407-514.
- Sybenga,J. 1996. Recombination and chiasmata: few but intriguing discrepancies. *Genome* 39(3):473-484.
- Szalai,G., Kellos,T., Galiba,G., Kocsy G. 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 28 (1):66-80.
- Tai,S.S.K., Lee,T.T.T., Tsai,C.C.Y., Yiu T.J., and Tzen,J.T.C. 2001. Expression pattern and deposition of three storage proteins, 11S globulin, 2S albumin and 7S globulin in maturing sesame seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 39(11):981-992.
- Tam,S.M., Mhiri,C., Vogelaar,A., Kerkveld,M., Pearce,S.R., and Grandbastien,M.A. 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical and Applied Genetics* 110:819-831.
- Tamura,K., Dudley,J., Nei,M., and Kumar,S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tanksley,S.D., Ganai,M.W., Prince,J.P., De Vincente,M.C., Bonierbale,W. *et al.*, 1992 High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tanksley,S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu.Rev.Genet.* 27:205-233.
- Tar'an,B., Warkentin,T., Somers,D.J., Miranda,D., Vandenberg,A., Blade,S. Woods,S., Bing,D., Xue,A., DeKoeyer,D., and Penner,G. 2003. Quantitative trait *loci* for lodging resistance, plant height and partial resistance to *Mycosphaerella* blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107:1482–1491.
- Tar'an,B., Warkentin,T., Somers,D.J., Miranda,D., Vandenberg,A., Blade,S., and Bing,D. 2004. Identification of quantitative trait *loci* for grain yield, seed protein concentration and maturity in field pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 136:297–306.
- Tar'an,B., Zhang,C, Warkentin,T., Tullu,A., and Vandenberg,A. 2005. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48(2):257-72.
- Taylor,B.A., 1978 Recombinant inbred strains: use in gene mapping, pp. 423–438 in *Origins of Inbred Mice*, edited by Morse,H.C. Academic Press, New York.
- Taylor,N.L., Heazlewood,J.L., Day,D.A., and Millar,A.H. 2005. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Molecular and Cellular Proteomics* 4:1122–1133.
- Taylor,S.A., Hofer,J.M.I., Murfet,I.C., Sollinger,J.D., Singer,S.R., Knox,M.R., and Ellis,T.H.N. 2002. Proliferating Inflorescence Meristem, a MADS-box gene that regulates floral meristem identity in pea. *Plant Physiology* 129(3):1150-1159.
- Tease,C., and Jones,H.H. 1995 Do chiasmata disappear? An examination of whether closely spaced chiasmata are liable to reduction or loss. *Chromosome Research* 3: 162–168.
- Tenaillon,M.I., Sawkins,M.C., Long,A.D., Gaut,R.L., Doebley,J.F., and Gaut,B.S. 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp *mays* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9161-9166.
- Teutonico,R.A., and Osborn,T.C. 1995. Mapping *loci* controlling vernalization requirement in *Brassica rapa*. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1279–1283.

- Theillin,O., Zorzi,W., Lakaye,B., De Borman,B., Coumans,B., Hennen,G., Grisar,T., Igout,A., and Heinen,E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75:291–295.
- Thévenot,C., Simond-Côte,E., Reyss,A., Manicacci,D., Trouverie,J., Le Guilloux,M., Ginhoux,V., Sidicina,F., and Prioul,J.L. 2005. QTLs for enzyme activities and soluble carbohydrates involved in starch accumulation during grain filling in maize. *Journal of Experimental Botany* 56:945–958.
- Thiellement,H., Bahrman,N., Damerval,C., Plomion,C., Rossignol,M., Santoni,V., de Vienne,D., Zivy,M. 1999. Proteomics for genetical and physiological studies in plants. *Electrophoresis* 20(10):2013-2026.
- Thornsberry,J.M., Goodman,M.M., Doebley,J., Kresovich,S., Nielsen,D., and Buckler,E.S. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics* 28(3):286–289
- Thomashow,M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:571–599.
- Timmerman,G.M., Frew,T.J., Miller,A.L., Weeden,N.F., and Jermyn,W.A., 1993. Linkage mapping of *sbm-1*, a gene conferring resistance to pea seed-borne mosaic virus, using molecular markers in *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* 85:609-615.
- Timmerman,G.M., Frew,T.J., Weeden,N.F., Miller,A.L., and Goulden,D.S., 1994. Linkage analysis of *er-1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* D.C.) *Theoretical and Applied Genetics* 88:1050-1055.
- Timmerman-Vaughan,G.M., McCallum,J.A., Frew,T.J., Weeden,N.F. and Russell,A.C., 1996. Linkage mapping of quantitative traits controlling seed weight in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 93: 431-439.
- Timmerman-Vaughan,G.M., Frew,T.J., and Weeden,N.F. 2000. Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 101:241-247.
- Timmerman-Vaughan,G.M., Frew,T.J., Russell,A.C., Khan,T., Butler,R., Gilpin,M., Murray,S., and Falloon,K . 2002. QTL mapping of partial resistance to field epidemics of *Ascochyta* blight of peas. *Crop Science* 42:2100–2111.
- Timmerman -Vaughan,G., Mills,A., Frew,T., Butler,R., Mccallum,J., Murray,S., Whitfield,C., Russell,A., and Wilson,D. 2004. Linkage mapping of QTLs for seed yield, yield components and developmental traits in pea (*Pisum sativum* L.). En: 4th Intl. Crop Sci. Congr. Brisbane, Australia.
- Timmerman-Vaughan,G.M., Mills,A., Whitfield,C., Frew,T., Butler,R., Murray,S., Lakeman,M., McCallum,J., Russell,A., and Wilson,D. 2005. Linkage mapping of QTL for seed yield, yield components, and developmental traits in pea. *Crop Science* 45:1336-1344.
- Tinker,N.A., Fortin,M.G., and Mather,D.E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 976-984.
- Tommasini,L., Batley,J., Arnold,G.M., Cooke,R.J., Donini,P., Lee, D., Law,J.R., Lowe,C., Moule,C., Trick,M., and Edwards,K.J. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1091–1101.
- Tompa,P. 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 527–533.
- Torres,A.M., Avila,C.M., Gutierrez,N. Palomino,C., Moreno,M.T., and Cubero,J.I. 2010: Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research* 115:243-252.
- Torrigiani,P., Rabiti,A.L., Bortolotti,C., Betti,L., Marani,F., Canova,A., *et al.* 1997. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* 145:467-73.
- Toth,B., Galiba,G., Feher,E., Sutka,J., Snape,J.W. 2003. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 107:509–514.
- Trewavas,A. 2003. Aspects of plant intelligence. *Annals of Botany* 92:1–20.

- Truong,H.T.H., Kim,K.T., Kim,D.W., Kim,S., Chae,Y., Park,J.H., Oh,D.G., and Cho,M.C. 2012. Identification of isolate-specific resistance QTLs to phytophthora root rot using an intraspecific recombinant inbred line population of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Pathology* 61(1):48-56.
- Turakulov,R., and Easteal,S. 2003. Number of SNPS *loci* needed to detect population structure. *Human Heredity* 55:37-45.
- Uemura, M., Steponkus,P.L. 1994. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiology* 104:479-496.
- Uemura,M., Joseph,R.A., and Steponkus,P.L. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiology* 109:15-30.
- Ulukan,H. 2008. Agronomic Adaptation of Some Field Crops: A General Approach. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194(3):169-179.
- Ulukan,H. 2009. The evolution of cultivated plant species: classical plant breeding versus genetic engineering. *Plant Systematics Evolution* 280:133-142.
- Urano,K., Yoshiba,Y., Nanjo,T., Igarashi,Y., Seki,M., Sekiguchi,F., *et al.* 2003. Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell and Environment* 26:1917-1926.
- Usadel,B., Bläsing,O.E., Gibon,Y., Poree,F., Höhne,M., Günter,M., Trethewey,R., *et al.* 2008. Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. *Plant, Cell and Environment* 31 (4):518-547.
- Van de Peer,Y., and De Wachter,R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences* 10:569-570.
- Van Heerden,P.D.R., Kiddle,G., Pellny,T.K., Mokwala,P.W., Jordaan,A., Strauss,A.J., De Beer,M., *et al.* 2008. Regulation of respiration and the oxygen diffusion barrier in soybean protect symbiotic nitrogen fixation from chilling-induced inhibition and shoots from premature senescence. *Plant Physiology* 148(1):316-327.
- Van Poijen,J.M., Sandbrink,J.M., Vrieling,M., Verkerk,R., Zabel,P. *et al.*, 1994. An RFLP linkage map of *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:1007-1013.
- Van Tienderen,P.H., De Haan,A.A., Van Der Linden,C., and Vosman,B. 2002. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. *Trends in Ecology & Evolution* 17(12):577-582.
- Vanstraelen,M., Balaban,M., Da Ines,O., Cultrone,A., Lammens,T., Boudolf,V.R., Brown,S.C., *et al.* 2009. APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 10 (28):11806-11811.
- Varshney,R.K., Close,T.J., Singh,N.K., Hoisington,D.A., and Cook,D.R. 2009. Orphan legume crops enter the genomics era! *Current Opinion in Plant Biology*. 12:1-9.
- Varshney,R.K., Langridge,P., and Graner,A. 2007. Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley. *Advances in Genetics* 58:121-155.
- Vashisht,A.A., and Tuteja,N. 2006. Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 84(2):150-160.
- Vavilov,N.I. 1935. Theoretical Basis for Plant Breeding. *The Phylogeographical Basis for Plant Breeding*. 316-366. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Vavilov,N.I. 1922. The law of homologous series in variation. *Journal of Genetics* 12(9-10):47-88.
- Vaz Patto,M.C., Torres,A.M., Koblizkova,A., Macas,J., Cubero,J.I. 1999. Development of a genetic composite map of *Vicia faba* using F2 populations derived from trisomic plants. *Theoretical and Applied Genetics* 98:736-743.
- Velculescu,V.E., Zhang,L., Vogelstein,B., and Kinzler,K.W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-487.

- Vershinin,A.V., Allnutt,T.R., Knox,M.R., Ambrose,M.J., and Ellis,N.T.H. 2003. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication. *Molecular Biology and Evolution* 20:2067–2075.
- Vilmorin,P.D., and Bateson., W. 1912. A case of gametic coupling in *Pisum*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 84:9-11.
- Vinardell,J.M., Fedorova,E., Cebolla,A., Kevei,Z., Horvath,G., Kelemen,Z., Tarayre,S., *et al.* 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator *CCS52A* is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* 15(9):2093-2105..
- Vincent,J.L., and Brewin,N.J. 2000. Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiology* 123(2):521-530.
- Vitte.C., Ishii,T., Lamy,F., Brar,D., and Panaud,O. 2004. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L). *Mol Genet Genomics* 272: 504–511.
- Vitte,C., Panaud,O., and Quesneville,H. 2007. LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa*, L.): recent burst amplifications followed by rapid DNA loss. *BMC Genomics* 8:218.
- Voorrips,R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93(1):77-78.
- Vos,P., Hogers,R., Bleeker,M., Reijans,M., van de Lee,T., Hornes,M., Frijters,A., Pot,J., Peleman,J., Kuiper,M., and . 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23(21):4407-4414.
- Vyas,P., Joshi,R., Sharma,K.C., Rahi,P., Gulati,A., and Gulati,A. 2010. Cold-adapted and rhizosphere-competent strain of *Rahnella* sp. with broad-spectrum plant growth-promotion potential. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(12):1724-1734.
- Waddington,C.H. 1943. Polygenes and oligogenes. *Nature* 151:394.
- Pavlova,Z.B., Dobrodumova,V.V., Kravchenko,L.V., Lutova,L.A. 2000. Characterization of pea symbiotic mutants for traits related to hormonal status. *Russian Journal of Genetics* 36(6):656-660.
- Wanner,L.A., and Junttila,O., 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120:391–399.
- Wang,C., Delcros,J.G., Cannon L, Konate,F., Carias,H., Biggerstaff,J., Gardner,R.A., and Phanstiel,O. 2003. Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters. *Journal of Medicinal Chemistry* 46(24):5129–5138.
- Wang,S., Basten,C.J., and Zeng,Z.B. 2005 Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, NCSU, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).
- Wang,L.X., Guan,R.X., Liu,Z.X., Chang,R.Z., Qiu,L.J. 2006. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Science* 46:1032-1038.
- Wang,T.L., and Hedley,C.L. 1993. Genetic and developmental analysis of the seed. In Casey,R., Davies,D.R. (eds.) *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biochemistry*. CAB International, Cambridge, UK, pp 83–120
- Wang,X., Liu,W., Chen,X., Tang,C., Dong,Y., Ma,J., Huang,X., Wei,G., Han,Q., Huang,L., and Kang,Z. 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC Plant Biology* 10:9
- Wang,Z., Taramino,G., Yang,D., Liu,G., Tingey,S.V., Miao,G.H., and Wang,G.L. 2001. Rice ESTs with disease resistance gene- or defence-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. *Molecular Genetics and Genomics* 265:302–310.
- Waugh,R., McLean,K., Flavell,A.J., Pearce,S.R., Kumar,A., Thomas,B.B., and Powell,W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol.Gen.Genet.* 253(6):687-694.
- Webb,M.S., and Steponkus,P.L. 1993. Freeze-induced membrane ultrastructural alterations in rye (*Secale cereale*) leaves. *Plant Physiology* 101:955–963.

- Weber,H., Borisjuk,L., Wobus,U. 1996. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. Comparative analysis of a small and a large-seeded genotype. *Plant Journal* 10: 823–824.
- Weber,H., Borisjuk,L., and Wobus,U. 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Physiology* 56:253–279.
- Weber,J.L. 1990. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr.Opin.Biotechnol.* 1(2):166-171.
- Weeden,N.F., and Marx,G.A. 1987 Further genetic analysis and linkage relationships of isozyme *loci* in the pea. *Journal of Hereity* 78:153–159.
- Weeden,N.F., Muehlbauer,F.J., and Ladizinsky,G. 1992. Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. *Journal of Heredity* 83(2):123-129.
- Weeden,N.F., Timmerman,G.M., and Lu,J. 1994. Identifying and mapping genes of economic significance. *Euphytica* 73: 191–198.
- Weeden,N.F., Swiecicki,W.L., Timmerman-Vaughan,G.M., Ellis,T.H.N., and Ambrose,M, 1996. The current pea linkage map. *Pisum Genetics* 28:1–4.
- Weeden,N.F., Ellis,T.H.N., Timmerman-Vaughan,G.M., Swiecicki,W.K., Rozov,S.M., and Berdnikov,V.A. 1998. A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* 30:1–4.
- Weeden,N.F., Tonguc,M., and Boone,W.E. 1999. Mapping coding sequences in pea by PCR. *Pisum Genetics* 31:30–32.
- Weeden,N.F., Brauner,S., Przyborowski,J.A. 2002. Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:657-663.
- Weeden,N.F., and Muehlbauer,F.J. 2004. Genomics and genetic improvement in the cool season pulse crops pea, lentil and chickpea. Wilson, R. F., Stalker, H. T., and Brummer, E. C. *Legume Crop Genomics*. Champaign, IL, OCS Press.
- Weir,BS. 1996. Genetic data analysis II. Sunderland (MA): Sinauer Assocs., Inc.
- Weiser,C.J., Walner,S.J., and Waddell, J.W. 1990. Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings. *Plant Physiology* 93: 1021-1026.
- Welbaum,G.E., Bian,D., Hill,D.R., Grayson,R.L., and Gunatilaka,M.K. 1997. Freezing tolerance, protein composition and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress. *Journal of Experimental Botany* 48:643–654
- Wellensiek,S.J. 1925. Genetic monograph on *Pisum*. *Bibliographia Genetica* 2:343-476.
- Weller,J.L., Reid,J.B., Taylor,S.A., Murfet,I.C. 1997.The genetic control of flowering in pea. *Trends in Plant Science* 2:412-418.
- Wen,P.F., Chen,J.Y., Wan,S.B., Kong,W.F., Zhang,P., Wang,W., Zhan,J.C., *et al.* 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation* 55(1):1-10.
- Weng,L.X., Deng,H.H., Xu,J.L., Li,Q., Zhang,Y.Q., Li,Q.W., Chen,J.W., and Zhang,L.H. 2010. Transgenic Sugarcane Plants Expressing High Levels of Modified Cry1Ac Provide Effective Control Against Stem Borers in Field Trials. *Transgenic Research* 20(4):1-14.
- Wenzl,P., Suchankova,P., Carling,J., Simkova,H., Huttner,E., Kubalaková,M., Sourdille,P., Paul,E., Feuillet,C., Kilian,A., and Dolezel,J. 2010. Isolated chromosomes as a new and efficient source of DArT markers for the saturation of genetic maps. *Theoretical and Applied Genetics* 121:465–474.
- Wenzel,G. 2006. Molecular plant breeding: achievements in green biotechnology and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70(6):642-650.
- Wery,J., Turc,O. and Lecoœur,J. 1993. Mechanisms of resistance to cold, heat and drought in cool-season legumes, with special reference to chickpea and pea. In *Breeding for stress tolerance in cool season food legumes*. Singh,K.B. and Saxena,M.C. (eds.). Chichester, UK: John Wiley & Sons. pp 271-291.

- Whitbred, J.M., and Schuler, M.A. 2000. Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiology* 124(1):47-58.
- White, S. and Doebley, J. 1998. Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends Genet.* 14(8):327-332.
- Wilcox, J. R. World distribution and trade of soybean. Boerma, R. H. and Specht, J. E. Soybeans: improvement, production, and uses. 2004. Madison, WI, American Society of Agronomy.
- Williams, M.N.V., Pande, N., Nair, S., Mohan, M., and Bennett, J. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped *loci* of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 82:489-498.
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., and Williams, P.M. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical Biochemistry* 270:41-49.
- Witcombe, J.R., and Virk, D.S. 2001. Number of crosses and population size for participatory and classical plant breeding. *Euphytica* 122:451-462.
- Wong, M.L., and Medrano, J. 2005. RealTime PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* 39:75-85.
- Wong, W.S., Ning, W., Xu, P.L., Kung, S.D., Yang, S.F., and Li, N. 1999. Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) fruit. *Plant Molecular Biology* 41(5):587-600.
- Woronuk, G., Vijayan, P., Laberge, S., Vandenberg, B., and Bett, K. 2010. Transcriptomic analysis of chilling stress in *Phaseolus* spp. *Environmental and Experimental Botany* 69(2):95-104.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Xiaoqin, W., Pingfang, Y., Xiaofeng, Z., Yinong, X., Tingyun, K., Shihua, S., and Yikun, H. 2009. Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens*. *Proteomics* 9(19):4529-4538.
- Xin, Z., and Browse, J. 1998. eskimol1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7799-7804.
- Xin, Z., and Browse, J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and Environment* 23: 893-902.
- Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N., and McCouch, S.R. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 253(5):535-545.
- Xue, J.L., Salem, T.Z., Turney, C.M., and Cheng, X.W. 2010. Strategy of the use of 28S rRNA as a housekeeping gene in real-time quantitative PCR analysis of gene transcription in insect cells infected by viruses. *Journal of Virological Methods* 163:210-215.
- Yahiaoui, S., Igartua, E., Moralejo, M., Ramsay, L., Molina-Cano, J.L., Ciudad, F.J., Lasa, J.M., Gracia, M.P., and Casas, A.M. 2007. Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barleys. *Theoretical and Applied Genetics* 116:271-282.
- Yamamoto, T., Yoko, M., and Ishibashi, T., 2005. Interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and a DnaJ induced by DNA damage. *Journal of Plant Research* 118:91-97.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibitions of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 6: 67-378.
- Yang, H.R., Liu, H.T., Tang, K., and Huang, W.D. 2011. Role of lipoxygenase and allene oxide synthase in wound-inducible defense response of pea. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(2):238-247.
- Yang, L., Ji, W., Gao, P., Li, Y., Cai, H., Bai, X., Chen, Q., and Zhu, Y. 2012. GsAPK, an ABA-activated and calcium-independent SnRK2-type kinase from *G. soja*, mediates the regulation of plant tolerance to salinity and ABA stress. *PLoS ONE* 7(3):e33838.

- Yang, Q.H., Lu, W., Hu, M.L., Wang, C.M., Zhang, R.X., Yano, M., and Wan, J.M. 2003. QTL and epistatic interaction underlying leaf chlorophyll and H₂O₂ content variation in rice (*Oryza sativa* L.). *Yi.Chuan Xue.Bao.* 30(3):245-250.
- Yang, Y., Hou, S., Cui, G., Chen, S., Wei, J., and Huang, L. 2010. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza*. *Molecular Biology Reports* 37(1):507-513.
- Yeh, F.C., and Boyle, T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.
- Young, N.D., 1999. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* 5:505-510.
- Yu, G.X., and Wise, R.P. 2000. An anchored AFLP and retrotransposons-based map of diploid *Avena*. *Genome* 43:736-749.
- Yu, K., Park, S., and Poysa, V. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: Efficacy and economics. *Plant Breeding* 119:411-415.
- Zahir, Z.A., Munir, A., Asghar, H.N., Shaharouna, B., and Arshad, M. 2008. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(5):958-963.
- Zamir, D. and Tadmor, Y. 1986. Unequal segregation of nuclear genes in plants. *Botanical Gazette* 147:355-358.
- Zhang, J., and Shu, W.S. 2006. Mechanisms of heavy metal cadmium tolerance in plants *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 32(1):1-8.
- Zhang, L.L., Zhao, M.G., Tian, Q.Y., and Zhang, W.H. 2011. Comparative studies on tolerance of *Medicago truncatula* and *Medicago falcata* to freezing. *Planta* 234(3):445-457.
- Zhang, P., Wang, W.Q., Zhang, G.L., Kaminek, M., Dobrev, P., Xu, J., and Gruijssem, W. 2010. Senescence-Inducible Expression of Isopentenyl Transferase Extends Leaf Life, Increases Drought Stress Resistance and Alters Cytokinin Metabolism in *Cassava*. *Journal of Integrative Plant Biology* 52(7):653-669.
- Zhao, H., Dai, T., Jiang, D., and Cao, W. 2008. Effects of high temperature on key enzymes involved in starch and protein formation in grains of two wheat cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194(1):47-54.
- Zhou, C., Han, L., Pislariu, C., Nakashima, J., Fu, C., Jiang, Q., Quan, L., *et al.* 2011. From model to crop: Functional analysis of a stay-green gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement. *Plant Physiology* 157(3):1483-1496.
- Zimmer, R.C., and Sabourin, D. 1986. Determining resistance reactions of field pea cultivars at the seedling stage to *Mycosphaerella pinodes*. *Phytopathology* 76:878-881
- Zohary, D. 1996. The mode of domestication of the founder crops of near east agriculture. Pp. 142-158 in Harris, D.R. (ed). *The origin and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia*. University College London Press, London.
- Zohary, D., and Hopf, M. 2000. *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford: Oxford University Press.
- Zong, X., Redden, R.J., Liu, Q., Wang, S., Guan, J., Liu, J., Xu, Y., Liu, X., Gu, J., Yan, L., Ades, P., and Ford, R. 2009. Analysis of a diverse global *Pisum* sp. collection and comparison to a Chinese local collection with microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 118:193-204.
- Zwick, W.R., and Velicer, W.F. 1986. Comparison of five rules for determining the number of components to retain. *Psychological Bulletin* 99:432-442.



Capítulo VII

Anexos

Capítulo VII. ANEXOS

Anexo III.1. Tabla de variedades incluidas en el estudio de diversidad y filogenia de guisante.

Anexo III.2. Marcadores moleculares SSR, RBIP, ASP, CAPS, dCAPS, Size y STS seleccionados

Anexo III.3. Sistemas de amplificación, gen o proteína codificante y número de accesión

Anexo III.4. Descripción de los sistemas de amplificación diseñados a partir de genes secuenciados en guisante

Anexo IV.1. Frecuencias alélicas obtenidas para cada marcador molecular analizado

Anexo IV.2. Dendrograma NJ obtenido en el análisis individualizado de las 288 líneas seleccionadas en el estudio de diversidad

Anexo IV.3. Dendrogramas basados en la distancia de Nei para los 33 grupos y construidos según UPGMA en función de cada análisis realizado

Anexo IV.4. QTL asociados al porcentaje de supervivencia evaluado las 24 horas del ensayo de heladas y tras 2 semanas

Anexo IV.5. Resumen de los análisis de qPCR para Terese y Champagne sin aclimatar y aclimatadas con los criterios de selección y cribado de genes establecidos en este trabajo

Anexo IV.6. Resumen de los análisis de qPCR para Cheyenne y ZP-1366 sin aclimatar y aclimatadas con los criterios de selección y cribado de genes establecidos en este trabajo

Anexo III.1. Tabla de variedades incluidas en el estudio de diversidad y filogenia de guisante.

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación	
ZP1237	<i>P. abyssinicum</i>	<i>P. abyssinicum</i>	África	Etiopía	Local			JI 0130	SWE006	WBH 808 / NGB100808		1968	
ZP1246	<i>P. abyssinicum</i>	<i>P. abyssinicum</i>	África	Etiopía	Local	Dessie		JI 1640	JIC/ USA022	PI 196027	USDA: P.sativum	1951	
ZP1254	<i>P. abyssinicum</i>	<i>P. abyssinicum</i>	Asia	Yemen	Local			JI 2202	RUS043	VIR 3567		1986	
USDA067	<i>P. sativum</i> subsp. <i>abyssinicum</i>	<i>P. abyssinicum</i>	Europa	Suecia	Cultivar	Malmohus			USA022	PI 271033	Suspuesto abbyssinicum	1961	
USDA110	<i>P. sativum</i> subsp. <i>abyssinicum</i>	<i>P. abyssinicum</i>	África	Etiopía	M. cultivado	Alamata		22867	USA022	PI 358613		1970	
JI1796	<i>P. fulvum</i>	<i>P. fulvum</i>	Descon.	Descon.	Silvestre					ISR030		1983	
JI2473	<i>P. fulvum</i>	<i>P. fulvum</i>	Descon.	Descon.	Silvestre				WT 304	WBH 2031/ NGB102031		1990	
JI2517	<i>P. fulvum</i>	<i>P. fulvum</i>	Asia	Siria	Silvestre	Harem				GBR001	86159/ 1 ISR030	1986	
JI0241	<i>P. humile</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i> var. <i>pumilio</i>	Asia	Israel	Semisilvestre	Jerusalén							
JI1794	<i>P. humile</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i> var. <i>pumilio</i>	Descon.	Descon.	Silvestre						ISR030	1983	
JI0250	<i>P. jomardii</i>	<i>P. sativum</i> (<i>jomardii</i>)	África	Egipto	Semisilvestre						WBH 2055	NGB: abyssinicum	1962
USDA137	<i>P. sativum</i> subsp. <i>asiaticum</i>	<i>P. sativum</i> (<i>asiaticum</i>)	Asia	India	Descon.			VIR K-7290	USA022	PI 639967		1993	
USDA138	<i>P. sativum</i> subsp. <i>asiaticum</i>	<i>P. sativum</i> (<i>asiaticum</i>)	Asia	Nepal	Descon.			VIR K-7036	USA022	PI 639968		1993	
USDA139	<i>P. sativum</i> subsp. <i>asiaticum</i>	<i>P. sativum</i> (<i>asiaticum</i>)	Asia	Nepal	Descon.			VIR K-5322	USA022	PI 639969		1993	
JI0261	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Asia	Turquía	Semisilvestre	Tierras Altas					WBH 2038	NGB: sativum (Landrace)	1968
JI1075	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Asia	Israel	Silvestre	Muradiye			USA022	PI 343979		1969	
JI1703	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Descon.	Descon.	Silvestre				GBR006	1763		1982	
JI3149	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Asia	Turquía	Descon.				GBR001	877155		1987	

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
JI3156	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Asia	Turquía	Descon.				GBR001	877436		1987
USDA099	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Asia	Turquía	Silvestre	Kemalpasa		22742	USA022	PI 343978		1969
USDA100	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Asia	Turquía	Silvestre	Muradiye		22725	USA022	PI 343979		1969
USDA102	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Europa	Grecia	Silvestre	Península Athos		22729	USA022	PI 344009		1969
USDA103	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Europa	Grecia	Silvestre	Península Athos		22733	USA022	PI 344011		1969
USDA104	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Europa	Italia	Descon.	Misilmeri, Palermo		2	USA022	PI 344538		1969
USDA126	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	África	Sudán	Descon.			ILCA 5076	USA022	PI 505059		1986
USDA131	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Europa	Rusia	M. cultivado			L. 89	USA022	PI 560055		1991
USDA132	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Europa	Rusia	M. cultivado			L. 90	USA022	PI 560056		1991
USDA133	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Asia	Israel	M. cultivado	Bat Shelomo		L. 104	USA022	PI 560058		1991
USDA002	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Asia	India	Descon.			Matar	USA022	PI 116056		1936
USDA045	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Europa	Dinamarca	Descon.			G 11764	USA022	PI 242027		1957
USDA061	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Europa	Reino Unido	M. cultivado			Aa38	USA022	PI 269762		1960
USDA101	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Asia	Turquía	M. cultivado	Burhaniye		22718	USA022	PI 343987	subsp. hortense	1969
USDA127	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Europa	Chipre	Descon.			ILCA 5039	USA022	PI 505080		1986
USDA128	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Europa	Grecia	Descon.			ILCA 5072	USA022	PI 505108		1986
USDA129	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Europa	Albania	Descon.			ILCA 5089	USA022	PI 505122		1986

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
USDA130	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	Europa	España	Descon.			ILCA 5115	USA022	PI 505144		1986
USDA060	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvense</i>	Europa	Rep. Checa	M. cultivado			Aa135	USA022	PI 269761		1960
USDA134	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvense</i>	Asia	Turkmenist án	Silvestre			TKM37-327	USA022	PI 639962		2002
USDA136	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvense</i>	Europa	Bulgaria	Silvestre	Albena		W617218	USA022	PI 639964		1995
USDA140	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i>	<i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvense</i>	Europa	Bulgaria	Cultivar	Plovdiv		MIR	USA022	PI 639980		1992
112	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Descon.							
Alderman	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 0951	SWE006	WBH 1340		1973
Aravalle	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Arthur	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 0617				1969
Astrid	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Attika	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
AW	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 2735	SWE002	WBH 3077	NGB: arvense	1994
Baccara	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Blizzard	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Bohatyr	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 2324	GBR042			1988
Cartooche	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Champagne	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Francia	Mejorado			JI 2289	FRA235			1987
e												
Cheyenne	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Corallo	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Dove	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Esasa	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Esla	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Filby	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI1768	GBR011	BS 4		1983
Foramix	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Fortune	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 2439	GBR006	PS 880423		1989
Glotón	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Gracia	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Hardy	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Iceberg	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Ideal	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
J10015	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Suecia	Mejorado			WBH 1458	SWE006	WBH 1458		1962
J10113	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mutante			USATYJ		L 5110		1967
J10166	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Etiopía	Local				GBR071	Etiopía 117		1963
J10228	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Bolivia	Semisilvestre	Cochamba						1963
J10267	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Grecia	Local				6	WBH 1603	NGB: arvense	1969
J10278	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Afganistán	Local	Bahar Dar			60	WBH 1592	NGB: arvense	1936
J10281	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Etiopía	Local	Khartoum			GBR071	Etiopía 11		1963
J10399	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			Feltham First				1968
J10435	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			Wisconsin Perfection Maro		WBH 2807		1968
J10516	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							1969
J10960	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Turquía	Semisilvestre	Orhaniye			USA022	PI 343958		1971
J10975	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Costa Rica	M. cultivado				USA022	PI 262189		1959
J11006	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Israel	Silvestre			P.fulvum	PF-3	WBH 2142/ NGB10214 4		1976
J11010	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Israel	Silvestre			P.fulvum	PF-27	WBH 2144/ NGB10214 4		1976
J11267	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	Local	Bulandshahr			USA022	PI 356984		1970
J11398	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	China	Local	Liuba			GBR011			1981
J11544	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	China	Local				SWE006	WBH 1934/ NGB10193 4		1982
J11775	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Chile	Local							1979
J11829	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Murcia				BGE001121		1983
J11831	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Islas Balears				BGE001414		1983
J11844	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Méjico	Local	San Pedro Chenalho			USA022	PI 142774		1941
J12078	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Semisilvestre				ITA004	ITPDB 100956		1985
J12100	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Local				ITA004	ITPDB 102023		1985
J12105	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Irán	Semisilvestre	Esfahan			ITA004	PI 227258		1955
J12200	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Rusia	Local				RUS043	VIR 3671		1986

Capítulo VII

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
JI2263	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Túnez	Semisilvestre				DKN 5	BO 25679		1987
JI2376	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Zaire	Semisilvestre				SWE002	NGB 200122		1988
JI2421	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Letonia	Local							1989
JI2605	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Libia	Semisilvestre	Al Barkat		P.speciosum	DEU358	PIS 2129		1983
KWonder	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 0414	GBR040			1968
Lincoln	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 0376				1968
Loto	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Lucy	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Medora	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Melrose	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 2208				1986
Metaxa	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Nela	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Pawnee	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
PM32	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Rondo	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 0502		200483		1969
Shawna	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Shawnee	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Sidney	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Sioux	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Specter	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Spirale	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
Terese	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Francia	Mejorado			JI 3108	FRA235			2000
Tristar	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado			JI 3016				1996
“ZP-1366”	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Turquía	Local			ZP1366	Vavilov	2274		
Ucero	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Descon.	Descon.	Mejorado							
USDA001	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Venezuela	Cultivar	Caracas		Arvejas verdes	USA022	PI 109866		1935
USDA003	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Turquía	M. cultivado	Adana		No. 215	USA022	PI 117264		1936
USDA004	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Brasil	Cultivar	Serra do Cipo		Ervilha Torta Flor Roxa	USA022	PI 117998		1936
USDA005	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Brasil	Cultivar.	Sao Paulo		Ervilha blanca	USA022	PI 118501		1936
USDA006	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Irán	M. cultivado	Meshed, Khorassan		No. 6618	USA022	PI 140298		1940
USDA007	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	E.E.U.U.	M. cultivado	Rhode Island		G 12111	USA022	PI 155109	Parentales Tuntankamon	1946
USDA008	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Japón	Cultivar			Thirty-Days	USA022	PI 156720		1946

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
USDA009	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Paraguay	M. cultivado			L.P. NO. 4	USA022	PI 162909		1948
USDA010	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	M. cultivado	Delhi		Matar	USA022	PI 163129		1947
USDA011	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	M. cultivado	Khandwa		Matar	USA022	PI 164548		1948
USDA012	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	M. cultivado	Salem, Madras		Patani	USA022	PI 164612		1948
USDA013	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Nepal	M. cultivado	Khatmandu		No. 9705	USA022	PI 166159		1948
USDA014	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Holanda	Cultivar			Manshol T Pluk	USA022	PI 172339		1949
USDA015	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Siria	M. cultivado	Damascus		No. 9747	USA022	PI 179450		1949
USDA016	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	M. cultivado	Ahmadabad, Bombay		No. 10898	USA022	PI 179722		1949
USDA017	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Líbano	M. cultivado	Chtura		No. 9901	USA022	PI 181799		1949
USDA018	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Siria	M. cultivado	Al-Marj, Zahle		No. 9922	USA022	PI 181801		1949
USDA019	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Siria	M. cultivado	Homs		Homs No. 334	USA022	PI 181958		1949
USDA020	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Serbia	M. cultivado			No. 304	USA022	PI 184128		1949
USDA021	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Guinea	M. cultivado	N'zerekore		G 1774	USA022	PI 184784		1949
USDA022	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Nigeria	Descon.			G 7184	USA022	PI 188698		1950
USDA023	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Etiopía	M. cultivado	Harar		No. 8736	USA022	PI 193590		1951
USDA024	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Guatemala	M. cultivado	Quezaltenan go			USA022	PI 195404		1951
USDA025	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Honduras	Descon.	San Pedro Sula		No. 3005	USA022	PI 197044		1951
USDA026	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Guatemala	Descon.	Coban, Alta Verapaz		No. 3498	USA022	PI 200755		1952
USDA027	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Méjico	M. cultivado	Puebla		No. 3153	USA022	PI 201390		1952
USDA028	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Finlandia	M. cultivado	Kalle, Tammisto		G 6823	USA022	PI 203067		1952
USDA029	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Oceanía	Australia	M. cultivado	Victoria		Dunn	USA022	PI 204306		1952
USDA030	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	E.E.U.U.	Mejorado	Wisconsin		Everbearing	USA022	PI 206838		1953

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
USDA031	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	E.E.U.U.	Mejorado	Wisconsin		Carters Mkt. Gradener	USA022	PI 206861		1953
USDA032	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Afganistán	Cultivar	Kabul		No. 12616	USA022	PI 207508		1953
USDA033	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Costa Rica	Descon.	Cartago		No. 3843	USA022	PI 209507		1953
USDA034	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	China	M.	Pekin		No. S-653	USA022	PI 210558		1953
USDA035	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Rusia	M. cultivado			No. S-688	USA022	PI 210561		1953
USDA036	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Finlandia	Cultivar			Flo	USA022	PI 210571		1953
USDA037	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	E.E.U.U.	Cultivar	Iowa		Rogers Ace	USA022	PI 210583		1953
USDA038	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Irán	Descon.	Tehran		No. 4	USA022	PI 212031		1953
USDA039	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	Cultivar			Vatanamatar	USA022	PI 212917		1954
USDA040	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Indonesia	M. cultivado	Java		No. 12	USA022	PI 221697	origen Rusia	1954
USDA041	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Afganistán	Silvestre	Kabul		Moshong	USA022	PI 222071		1954
USDA042	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Irán	M. cultivado	Esfahan		No. 14918	USA022	PI 227258		1954
USDA043	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	E.E.U.U.	M. cultivado	Iowa		LAamprecht #368	USA022	PI 236492		1957
USDA044	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Taiwán	Descon.			G 6571	USA022	PI 241593		1957
USDA046	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Dinamarca	Descon.				USA022	PI 242028		1957
USDA047	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Holanda	Cultivar			Morgenster	USA022	PI 244191		1957
USDA048	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Ruanda	Cultivar	Bugarama		Col. No. 23171	USA022	PI 248181		1958
USDA049	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	RepCheca	Cultivar	Central Bohemia		Konserkova Kralovna (CRS)	USA022	PI 250439		1958
USDA050	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Etiopía	M. cultivado	Shewa		G 9173	USA022	PI 257592		1959
USDA051	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	M. cultivado			Col. No. D-43	USA022	PI 261622		1959
USDA052	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	M. cultivado			Guis. Pirabesque	USA022	PI 261623		1959
USDA053	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	M. cultivado			Col. No. D-45	USA022	PI 261624		1959
USDA053	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	M. cultivado				USA022	PI 261624		
USDA054	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	M. cultivado			No. D-88	USA022	PI 261636		1959
USDA055	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Holanda	M. cultivado			Col. No. D- 236	USA022	PI 261677		1959

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
USDA056	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Francia	Cultivar			Mangetotou Corene de Belei	USA022	PI 263027		1960
USDA057	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Grecia	Descon.			G 10331	USA022	PI 263871		1960
USDA058	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Suecia	M.	Malmohus		LINE NO. 930	USA022	PI 266070		1960
USDA059	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Pakistán	M. cultivado			Col. No. 431	USA022	PI 269543		1960
USDA062	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Reino Unido	M. cultivado			PGR 2330	USA022	PI 269770		1960
USDA063	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Reino Unido	M. cultivado			Aa112	USA022	PI 269802		1960
USDA064	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Reino Unido	Cultivar			William Massey	USA022	PI 269821		1960
USDA065	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Reino Unido	M. cultivado			Aa175	USA022	PI 269825		1960
USDA066	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Dinamarca	Descon.			G 16703	USA022	PI 270536		1961
USDA068	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	China	Silvestre	Ungar		Ungar	USA022	PI 271115		1938
USDA069	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	China	Cultivar			Tibeticum	USA022	PI 271118		1938
USDA070	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Alemania	M. cultivado			Zeylanicum	USA022	PI 272175		1961
USDA071	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Grecia	M. cultivado.			Arvense	USA022	PI 272184		1961
USDA072	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Alemania	M. cultivado.			Lucienhoferw	USA022	PI 272215		1961
USDA073	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Polonia	M. cultivado.				USA022	PI 272218		1961
USDA076	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Ecuador	Silvestre			G 11058	USA022	PI 273605		1961
USDA077	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Noruega	M. cultivado			G 11173	USA022	PI 274584		1961
USDA078	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Suecia	M. cultivado			G 11250	USA022	PI 275821		1961
USDA079	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Suecia	M. cultivado			G 11254	USA022	PI 275825		1961
USDA080	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Israel	M. cultivado			Palestinicum	USA022	PI 280603	origen Rusia	1962
USDA081	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Rusia	M. cultivado			Amplissimo Local	USA022	PI 280609		1962
USDA082	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Ucrania	M. cultivado	Viktoria		Amplissimo Viktoria	USA022	PI 280611		1962
USDA083	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Estonia	M. cultivado	Hamisepp		Amplissimo Hamisepp	USA022	PI 280617		1962

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
USDA084	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Polonia	Cultivar	Warszawa		Konserwoy 1 Har	USA022	PI 285722		1963
USDA085	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Nepal	Descon.	Katmandu		G 12600	USA022	PI 286430		1963
USDA086	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Tailandia	M. cultivado	Bangkok		G 12661	USA022	PI 286607		1963
USDA087	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Francia	Cultivar			Quiki	USA022	PI 288025		1963
USDA088	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Bulgaria	Descon.	Sofia		No. 30	USA022	PI 293426		1963
USDA089	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Costa Rica	Local	San Jose		Verja	USA022	PI 307666		1965
USDA090	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Oceanía	Australia	Descon.	Camberra		CPI 12559	USA022	PI 314794		1966
USDA091	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Oceanía	Australia	Descon.	Camberra		CPI12561	USA022	PI 314795		1966
USDA092	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Hungría	Cultivar			Gris D'Hiver	USA022	PI 324697		1968
USDA093	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Rumanía	Descon.			No. 833	USA022	PI 324706		1968
USDA094	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Turquía	Descon.			1-301	USA022	PI 340128		1969
USDA095	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	E.E.U.U.	M. cultivado	Idaho		G 18305	USA022	PI 343292		1969
USDA096	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	E.E.U.U.	M. cultivado	Idaho		G 18461	USA022	PI 343331		1969
USDA097	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Uganda	M. cultivado	Nairobi		Col. 6946	USA022	PI 343824		1969
USDA098	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Turquía	M. cultivado	Orhanía		Biselia	USA022	PI 343958		1969
USDA105	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	M. cultivado	Juttar Pradesh, Hansi		PLP 82	USA022	PI 347490		1970
USDA106	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Japón	Cultivar	Komidori		Komidori	USA022	PI 355906		1970
USDA107	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	Descon.	Punjab, Baswa		PLP 174	USA022	PI 356986		1970
USDA108	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	India	Descon.	Haryana, Palwal		PLP 196	USA022	PI 356991		1970
USDA109	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Serbia Montenegro	Cultivar	Tetovo		Kiflica	USA022	PI 357292		1970
USDA111	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	África	Etiopía	M. cultivado	Wando Ginet		22758	USA022	PI 358620		1970
USDA112	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Canadá	M. cultivado	Manitoba		BR 1-49-9	USA022	PI 365419		1971
USDA113	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Oceanía	NuevaZelan da	M. cultivado			G 22442	USA022	PI 371796		1972
USDA114	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Asia	Malasia	Local	Kea		Red Flower 1	USA022	PI 378157		1973
USDA115	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Rep. Checa	M. cultivado	Central Bohemia		Spath's Weinhensteph aner	USA022	PI 393490		1975

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código acesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
USDA116	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Oceanía	Nueva Zelanda	Cultivar	South Island	Pania	Pania	USA022	PI 411141		1976
USDA117	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Oceanía	Nueva Zelanda	Cultivar	South Island	Patea	Patea	USA022	PI 411142		1976
USDA118	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Oceanía	Nueva Zelanda	Cultivar	South Island	Piri	Piri	USA022	PI 411143		1976
USDA119	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Hungría	Cultivar			NZ51	USA022	PI 413685		1976
USDA120	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Hungría	Cultivar			Grune Perle	USA022	PI 413698		1976
USDA121	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Rusia	Cultivar			Torsdag	USA022	PI 429843		1978
USDA122	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Letonia	M. cultivado			Rota	USA022	PI 476409		1981
USDA123	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Rusia	M. cultivado	Ulianovsk		Ul'ianovkij- 72	USA022	PI 476413		1981
USDA124	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Ecuador	M. cultivado			E8454-A-F	USA022	PI 486131		1984
USDA125	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	América	Chile	M. cultivado			G 27915	USA022	PI 494077		1984
Victor Windham ZP0064	<i>P. sativum</i> <i>P. sativum</i> <i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i> <i>P. sativum</i> <i>P. sativum</i>	Descon. Descon. Europa	Descon. Descon. España	Mejorado Mejorado Semisilvestre	Palencia					B-141. Guis espontáneo	1987
ZP0074	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Zamora	Santibañe z		B.G. M	BGE004041		1982
ZP0076	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	León	Vidriales Paradela del Río		B.G. M	BGE004043		1982
ZP0104	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Castellón	Vall D'Alba		B.G. M	BGE001034		1979
ZP0108	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Sevilla	Salteras		B.G. M	BGE001082	Guis de verdeo	1979
ZP0109	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Badajoz	Maguilla		B.G. M	BGE001100	Titos	1979
ZP0110	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Murcia	Truyols		B.G. M	BGE001121	Negrer	1979
ZP0115	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Islas Balears	M. de la Salud		B.G. M	BGE001414		1979
ZP0126	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Badajoz	Jerez d los Caballero s		B.G. M	BGE001646	Chicharros	1979
ZP0138	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Silvestre	Oviedo	Boracan S. Cristobal		B.G. M	BGE002028	Arvello	1981
ZP0150	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Pontevedra	Garellas		B.G. M	BGE002165		1981

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
ZP0152	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Zamora	Santibañe z de Vid		B.G. M	BGE002167	Titos	1981
ZP0156	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	La Coruña	Castiñeiro		B.G. M	BGE003046	Garbanzos	1981
ZP0177	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Oviedo	Hospital		B.G. M	BGE003312	Arvejos	1981
ZP0181	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Oviedo	Jomezana		B.G. M	BGE003316	Arvejos	1981
ZP0184	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Oviedo	Baja Soto de los Infantes		B.G. M	BGE003319	Arvejos	1981
ZP0202	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Lugo	Corvelle		B.G. M	BGE003436	G. Bajo	1981
ZP0206	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Lugo	Corvelle		B.G. M	BGE003440	Guis Altos	1981
ZP0213	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Zamora	Tagarabue na		B.G. M	BGE003690		1982
ZP0312	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Suecia	Ecotipo			NGB102019 / WBH 2019	NGB	BGL2019	Blå-ärt Landrace	1982
ZP0344	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Palencia	Cervera de Pisuerga			Pi23		
ZP0421	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	León	Matadeón de los Oteros				Titos redondos	1986
ZP0516	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Palencia	Fontecha de la Peña	Multifreezer 102	B.G. M	BGE005515		1980
ZP0535	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Huelva	Cumbres S. Bartolome		B.G. M	BGE001662	Chicharros	1985
ZP0593	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Ecotipo	Salamanca	Bejar		B.G. M	BGE001519	Local esp (INIA)	1985
ZP0594	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Ecotipo	Salamanca	Bejar		B.G. M	BGE001774	Local esp (INIA)	1985
ZP0798	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Granada	Albunan	NC22102	INIA	NC22102	Mangano	1987
ZP0808	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Granada	Balzares	NC24185	INIA	NC24185	Pesol	1987
ZP0839	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Huesca	Alquezar	NC019491	INIA	NC019491	Tiroco	1985
ZP0840	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Guadalajara	Yelamos de Arriba	NC19955	INIA	NC19955		1986
ZP0844	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Cuenca	S. Lorenzo de la Parr.	NC020686	INIA	NC020686		1986
ZP1261	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Tenerife, Canarias	Puntallana	NC035767	INIA	BGE019598		1998
ZP1263	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Asturias	Veriña	NC040155	INIA	BGE019778		1990

ENTRADA	Clasif. Tax. (fuente)	Clasif. Tax. (Maxted y Ambrose, 2000)	Continente	País	Estatus	Población	Localidad	Núm / Código accesión	Código Donante	Otros Códigos	Comentarios	Año donación
ZP1264	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Zaragoza	Pina de Ebro	NC41741	INIA	BGE020326		1998
ZP1282	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Asturias	Luanco	NC047638	CRF Mad	BGE023273		1998
ZP1290	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	La Coruña	Zas	NC047647	CRF Mad	BGE023282		1998
ZP1300	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Cantabria	Peñarrubi a	NC50925	CRF Mad	BGE024375		1998
ZP1301	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Cantabria	Lamason	NC50937	CRF Mad	BGE024376		1998
ZP1305	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Cádiz	Sanlúcar Barramed a	NC52146	CRF Mad	BGE025263		1998
ZP1311	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Badajoz	Mirandilla	NC52439	CRF Mad	BGE025269		1998
ZP1311	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Badajoz	Mirandilla	NC52439	CRF Mad	BGE025269		1998
ZP1315	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	León	Villamaní n	NC52911	CRF Mad	BGE025273		1998
ZP1327	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Caceres	Castañar de Ibor	NC52500	CRF Mad	BGE026431		1998
ZP1355	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	Orense	Xinzo de Limia	NC47689	CRF Mad	BGE028998		1998
ZP1358	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	España	Local	La Coruña	Lousame	NC47694	CRF Mad	BGE029002		1998
ZP1525	<i>P. sativum</i>	<i>P. sativum</i>	Europa	Reino Unido	Descon.			VINEO			Vineo	2002
GP2461	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP2464	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3150	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3152	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3154	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3259	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3259	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3261	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3494	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3499	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3500	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP3508	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							
GP4206	<i>P. sativum?</i>	Descon.	Europa	Portugal	Descon.							

Anexo III.2. Marcadores moleculares SSR, RBIP, ASP, CAPS, dCAPS, Size y STS seleccionados

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER	Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER	Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
ASP	AgpS1	55			CAPS	Sbe2	62		Eco RI	RBIP	2385-X64	55		
ASP	Gbsts1	51			CAPS	Sps	58		Rsa I	RBIP	281-X1	55		
ASP	Gbsts2	57			CAPS	SS	60		Hpa II	RBIP	281-X16	55		
ASP	NTH1	51			CAPS	Sucsyn	51		<i>Tas I</i>	RBIP	281-X40	55		
ASP	Pore	55			CAPS	Sus3	60		<i>Bal I</i>	RBIP	281-X44	55		
ASP	Rbcs	53			CAPS	ThiolP	55		Mbo II	RBIP	281-X5	55		
CAPS	Abi3	55		Pci I	CAPS	Tip	60		Hae III	RBIP	399-14-9	55		
CAPS	ACCOx	55		Mse I	CAPS	Ugfgt	55		Ava II	RBIP	399-80-46	55		
CAPS	AgpI1	60		<i>Sna I</i>	dCAPS	catAAtrans	54		Ssp I	RBIP	399-9X	55		
CAPS	AgpS2	60		<i>Sna I</i>	dCAPS	Elsa	55		Alu I	RBIP	399-X131	55		
CAPS	bfruct	55		<i>Tas I</i>	dCAPS	Ga20ox	50		Hae III	RBIP	45-X15	55		
CAPS	Cwi1	55		Tha I	dCAPs	Sym29	50		<i>Bme1390 I</i>	RBIP	45-X20	55		
CAPS	Cwi2	60		<i>Taa I</i>	RBIP	1006NR13	55			RBIP	45-X29	55		
CAPS	DHPS1	55		Mbo I	RBIP	1006NR2	55			RBIP	45-X31	60		
CAPS	DipeptIV	55		Alu I	RBIP	1006NR27	58			RBIP	45-X33	60		
CAPS	Eno12B	60		<i>NmuC I</i>	RBIP	1006NR32	60			RBIP	64-X11	55		
CAPS	FabatinL	55		Hpy188 I	RBIP	1006NR9	55			RBIP	64-X14	55		
CAPS	Gpt	60		Hin4 I	RBIP	1006-x19	55			RBIP	64-X15	55		
CAPS	Htrans	58		Sca I	RBIP	1006-x21	55			RBIP	64-X29	55		
CAPS	N3like	55		Hinf I	RBIP	1006-X36	55			RBIP	64-X40	55		
CAPS	Nin	60		Nru I	RBIP	1006-X50	55			RBIP	64-X45	55		
CAPS	Nip	60		Mbo II	RBIP	1006-X58	55			RBIP	64-X74	55		
CAPS	Nlm	60		<i>Mae III</i>	RBIP	1006-X6	55			RBIP	64-X76	55		
CAPS	O2like	55		Taq I	RBIP	1794-1	55			RBIP	95-X19	55		
CAPS	P54	60		Alu I	RBIP	1794-2	55			RBIP	95-X2	55		
CAPS	PepC	57		Hinf I	RBIP	1794-X35	55			RBIP	95-X25	55		
CAPS	Peptrans	58		Pci I	RBIP	1794-X9	55			RBIP	95-X43	55		
CAPS	Pip1	65		<i>Bspl 19I</i>	RBIP	2055NR1	55			RBIP	Birte-B1	55		
CAPS	Pip2	66		Hpa II	RBIP	2055NR16	60			RBIP	Birte-X16	55		
CAPS	PM34like	60		Taq I	RBIP	2055NR23	60			RBIP	Birte-X34	55		
CAPS	PsAAP1	57		Taq I	RBIP	2055NR51	55			RBIP	Birte-X5	55		
CAPS	PsAS1	58		<i>Ehe I</i>	RBIP	2055NR53	55			Size	Aldo	65		
CAPS	PsAS2	58		Rsa I	RBIP	2055-X19	55			Size	Clpser	58		
CAPS	PsKao2	55		<i>Sec I</i>	RBIP	2055-X29	55			Size	Egl1	69		
CAPS	PutTIP	60		<i>Mae III</i>	RBIP	2055-X36	57			Size	Ga2ox	55		
CAPS	Rgp	55		Hae III	RBIP	2385-X23	55			Size	Gns2	55		
CAPS	RNAhel	60		Alu I	RBIP	2385-X56	55			Size	Gs3B	57		

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
Size	Gsp	50		
Size	Ppgm	60		
Size	PsAAP2	55		
Size	PsAAT1	57		
Size	Ptrans	55		
Size	Sugtrans	58		
Size	Sut1	55		
Size	Xyft	57		
SSR	A6	51	2,5	
SSR	A9	56	2,5	
SSR	AA1	61	1,5	
SSR	AA102.2	51	2,5	
SSR	AA107	51	1,5	
SSR	AA112	51	1,5	
SSR	AA122	61	1,5	
SSR	AA135	51	1,5	
SSR	AA153	51	1,5	
SSR	AA155	51	1,5	
SSR	AA160	55	2,5	
SSR	AA164	51	1,5	
SSR	AA169	61	1,5	
SSR	AA170	61	1,5	
SSR	AA174	51	1,5	
SSR	AA175	61	1,5	
SSR	AA176	51	1,5	
SSR	AA200	61	1,5	
SSR	AA205	51	1,5	
SSR	AA206	56	1,5	
SSR	AA219	61	1,5	
SSR	AA221	51	1,5	
SSR	AA223	51	2,5	
SSR	AA228	61	1,5	
SSR	AA229	51	1,5	
SSR	AA233	61	1,5	
SSR	AA238	51	1,5	
SSR	AA239	56	1,5	
SSR	AA241	51	1,5	
SSR	AA246	51	1,5	
SSR	AA250	61	1,5	

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
SSR	AA258	56	1,5	
SSR	AA260	61	1,5	
SSR	AA27	51	1,5	
SSR	AA278	61	1,5	
SSR	AA285	51	1,5	
SSR	AA29	51	1,5	
SSR	AA297	54	1,5	
SSR	AA303	61	1,5	
SSR	AA304	61	2,5	
SSR	AA315	51	1,5	
SSR	AA316	61	1,5	
SSR	AA317	51	1,5	
SSR	AA321	61	2,5	
SSR	AA322	51	1,5	
SSR	AA332	51	1,5	
SSR	AA335	61	1,5	
SSR	AA339	51	1,5	
SSR	AA345	61	1,5	
SSR	AA349	55	1,5	
SSR	AA355	51	1,5	
SSR	AA366	56	1,5	
SSR	AA369	61	1,5	
SSR	AA37	55	1,5	
SSR	AA378	61	1,5	
SSR	AA387	55	1,5	
SSR	AA397	61	1,5	
SSR	AA398	51	1,5	
SSR	AA399	55	1,5	
SSR	AA403	55	1,5	
SSR	AA416	61	1,5	
SSR	AA427337	50	1,5	
SSR	AA427337	50	1,5	
SSR	AA430902	54	1,5	
SSR	AA430942	54	1,5	
SSR	AA430942	54	1,5	
SSR	AA44	61	1,5	
SSR	AA444	61	1,5	
SSR	AA446	51	1,5	
SSR	AA456	56	1,5	

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
SSR	AA475	56	1,5	
SSR	AA486.1	61	1,5	
SSR	AA491	55	1,5	
SSR	AA497	55	1,5	
SSR	AA5	61	1,5	
SSR	AA504	61	1,5	
SSR	AA505	55	1,5	
SSR	AA57	51	1,5	
SSR	AA60	61	1,5	
SSR	AA67	51	2,5	
SSR	AA7	51	1,5	
SSR	AA70	61	1,5	
SSR	AA72	61	1,5	
SSR	AA9	51	1,5	
SSR	AA91	51	1,5	
SSR	AA94	51	1,5	
SSR	AA99	51	1,5	
SSR	AB100	61	1,5	
SSR	AB102	56	1,5	
SSR	AB104	56	1,5	
SSR	AB107	61	1,5	
SSR	AB109	61	1,5	
SSR	AB110	61	1,5	
SSR	AB111	56	1,5	
SSR	AB112	61	1,5	
SSR	AB113	61	1,5	
SSR	AB114	61	1,5	
SSR	AB116	61	1,5	
SSR	AB117	56	2,5	
SSR	AB119	61	1,5	
SSR	AB120	50	1,5	
SSR	AB122	61	1,5	
SSR	AB124	61	1,5	
SSR	AB125	61	1,5	
SSR	AB127	61	1,5	
SSR	AB130	61	1,5	
SSR	AB132	61	1,5	
SSR	AB133	56	2,5	
SSR	AB134	50	1,5	

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
SSR	AB137	61	1,5	
SSR	AB140	56	1,5	
SSR	AB141	61	1,5	
SSR	AB142	61	1,5	
SSR	AB146	61	1,5	
SSR	AB149	61	2,5	
SSR	AB153	61	1,5	
SSR	AB155	61	1,5	
SSR	AB156	61	1,5	
SSR	AB161	61	1,5	
SSR	AB19	50	1,5	
SSR	AB20	51	1,5	
SSR	AB22	50	1,5	
SSR	AB23	61	1,5	
SSR	AB24	51	1,5	
SSR	AB25	51	1,5	
SSR	AB27	50	2,5	
SSR	AB28	51	2,5	
SSR	AB29	50	2,5	
SSR	AB31	50	1,5	
SSR	AB32	59	1,5	
SSR	AB33	56	2,5	
SSR	AB37	62	1,5	
SSR	AB40	51	2,5	
SSR	AB41	63	1,5	
SSR	AB42	50	1,5	
SSR	AB43	50	1,5	
SSR	AB46	50	1,5	
SSR	AB49	50	1,5	
SSR	AB52	51	1,5	
SSR	AB53	51	1,5	
SSR	AB55	50	1,5	
SSR	AB57	50	1,5	
SSR	AB59	50	1,5	
SSR	AB64	61	1,5	
SSR	AB65	51	1,5	
SSR	AB68	61	1,5	
SSR	AB69	50	1,5	
SSR	AB71	61	1,5	

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
SSR	AB72	55	2,5	
SSR	AB77	61	1,5	
SSR	AB85	61	1,5	
SSR	AB89	61	1,5	
SSR	AB90	50	1,5	
SSR	AB91	56	1,5	
SSR	AB92	50	1,5	
SSR	AC17	55	1,5	
SSR	AC21	61	1,5	
SSR	AC32	61	1,5	
SSR	AC58	61	1,5	
SSR	AC6	51	1,5	
SSR	AC7	51	1,5	
SSR	AC74	55	1,5	
SSR	AC75	55	1,5	
SSR	AC76a	50	1,5	
SSR	AC76b	51	1,5	
SSR	AC8	55	1,5	
SSR	AD123	61	1,5	
SSR	AD126	61	1,5	
SSR	AD134	55	1,5	
SSR	AD135	61	1,5	
SSR	AD146	51	1,5	
SSR	AD147	61	1,5	
SSR	AD148	54	1,5	
SSR	AD158	54	1,5	
SSR	AD160	51	1,5	
SSR	AD170	51	1,5	
SSR	AD174	51	1,5	
SSR	AD175	55	2	
SSR	AD234	51	1,5	
SSR	AD237	54	1,5	
SSR	AD270	51	1,5	
SSR	AD272	51	1,5	
SSR	AD275.1	61	1,5	
SSR	AD280	61	1,5	
SSR	AD54	51	1,5	
SSR	AD57	51	1,5	
SSR	AD59	51	1,5	

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
SSR	AD60	51	1,5	
SSR	AD61	51	1,5	
SSR	AD68	51	1,5	
SSR	AD73	61	1,5	
SSR	AD76	56	1,5	
SSR	AD79	56	1,5	
SSR	AD81	61	1,5	
SSR	AD83	61	1,5	
SSR	AD85	51	1,5	
SSR	AD86	51	1,5	
SSR	AD92	61	1,5	
SSR	AF004843	54	1,5	
SSR	AF004843	54	1,5	
SSR	AF016458	54	1,5	
SSR	AF016458	54	1,5	
SSR	AF029243	55	1,5	
SSR	AF042742	55	1,5	
SSR	AF109922	54	1,5	
SSR	AF29243.1	55	1,5	
SSR	AF29243.2	51	1,5	
SSR	AJ000640	60	1,5	
SSR	AJ223318	58	1,5	
SSR	B12	61	1,5	
SSR	B13	51	1,5	
SSR	B14	61	1,5	
SSR	B17	51	1,5	
SSR	C20	64	1,5	
SSR	CHPSGPA1	60	1,5	
SSR	CHPSTZPP	55	1,5	
SSR	D21	51	1,5	
SSR	D23	51	1,5	
SSR	D24	61	2,5	
SSR	L01579	55	1,5	
SSR	L11745	50	1,5	
SSR	L13320	55	1,5	
SSR	L19093	58	1,5	
SSR	L19651	58	1,5	
SSR	L41046	58	1,5	
SSR	M16903	60	1,5	

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
SSR	M37217	60	1,5	
SSR	M64619	55	1,5	
SSR	M69105	60	1,5	
SSR	M86906	60	1,5	
SSR	M94558	58	1,5	
SSR	PATRG31A	48	1,5	
SSR	PEAATPASE	55	1,5	
SSR	PEAATPSY	58	1,5	
SSR	PEACHLRO	60	1,5	
SSR	PEACPLHP	58	1,5	
SSR	PEADRR23	55	1,5	
SSR	PEAEGP1	58	1,5	
SSR	PEALCTN	50	1,5	
SSR	PEAOM14A	60	1,5	
SSR	PEAPHTAP	60	1,5	
SSR	PEARHOGT	58	1,5	
SSR	PS11824	60	1,5	
SSR	PSADH1	54	1,5	
SSR	PSAJ3318	58	1,5	
SSR	PSARGDEC	58	1,5	
SSR	PSAS	54	1,5	
SSR	PSBLOX1	54	1,5	
SSR	PSBLOX2	54	1,5	
SSR	PSBT2AGE	58	1,5	
SSR	PSCAB66	55	1,5	
SSR	PSGAPA1	51	1,5	
SSR	PSGDPP	60	1,5	
SSR	PSGSR1	58	1,5	
SSR	PSIAA6D	60	1,5	
SSR	PSJ00064	56	1,5	
SSR	PSP4OSG	58	1,5	
SSR	PSRBCS3C	58	1,5	
SSR	PSU31669	61	1,5	
SSR	PSU51918	54	1,5	
SSR	PSU58830	55	1,5	
SSR	PSU81287	58	1,5	
SSR	PSU81288	54	1,5	
SSR	PSY14273	50	1,5	
SSR	PSY14558	48	1,5	

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
SSR	PSY17134	58	1,5	
SSR	PSZINCFI	60	1,5	
SSR	U51918	54	1,5	
SSR	U58830	55	1,5	
SSR	U81287	58	1,5	
SSR	U81288	54	1,5	
SSR	X04334	58	1,5	
SSR	X04763	58	1,5	
SSR	X06281	54	1,5	
SSR	X07014 X06396 Y00715	49	1,5	
SSR	X07014 X06396 Y00715	61	1,5	
SSR	X07015 X06397 Y00715	50	1,5	
SSR	X07015 X06397 Y00715	61	1,5	
SSR	X15190	51	1,5	
SSR	X51594	58	1,5	
SSR	X56315	55	1,5	
SSR	X59773	60	1,5	
SSR	X78581	54	1,5	
SSR	X78581	54	1,5	
SSR	X87374	60	1,5	
SSR	X96764	58	1,5	
SSR	Y11824	60	1,5	
SSR	Y13321	54	1,5	
SSR	Y14273	50	1,5	
SSR	Y14558	48	1,5	
SSR	Y17134	58	1,5	
SSR	Z18288	48	1,5	
SSR	Z37540	58	1,5	
STS	agpL2			Rsa I
STS	D8C			
STS	Fbpp			Hsp92
STS	I7			
STS	K6			AluI
STS	L109			Taq I
STS	L58			
STS	M27			Rsa I
STS	P108			Taq I
STS	P202			AluI
STS	P393			Rsa I

Tipo	Nombre	Ta	MgCl ₂	ER
STS	P446			
STS	P482			Rsa I
STS	P531			
STS	P628			Hinf I
STS	P88			
STS	Paal 1,2			Dde I
STS	Pepc			Sau96
STS	Q126			
STS	Q184			
STS	Q363			AluI
STS	Q500			Rsa I
STS	Rpl22			Rsa I
STS	sB17-509			
STS	sD13-487			
STS	sM2P2-304			
STS	sM2P5-234			
STS	sN13-927			
STS	sO12-581			
STS	SPS2			
STS	sT11-800			
STS	SUS3			
STS	sV06-895			

Anexo III.3. Sistemas de amplificación, gen o proteína codificante y número de accesión

Sistema amplificación	Gen / Proteína codificada	Accession number
Ps_001	invertasa (beta-fructofuranosidasa)	X73957
Ps_002	beta-1,3 glucanasa (gns2 gen)	AJ251646
Ps_003	proteína inducida por auxina	X68217
Ps_004	Proteína transportadora de auxina flujo-dependiente (PIN1)	AY222857
Ps_005	aspartato carbamoiltransferasa (pyrB1 gen)	M96981
Ps_006	apirasa	AB022319
Ps_007	ascorbato peroxidasa	X62077
Ps_008	transportador de aminoácido (aap1 gen)	AY956395
Ps_009	aleno-óxido sintasa (aos gen)	AB095985
Ps_010	aldehído oxidasa 1 (ao1 gen)	EF491598
Ps_011	ADP-glucosa pirofosforilasa (agpS1 gen)	X96764
Ps_012	putativa adenosina 5'-fosfosulfato reductasa	AY166631
Ps_013	cloroplasto acil-ACP:sn-glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (gpat gen)	X59041
Ps_014	acetil-CoA carboxilasa (accA gen)	AB029556
Ps_015	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (acs3 gen)	AB049725
Ps_016	5,10-metilentetrahidrofolato deshidrogenasa-5,10-metilentetrahidrofolato ciclohidrolasa	AF030516
Ps_017	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A	AF303583
Ps_018	2-cisteína peroxirredoxina	AJ315851
Ps_019	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (acs2 gen)	AF016459
Ps_020	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (acs1 gen)	AF016458
Ps_021	12-ácido oxofitodienoico 10, 11-reductasa (opr1 gen)	AB044940
Ps_022	proteína P54	Y11207
Ps_023	factor de transcripción MADS-box transcription factor	AJ223318
Ps_024	proteína M2 MADS-box	AY884287
Ps_025	glutamina sintetasa	X04763
Ps_026	giberelina 3 beta-hidroxisilasa (Le gen)	AF001219
Ps_027	giberelina 20-oxidasa	U58830
Ps_028	albúmina 1 (pa1 gen)	M81864
Ps_029	proteína de respuesta al ácido abscísico	Z15128
Ps_030	inhibidor tripsina/quimiotripsina (ti7V gen)	AJ414576
Ps_031	sucrosa sintasa	AJ012080
Ps_032	alcohol deshidrogenasa A de cadena corta	AB087840
Ps_033	S-adenosilmetionin sintetasa-1 (sams-1 gen)	AB087842
Ps_034	piruvato deshidrogenasa quinasa mitocondrial isoforma 1 (pdk1 gen)	EU153567
Ps_035	proteína pore	Z73553
Ps_036	isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP	AY509880
Ps_037	malato deshidrogenasa (MDH gen)	AY166633
Ps_038	lipoxigenasa LoxN3 (LoxN3 gen)	AF098270
Ps_039	isoflavona sintasa (CYP93C18)	AF532999
Ps_040	isoamilasa isoforma 1	DQ092413
Ps_041	precursor de superóxido dismutasa férrica de cloroplasto (sodB gen)	AJ496175
Ps_042	gen formación gancho apical (HLS hookless)	AF277895
Ps_043	glutamato deshidrogenasa (gdh gen)	AM238439
Ps_044	putativa galactinol sintasa	AJ243815
Ps_045	fructosa 1,6 bifosfatasa	X68826
Ps_046	proteína P68 DEAD box	AF271892
Ps_047	proteína P72 DEAD box	AF188678
Ps_048	citoquinina oxidasa/deshidrogenasa 1 (ckx1)	EF030477
Ps_049	citocromo P450	AY166658
Ps_050	citocromo P450	AF218296
Ps_051	proteína putativa de transporte de auxina	AB112364
Ps_052	aminoaldehído deshidrogenasa (amadh1 gen)	AJ315852
Ps_053	adenilato isopenteniltransferasa (PSIPT2 gen)	AB194605
Ps_054	adenilato isopenteniltransferasa (PsIPT1 gen)	AB194604
Ps_055	26S proteosoma ATPasa	AY623108
Ps_056	26S proteosoma subunidad beta	AY623107
Ps_057	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa	M98357
Ps_058	alcohol deshidrogenasa (adh gen)	AB087831
Ps_059	aleno-óxido ciclasa (aoc gen)	AB095986
Ps_060	arginina descarboxilasa	Z37540
Ps_061	proteína quinasa interactuante con calcineurina b	AY191840
Ps_062	carboxipeptidasa	Z68130
Ps_063	catalasa	X60169
Ps_064	proteína interruptora de ciclo celular (ccs52a gen)	DQ059036
Ps_065	invertasa de pared celular (<i>Bfruct1</i> gen)	AF063246
Ps_066	chalcona isomerasa	U03433
Ps_067	chalcona sintasa (pschs1 gen)	X63333
Ps_068	precursor de chaperonina en cloroplasto	U21139
Ps_069	chitinasa	X63899
Ps_070	gen de control de la floración (colb gen)	AY805328
Ps_071	convicilina (cvc gen)	AJ276875

Sistema amplificación	Gen / Proteína codificada	Accession number
<i>Ps_072</i>	Cu-Zn superóxido dismutasa	AB189165
<i>Ps_073</i>	criptocromo 1 (<i>cry1</i> gen)	AY161310
<i>Ps_074</i>	ciclina d (<i>cycd1</i> gen)	AB008188
<i>Ps_075</i>	cisteína proteasa	Z68291
<i>Ps_076</i>	citosa-5 ADN metiltransferasa	AF034419
<i>Ps_077</i>	d1-pirrolina carboxilato reductasa	X62842
<i>Ps_078</i>	novel cotocromo p450 monooxigenasa inducida por herida (<i>cyp82</i> gen)	U29333
<i>Ps_079</i>	dead box ARN helicasa	AY167671
<i>Ps_080</i>	proteína homóloga defensora contra muerte celular (<i>peadad</i> gen)	U79562
<i>Ps_081</i>	dehidrina (<i>dhn1</i> gen)	X63061
<i>Ps_082</i>	proteína dof sensible a elicitador/señal (<i>erdp</i> gen)	AB026297
<i>Ps_083</i>	ferredoxina i	M17107
<i>Ps_084</i>	ga 20-oxidasa	U70471
<i>Ps_085</i>	precursor gamma-glutamilcisteín sintetasa (<i>gsh1</i> gen)	AF128455
<i>Ps_086</i>	giberelina 2-beta-hydroxilasa	AF056935
<i>Ps_087</i>	giberelina 20-oxidasa	X91658
<i>Ps_088</i>	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (<i>g6pdh1</i> gen)	DQ811791
<i>Ps_089</i>	fosfolípido glutatión peroxidasa	AJ000508
<i>Ps_090</i>	glutatión reductasa	X98274
<i>Ps_091</i>	glyceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (<i>gapc1</i> gen)	L07500
<i>Ps_092</i>	precursor glutatión sintetasa (<i>gshs</i> gen)	AF231137
<i>Ps_093</i>	proteína homóloga rica en prolina (<i>grp</i> gen)	AB087833
<i>Ps_094</i>	proteína de choque térmico	AY167669
<i>Ps_095</i>	proteína de choque térmico heat shock 22	X86222
<i>Ps_096</i>	factor de transcripción de proteína de choque térmico (<i>hsfa</i> gen)	AJ010643
<i>Ps_097</i>	putativa homoglutatión sintetasa (<i>hgshs</i> gen)	AF258319
<i>Ps_098</i>	glicoproteína-1 rica en hidroxiprolina (<i>hrgp-1</i> gen)	AB087834
<i>Ps_099</i>	lectina (<i>psl1</i> gen)	M18160
<i>Ps_100</i>	proteína knox clase 1 (<i>hop1</i> gen)	AF063307
<i>Ps_101</i>	leghemoglobina	AB009844
<i>Ps_102</i>	proteína quinasa activada por mitógenos (<i>mapk2</i> gen)	AF154329
<i>Ps_103</i>	proteína quinasa p34	X53035
<i>Ps_104</i>	peroxidasa	AB193816
<i>Ps_105</i>	peroxirredoxina mitocondrial (<i>prx</i> gen)	AJ717306
<i>Ps_106</i>	fenilalanina amonio-liasa (<i>pal</i> gen)	D10001
<i>Ps_107</i>	fosfoenolpiruvato carboxilasa	D64037
<i>Ps_108</i>	fosfolipasa c	Y15253
<i>Ps_109</i>	proteína similar a fototropina (<i>pspk4</i> gen)	U83281
<i>Ps_110</i>	fitoeno desaturasa (<i>pds</i> gen)	AJ621573
<i>Ps_111</i>	antígeno de proliferación celular nuclear	AB008186
<i>Ps_112</i>	proteína rica en prolina y leucina	Z67873
<i>Ps_113</i>	proteína rica en prolina	AJ233399
<i>Ps_114</i>	rafinosa sintasa (<i>rfs</i> gen)	AJ426475
<i>Ps_115</i>	piruvato descarboxilasa (<i>pcd1</i> gen)	Z66543
<i>Ps_116</i>	piruvato deshidrogenasa mitocondrial e1 subunidad alpha	U51918
<i>Ps_117</i>	ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa (<i>rubp</i> gen)	M25613
<i>Ps_118</i>	ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa	AF369887
<i>Ps_119</i>	sadenosilmetionina descarboxilasa (<i>samdc</i> gen)	U60592
<i>Ps_120</i>	proteína putativa asociada a senescencia (<i>ssa-1</i> gen)	AB049712
<i>Ps_121</i>	proteína putativa serín carboxipeptidasa cp-b (<i>cp-b</i> gen)	AJ251970
<i>Ps_122</i>	proteína de cloroplasto "stay-green" inducible por senescencia (<i>sgr</i> gen)	AB303331
<i>Ps_123</i>	proteína quinasa relacionada con <i>snf1</i> (<i>snrk1</i> gen)	AJ971810
<i>Ps_124</i>	<i>snf5</i> (<i>snf5</i> gen)	DQ539420
<i>Ps_125</i>	proteína similar a <i>sos1</i>	EF219135
<i>Ps_126</i>	estaquiosa sintasa (<i>sts1</i> gen)	AJ311087
<i>Ps_127</i>	proteína transportadora de sucrosa (<i>suf4</i> gen)	DQ221697
<i>Ps_128</i>	superóxido dismutasa (<i>sod</i> gen)	AB087845
<i>Ps_129</i>	<i>sym8</i> relacionado con simbiosis (<i>sym8</i> gen)	EF447277
<i>Ps_130</i>	tioredoxina h (<i>trhx</i> gen)	AJ310990
<i>Ps_131</i>	inhibidor de tripsina (<i>ti</i> gen)	AJ296169
<i>Ps_132</i>	vicilina	Y00722

Anexo III.4. Descripción de los sistemas de amplificación diseñados a partir de genes secuenciados en guisante

Nombre	Nº Accesoión	Cebador <i>Foward</i>			Cebador <i>Reverse</i>		
		Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'	Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'
<i>Ps_001</i>	X73957	18	58	CCCTCGAAGGCCAAATCA	17	59	GCCACCCGCCACTCATT
<i>Ps_002</i>	AJ251646	19	59	TCGGCAATGAAGGCTCTTG	19	59	GAAGGCCAACCCGTTTCAC
<i>Ps_003</i>	X68217	21	58	GGTGGTGTGGAAGAAAATGGA	20	59	GCCACCCGACAACCTTGATTC
<i>Ps_004</i>	AY222857	22	59	TGTTTCAGGAATCAACCGTTTTG	24	59	TTGAGGCTATGAAATGGAATGAGA
<i>Ps_005</i>	M96981	17	58	CCATGGCCGTCGAGTTG	22	59	CGATTTTTCCGAAACTCCAAC
<i>Ps_006</i>	AB022319	21	59	TGGTTGATGCAAGCACACCTA	27	58	GCAAGCTTCTTTAGCTTTAGTCTCAAT
<i>Ps_007</i>	X62077	22	59	GAGATTACCGGTGGACCTGAAG	19	60	GGTGGTGGCTCAGGCTTGT
<i>Ps_008</i>	AY956395	25	58	TCGATTCTAAGTTTTTCGATGATGA	20	59	GGGCACTTGCAGTCCAAGAT
<i>Ps_009</i>	AB095985	21	58	GCGGTTACCGAATCCTCTCTT	21	58	AGCGTTTGAGTTGGTCGTGTT
<i>Ps_010</i>	EF491598	18	58	CTCCTCGACCGCTTGGA	24	59	CCTTGCATGAAGATACCTGAACAA
<i>Ps_011</i>	X96764	18	60	TCGGCGTCCTTGAATCGA	23	59	CATTTTTGTAGCCACCCAAGTTG
<i>Ps_012</i>	AY166631	24	59	TTGCATTCACAAGGATACATTCC	18	58	TGTTGTCCGGGCAAGACA
<i>Ps_013</i>	X59041	21	59	GGATTGCTCCAAGTGGTGGTA	16	60	GGTGCCGGTGCCC ATT
<i>Ps_014</i>	AB029556	25	59	CAAGTAACCTGATCCCAATATGAA	20	59	TTGAGTGGCTGGAACGTTGA
<i>Ps_015</i>	AB049725	22	59	GGGAATCAAGTGTTCGAAAGT	22	59	CGACGGTTTTCTCCTTTAACGA
<i>Ps_016</i>	AF030516	23	58	TTGCACAACTATCCGATCTGAA	23	59	AACCTTGCCGTAATTTGTGAGA
<i>Ps_017</i>	AF303583	24	60	TCGCTAAAGATGACTCGAGGAAGT	20	58	CGTTGGTGTGCGTTTCAGAA
<i>Ps_018</i>	AJ315851	18	58	CCCCAATGCACCCAATTC	20	60	GGAGCGGTTGAGGGAAAGAG
<i>Ps_019</i>	AF016459	24	59	TGGAAAGCCTATGACAAAGATCCT	20	58	TGCAAGACCCATTTGGATGA
<i>Ps_020</i>	AF016458	24	58	TGCATTTAATAAGCGACGAGATTT	21	59	TTCCATGACGCTGACGAAGTT
<i>Ps_021</i>	AB044940	20	58	AATTCGGCACGAGCGTTAAT	20	58	AGAGGAATGGCATTGGCAAT
<i>Ps_022</i>	Y11207	23	58	AACTCACAACATGCAAAGACCAA	22	58	CCATGCATATCCGTTTGTCTTC
<i>Ps_023</i>	AJ223318	20	58	CAGGGTGATCCAGGGTCAGT	24	58	CATGGTAACCATCCACCCATATAG
<i>Ps_024</i>	AY884287	23	58	TTGTACCTCAACCATTTGGAGACA	25	59	TTGGCTTCCTTCATTATCACCTCTA
<i>Ps_025</i>	X04763	22	59	GGCATTAAACATCAGTGGCATCA	22	59	AGAAGGGCCAACCTGAAATTCC
<i>Ps_026</i>	AF001219	18	60	TGTGCGGCCCTCCAATTA	18	59	CGAGACCCATCGCGTGAT
<i>Ps_027</i>	U58830	19	58	GCGCTCTCTTGGCCTTTCT	28	58	AGAAATAAGACAAAGGAAGAGGTTTCATT
<i>Ps_028</i>	M81864	23	59	CAAGTGTAGCTGGTTTCCTTTTCG	23	59	GGCAAACAAGACGATCAAAGAAG
<i>Ps_029</i>	Z15128	20	59	GGAGGACCAGGGCTACATGA	20	59	CCGTCAGAACCAGCCAAAAT
<i>Ps_030</i>	AJ414576	20	58	TCGCCGCAATGTTGTTAAC	23	59	CACCATTGGAGAGCACTTGAGTT
<i>Ps_031</i>	AJ012080	18	59	TTGCCACCATGGGTTGCT	26	60	CATTCCTCTCAGATACTCCAGACA
<i>Ps_032</i>	AB087840	19	60	CCGGCAAAGTAGCCATCGT	20	59	CAAAGAGATGCGCCGTCTCT

Nombre	Nº Acceso	Cebador Forward			Cebador Reverse		
		Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'	Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'
Ps_033	AB087842	23	59	GAGCAGCAGAGTCCTGATATTGC	22	58	ACCAATTTCTCAGGCTTCTTG
Ps_034	EU153567	22	58	GTTGAGTTGCACAATCCCAATC	23	60	CCACAGGAGACATTTTCGTGTGT
Ps_035	Z73553	19	60	GGCACCAGGGACTGGAAGA	21	59	CAGATACCAGAGCCCCTGTCA
Ps_036	AY509880	21	58	CATGGGACAGTTACCCGTCAT	21	59	CTATGCCGTTTGTGCTGGTTT
Ps_037	AY166633	19	58	GCCAACCAGAGGATTGCAA	22	58	CATCACCTCCTTCCTGGAAATT
Ps_038	AF098270	19	58	TCCACATTACCGCGACACA	19	59	CCTCGGCATTGACCAACAC
Ps_039	AF532999	21	59	GGAGAACGTTATGGCCCTTTG	23	59	GATCGGGAGTGGATAACAATG
Ps_040	DQ092413	20	58	AATGGCTGGCATGGTACCTT	21	59	TGGATATTTTCAGCGGCAAGTC
Ps_041	AJ496175	21	58	CAATGCAGCACAGGTATGGAA	17	59	CCGCCACCACCAGGTTT
Ps_042	AF277895	18	58	TTTCGCGCACCGTGTAAG	20	59	GGCGTCGTTTTGGTGTAAAGC
Ps_043	AM238439	24	59	TTCGTTATTACAGGGTTTTGGAAAT	24	59	TTTTTCCACCTTTCTCATCAATCA
Ps_044	AJ243815	22	59	GGTTTGCCAAAAGGTTTACGAA	18	58	TCTGGAAGCACGGCAACA
Ps_045	X68826	20	58	GGCTGGTGGAAAAGGTTTCAG	23	59	TGGAACACGTTGATGAATTTCTG
Ps_046	AF271892	17	59	CAGGGCGTGCAGGATCA	23	60	TCACAAGGAACATGTCACGATCA
Ps_047	AF188678	20	59	TCAAGGCTGCACCATCTCAA	20	58	CATTGCGTTCATCATTGCT
Ps_048	EF030477	17	59	ACTTCGGCGGCCTGAAA	20	58	CGGTGGAGTATGGACGGATT
Ps_049	AY166658	20	59	AATACGGCGACATCGTTTCC	21	58	GCCGAAGAGATGACGACAAC
Ps_050	AF218296	21	59	CATCTATGGTTTCGGCTCCAAA	21	58	AGAAAGGCTTTTCGCCATTTCT
Ps_051	AB112364	21	58	CTTCGCCTAGATTCGGGTTTT	18	59	ATTCGGCGCAGGATACGA
Ps_052	AJ315852	20	60	CGTCGACCCGAGCATTTAAA	21	60	TCGAGGTGGTCACATCGGTTA
Ps_053	AB194605	18	60	GCGGCCACCCATTAAAGG	21	59	TGTGCCCAAACATGTCAATTG
Ps_054	AB194604	20	59	AACCGCTGATCCTGATTCTGA	16	59	GCGAGCGTCGCGTGTT
Ps_055	AY623108	24	60	GGTGATAACGAGGTTACGCGTACT	19	59	TGTTTCCTCGGGCATCAAAA
Ps_056	AY623107	22	58	ACTGTCAGTTTTGGCATCGAAA	22	58	GAAATTCCTTCGCTTGTTGCAA
Ps_057	M98357	22	58	GATTTGGATTGGGAAAGCACTT	24	58	CATCAAGATCTGGGATCTCTGAGA
Ps_058	AB087831	20	60	GCGCTGGTGAATTGAAGAAGT	20	60	GTGACTGCACACACAGCAGA
Ps_059	AB095986	19	59	GTTGCTTGGGAACCCTGTT	20	60	GAGGCATGAGGCTGAGTAGC
Ps_060	Z37540	20	60	CAAGGAAGCTGGCTTTGAAC	20	60	CACAATGGCCCTACCACTCT
Ps_061	AY191840	20	60	AGCGTTGGAATCGGTATCAG	20	60	ATGTTTGTCAATGGCGGAAT
Ps_062	Z68130	20	59	CCAAGGCTGCATTAGAGAT	20	60	CATCTATGGATTTCGGCAAGG
Ps_063	X60169	27	60	ATTTTCTCTAATCCCTATCTTCTGCTC	19	60	GGGACACCCACATCATCAA
Ps_064	DQ059036	20	60	AAATCTCCGTCACGTGGAAC	20	60	TAACCGATGCCCTTCCATAG
Ps_065	AF063246	20	60	GTGTGGGCCATTACAGTATC	20	59	AAGGGTGGATTGCATGATCT
Ps_066	U03433	19	61	TCTCCGGTCACCGAAAATC	25	59	TTCCATTGATAGTTAACCCTCTCTC

Nombre	Nº Accesoión	Cebador <i>Foward</i>			Cebador <i>Reverse</i>		
		Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'	Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'
<i>Ps_067</i>	X63333	20	60	GCTCGTGTGTTGGTTGTTTG	20	60	ACTTCCCTAGTGGCCCTCAT
<i>Ps_068</i>	U21139	20	60	GGTGCAAACCCTGTGCTTAT	20	60	TTGTCCAAGGTAAGGCCAAC
<i>Ps_069</i>	X63899	20	59	TCCAACACCGACAATACCAA	20	59	GGAACAAGCCTTCCAACATC
<i>Ps_070</i>	AY805328	21	59	AGCAACACTATTCTGCCGTTG	20	59	CCTGGATGTTGGAGTCACAG
<i>Ps_071</i>	AJ276875	20	59	GAGAAGCCACAAGCCAGAAT	20	60	CCTTGCTCCTTTTGTTCAGG
<i>Ps_072</i>	AB189165	20	59	TGGTCACGAGCTTAGCAAAA	22	59	TGCAACCCAATAATACCACAAG
<i>Ps_073</i>	AY161310	20	60	AAAACGGAACCGAAGAAGGT	20	60	GGTAGGCGTGTCCAACATC
<i>Ps_074</i>	AB008188	21	59	GGCAAGATGAAAGAGGAGTGA	25	59	AAAACATAATCTTCATTGCCAACTT
<i>Ps_075</i>	Z68291	20	60	TGGAATCAGCTTACGCACAG	20	60	AAGTCATCACCAAGGCATCC
<i>Ps_076</i>	AF034419	20	60	ATCCATCCGAACAGATTTGG	20	60	TTCCTCAGCATCCTCGTCTT
<i>Ps_077</i>	X62842	22	59	GGCAGTGGTCCTGCTTATATT	20	60	GACCAGCTGCTACTCCTCCA
<i>Ps_078</i>	U29333	20	60	GGGCATGAAAAGGAAATGAA	20	60	TCCAAATGGCAACAACCTCAA
<i>Ps_079</i>	AY167671	20	60	TCAGCAAAGGGGAATTGTTG	20	60	CAGAGTGTGTCCAGCTTCCA
<i>Ps_080</i>	U79562	20	60	CGCACTCCTTCAGGATGTTT	23	59	AGGAAGGAGTTAAATGGAAATGG
<i>Ps_081</i>	X63061	24	59	TCCTGGTACTGAACAATCAAGAAC	20	59	GCTCCGTAACCAGTTGATCC
<i>Ps_082</i>	AB026297	20	60	ATATCCCACTCCAACGACGA	20	60	AATGCATTCCATTTCCAAGG
<i>Ps_083</i>	M17107	20	60	AATGGCTTTTCTCGGTTTGAA	20	60	ACGCCAACAACTTTACCAG
<i>Ps_084</i>	U70471	20	60	ACCATTGGTGAAGCATGTGA	20	60	TGTTGTTCACTACTGCCCTA
<i>Ps_085</i>	AF128455	20	60	CCTCCAACCTGAAGACGCTGT	21	59	AATCGATGAGATCCTGTTTCG
<i>Ps_086</i>	AF056935	27	60	GAGTGACTGTCTTTTATAGGGTTAATCA	22	59	CCAATCAAATTCTCACCATTGA
<i>Ps_087</i>	X91658	20	60	CCCTCCATGTCAAAAACCTG	26	59	AGTTAAAGATGTTGGATCACAATGAG
<i>Ps_088</i>	DQ811791	22	60	CGAAGGCTTTTCTATCTTGCAC	21	59	TGATCATCTTGCAAACAGACG
<i>Ps_089</i>	AJ000508	20	60	GCTTCTCCAATTTCCAAT	26	59	AACTTTAACTACTTGTGACCTTGTGC
<i>Ps_090</i>	X98274	20	60	ACCCAATTGGATGGCACTAA	20	60	GCTTGCCCACCAATACTGT
<i>Ps_091</i>	L07500	20	60	GAATCAACGGATTCGGAAGA	20	60	TCCTTTCAACTTGCCCTCAG
<i>Ps_092</i>	AF231137	20	60	CATGGGAAATTGCTTGGTCT	20	60	CTCACAGCATCCCCGTAAAT
<i>Ps_093</i>	AB087833	20	60	AGGAGGCGGTGGTGATAGAT	18	60	CCGCCACCACGAGAGTAG
<i>Ps_094</i>	AY167669	20	60	TTGGCAACCGAAGGAGTAAC	20	59	GCACACAAATTGAAGCAACC
<i>Ps_095</i>	X86222	23	59	CGGAGCTTAAGTCAAGTCCTAAA	19	60	GCAGAAAGGACCGGATTGT
<i>Ps_096</i>	AJ010643	26	60	CGATTAAGAGAAGAAGAAATGTAGCA	20	61	TTCCCACCAACCAACTTTTG
<i>Ps_097</i>	AF258319	22	59	TCTCAACAGCTGAACGTAGAGG	21	59	TTCAAGAAGCTGGGAGAAGAA
<i>Ps_098</i>	AB087834	20	60	CCACCAAAGGATCCATACCA	20	59	TGTGGGTGAGGATAGGTGTG
<i>Ps_099</i>	M18160	25	59	CGCTCTATAAAGACACGTAGAATGA	21	60	CATGCATGCACATGCTGTACT
<i>Ps_100</i>	AF063307	20	60	TACCATAAAACCCGGGTGAC	20	60	CTGGATCTTCCCCTATGCAA

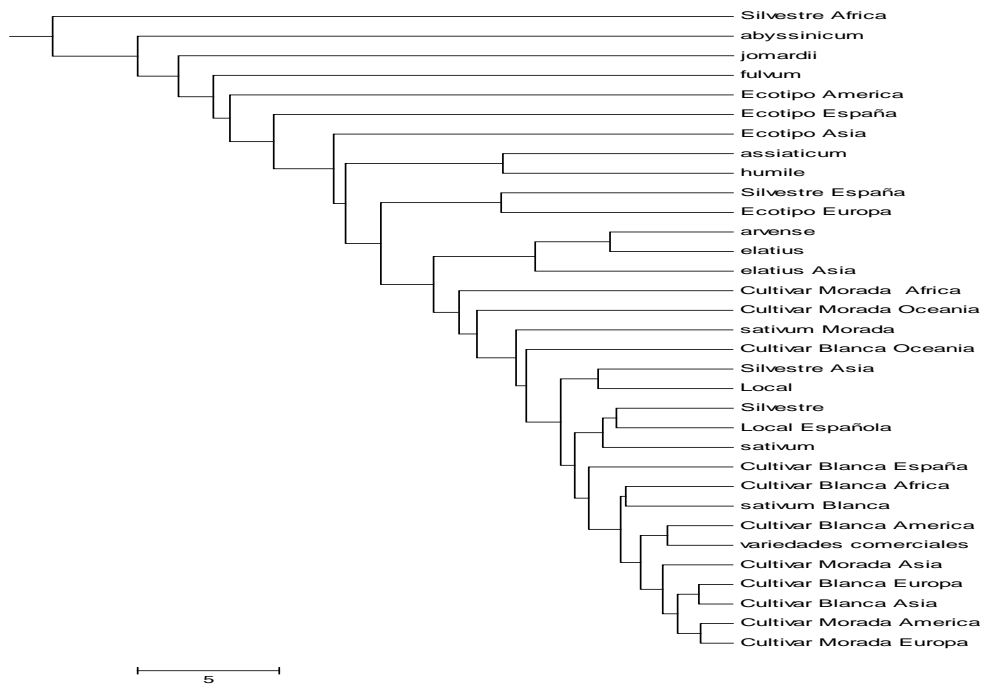
Nombre	Nº Accesoión	Cebador <i>Foward</i>			Cebador <i>Reverse</i>		
		Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'	Longitud	Tm	Secuencia 5' – 3'
<i>Ps_101</i>	AB009844	22	60	TGGGTTTCACTGATAAGCAAGA	20	60	AGGCAACTTCCCAAGCAGTA
<i>Ps_102</i>	AF154329	24	60	CCCAAAAGCTAAGAGGTACATCAA	19	60	TGGGGTAAAGTCGGGAAAA
<i>Ps_103</i>	X53035	22	59	TGTAAAGCTTGCAGATTTTGGGA	23	60	TCGTGTGTAAATGTTCTGACAGG
<i>Ps_104</i>	AB193816	26	59	GCTACCTTAAGAAAATCAAATTGTCC	21	60	TCTAGAGGTGCCAAATTGGTG
<i>Ps_105</i>	AJ717306	20	60	GCACTTGGGATGAAGGTGTT	21	59	CAAATTTGTCCCAAAATGGTC
<i>Ps_106</i>	D10001	23	59	CGTCAATGATTTTTACAACAACG	23	59	CAAGCTGGGATTTCTACTAGCTG
<i>Ps_107</i>	D64037	21	59	CAGCGTGGCAGCTATATAAGG	24	59	ACACTGAATTTCTGAGCAACATTT
<i>Ps_108</i>	Y15253	21	60	TCTGCGAAACAAACAATCAAA	20	60	GCAACGAACGCATACTCCTT
<i>Ps_109</i>	U83281	20	60	CGGACAACGTCCCTTTATCA	20	59	TCTTCATCTTCTTCGGAACCTC
<i>Ps_110</i>	AJ621573	20	60	CCTGGCCAGAGAAAATCAAA	20	60	AGGGGGCTTCTGCTAAAGAG
<i>Ps_111</i>	AB008186	20	60	CTATGGATTCCAGCCACGTT	20	60	CCCCATCTCAGCAATCTTGT
<i>Ps_112</i>	Z67873	20	59	CTTCTGCTTCCGATGCTTCT	19	59	GAGGTGGGTGTTGACATGG
<i>Ps_113</i>	AJ233399	19	60	GGTGAAACACCTCCCATC	20	60	AACTGGTGGCTGACTCCAAC
<i>Ps_114</i>	AJ426475	21	59	TGACGTTATCCATTTGCTTGA	20	59	TGCTAGCTCAACTCGTCCAC
<i>Ps_115</i>	Z66543	20	60	CTTGACCATCTGATCGCTGA	20	60	CTCCACCGCAGCTTCTAAC
<i>Ps_116</i>	U51918	20	59	GGCTTATTTCAAGCGTGGAG	20	60	CAGTGCATCCATACCATCCA
<i>Ps_117</i>	M25613	27	61	AACACTGACATTACTTCCATTACAAGC	22	60	TGCAATTTGAAATCCAAAAACA
<i>Ps_118</i>	AF369887	20	60	CCAATCCCAGATCAATGGAC	20	60	CTCCACGCACAATCTTCTCA
<i>Ps_119</i>	U60592	20	60	CCTCTTCTGATTCCGTGAGC	20	60	GCGAGCCACAGTAGGAAGTC
<i>Ps_120</i>	AB049712	20	60	GGGCATTGATATCCCGTATG	20	60	CGGCCTTTCCAAGGTTACTT
<i>Ps_121</i>	AJ251970	27	59	GTGAATTTGAAGTACAAGAGATTGTGT	21	59	ACACCCTTTTGAGAATCAGCA
<i>Ps_122</i>	AB303331	22	60	CACTAAAGGAGGCTTCACAACC	20	59	CGGTGGAAAACAACACTCAC
<i>Ps_123</i>	AJ971810	19	59	AGAAGATGAAGCCCGCAGT	23	60	AMPLICON
<i>Ps_124</i>	DQ539420	20	60	ACCCCGTCAAGTTCAGAATG	20	60	CGACGACCCTTCTTGCTTAG
<i>Ps_125</i>	EF219135	21	59	TGCAGTGAGCTATTTTCGCATA	20	60	TGACCGTCAAAACACCAGAA
<i>Ps_126</i>	AJ311087	18	60	CATGGCTCCTCCCTTGAA	23	57	GCTTCTTTTCATCAAATCATAAGG
<i>Ps_127</i>	DQ221697	22	59	AAGGTAACATGGACACCCAAT	19	59	GGATTCGGCATTGTTTCTAGA
<i>Ps_128</i>	AB087845	20	60	CTGTTGGGGTGTCTGAGAT	20	60	AGCTACTCTGCCACCAGCAT
<i>Ps_129</i>	EF447277	20	60	GAGCTGGTTAGCATGGCACT	20	59	CAAGAACACGGTTGATTTGC
<i>Ps_130</i>	AJ310990	20	60	CGTTGATGCATGGAACGATA	21	58	TGTTGTCAATTAGGGAATCCA
<i>Ps_131</i>	AJ296169	23	60	TGATGAAATTAGCTTTGGTGCTT	20	59	ATCGAAACGAGCATCAACAA
<i>Ps_132</i>	Y00722	25	59	TTATCTTCAGGAGATGTTTTTGTGA	21	59	AGGAAGCTTTTtagggCAACTG

Anexo IV.I. Frecuencias alélicas obtenidas para cada marcador molecular analizado

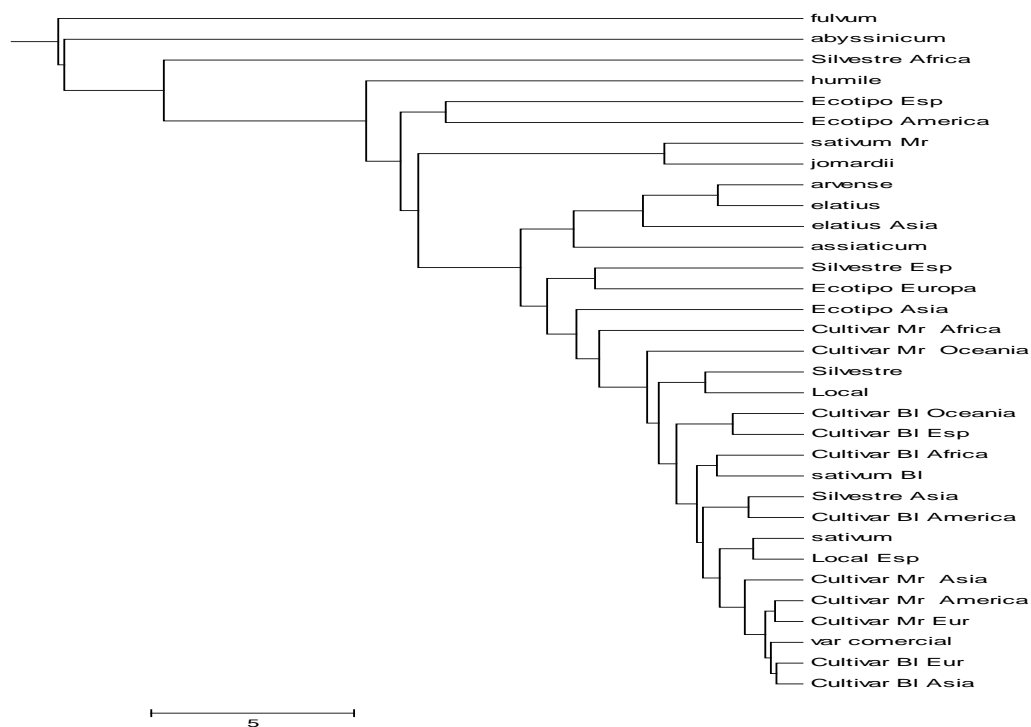
Alelo	1006NR2	1006NR32	1006x19	1006X58	2055NR51	64X14	sN13927	Pip1	Nlm	PsAS1	PsAAT1	Sut1	P628	AB100	AC76b
Alelo A	0,958	0,962	0,681	0,706	0,660	0,969	0,361	0,404	0,216	0,738	0,521	0,576	0,620	0,482	0,424
Alelo B									0,784	0,262	0,479	0,424	0,380	0,518	0,576
Alelo H	0,042	0,038	0,319	0,294	0,340	0,031	0,639	0,596							
Alelo	1006NR13	1794X9	2385X56	3999X	45X31	64X29	1006X50	95X19	BirteX16	BirteX34	AgpS1	Gbsts1	Clpser	Egl1	PsAAP2
Alelo A	0,049	0,017	0,965	0,033	0,364	0,946	0,901	0,943	0,757	0,740	0,629	0,800	0,811	0,579	0,605
Alelo B	0,927	0,944	0,014	0,922	0,508	0,022	0,005	0,029	0,167	0,253	0,002	0,168	0,142	0,416	0,370
Alelo H	0,024	0,038	0,021	0,045	0,128	0,033	0,094	0,029	0,076	0,007	0,369	0,032	0,047	0,006	0,025
Alelo	sM2P5234	sO12581	Q126	PsAS2	Sps	Tip	P108	Agpl1	Sbe2	Nin	AA345	AgpS2	NTH1	AB122	1006x21
Alelo A	0,655	0,613	0,877	0,722	0,660	0,813	0,528	0,471	0,192	0,483	0,480	0,128	0,103	0,260	0,903
Alelo B	0,293	0,330	0,096	0,236	0,274	0,113	0,469	0,391	0,798	0,004	0,495	0,557	0,767	0,662	0,004
Alelo C												0,315	0,130	0,079	0,031
Alelo H	0,052	0,058	0,028	0,042	0,066	0,074	0,004	0,138	0,011	0,513	0,025				0,063
Alelo	17941,000	2055NR53	281X40	281X5	95X43	Gbsts2	Pore	Aldo	Ppgm	Sugtrans	Xyft	sT11800	AB130	AB119	AB23
Alelo A	0,927	0,038	0,444	0,190	0,052	0,283	0,202	0,522	0,402	0,021	0,059	0,044	0,564	0,318	0,458
Alelo B	0,014	0,934	0,540	0,755	0,674	0,297	0,750	0,400	0,495	0,405	0,590	0,482	0,174	0,673	0,490
Alelo C	0,014	0,021	0,012	0,009	0,263	0,406	0,023	0,072	0,093	0,563	0,319	0,428	0,187	0,006	0,035
Alelo D														0,004	0,017
Alelo H	0,045	0,007	0,004	0,047	0,012	0,014	0,025	0,007	0,011	0,011	0,031	0,047	0,075		
Alelo	D21	17942	2055NR1	399X131	64X76	95X25	BirteX5	A9	AA335	AB113	AC58	AD146	281X1	281X44	M27
Alelo A	0,443	0,842	0,582	0,007	0,951	0,025	0,213	0,356	0,434	0,440	0,373	0,260	0,707	0,004	0,338
Alelo B	0,322	0,129	0,257	0,080	0,009	0,424	0,556	0,577	0,449	0,169	0,364	0,483	0,007	0,005	0,134
Alelo C	0,180	0,009	0,040	0,061	0,017	0,036	0,176	0,022	0,089	0,287	0,252	0,117	0,222	0,011	0,193
Alelo D	0,055	0,011	0,073	0,699	0,002	0,512	0,040	0,034	0,006	0,026	0,004	0,125	0,004	0,242	0,153
Alelo E												0,015	0,005	0,675	0,084
Alelo H		0,011	0,049	0,153	0,021	0,004	0,015	0,011	0,023	0,079	0,007		0,056	0,064	0,098
Alelo	AA175	AA278	AA72	AA200	AA321	AD134	AA285								
Alelo A	0,607	0,484	0,345	0,289	0,140	0,522	0,318								
Alelo B	0,256	0,324	0,374	0,606	0,155	0,336	0,532								
Alelo C	0,052	0,026	0,238	0,035	0,073	0,038	0,056								
Alelo D	0,036	0,083	0,017	0,027	0,040	0,055	0,008								
Alelo E	0,032	0,015	0,012	0,004	0,018	0,031	0,041								
Alelo F					0,495	0,011	0,008								
Alelo G							0,004								
Alelo H	0,016	0,070	0,015	0,039	0,080	0,007	0,034								

Anexo IV.3. Dendrogramas basados en la distancia de Nei para los 33 grupos y construidos según UPGMA en función de cada análisis realizado

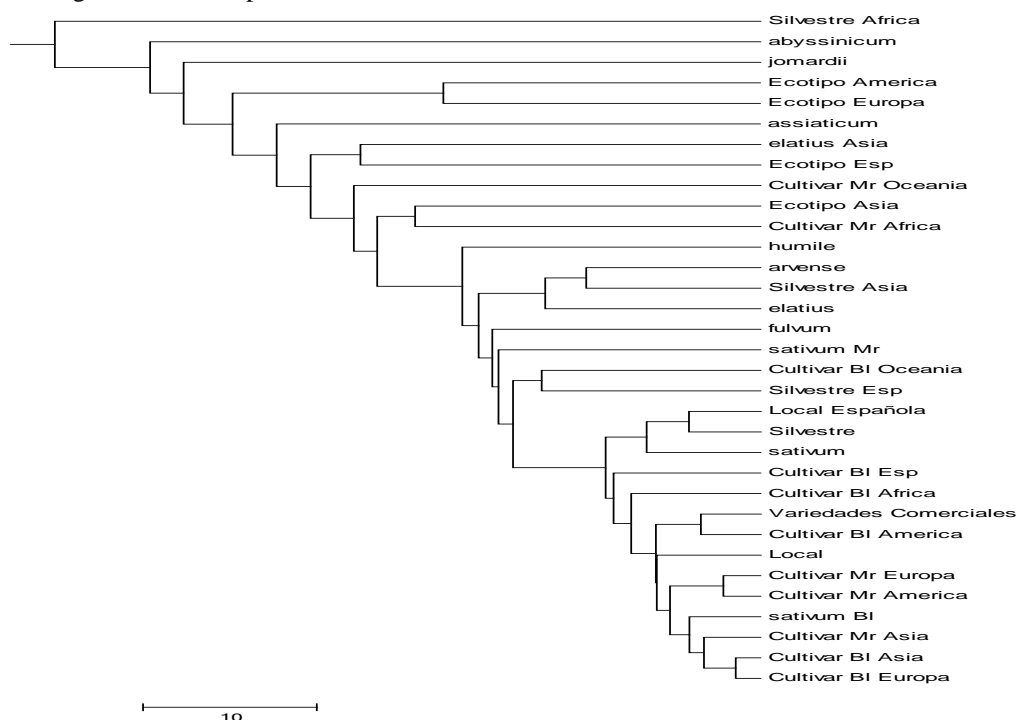
Dendrograma obtenido para el global de marcadores



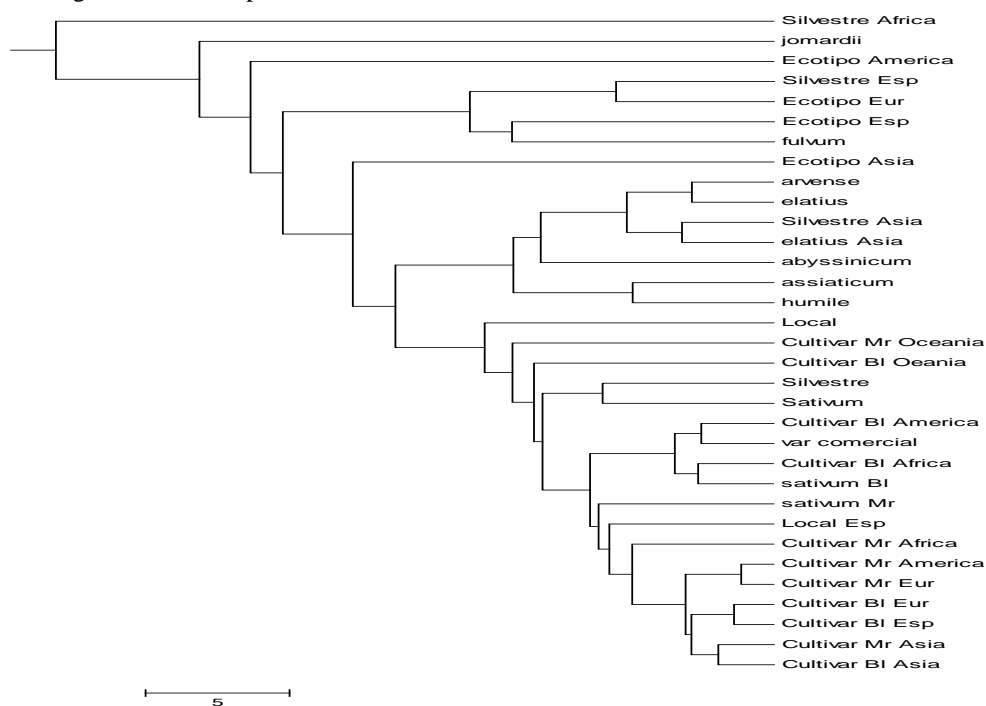
Dendrograma obtenido para los marcadores RBIP



Dendrograma obtenido para los marcadores SSR



Dendrograma obtenido para los marcadores GTM



Anexo IV.4. QTL asociados al porcentaje de supervivencia evaluado las 24 horas del ensayo de heladas y tras 2 semanas

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-6suprec1a.1	Ia	AD147	AA155	0,01	29,71	3,04	0,02	-2,64
-6suprec2.1	II	ThiolP	AB113	0,22	8,48	6,58	-0,08	2,72
-6suprec2.2	II	AB113	AA332	0,24	8,28	7,04	-0,07	2,57
-6suprec3b.1	IIIb	PSAS	PsAs1	0,02	22,31	5,16	0,03	-2,57
-6suprec3b.2	IIIb	PsAs1	Y13321	0,13	21,54	7,09	0,03	-2,57
-6suprec3b.3	IIIb	Y13321	AB111	0,31	6,40	4,16	0,10	2,60
-6suprec3b.5	IIIb	AD73	AA72	0,50	32,49	7,50	0,04	-2,63
-6suprec3b.6	IIIb	AA72	AB140	0,70	34,60	2,66	0,03	-2,63
-6suprec3b.7	IIIb	AB140	AA355	1,02	33,51	6,00	0,03	-2,63
-6suprec3b.8	IIIb	AA355	AD270	1,28	31,19	1,30	0,00	-2,64
-6suprec3b.9	IIIb	AD270	AB64	1,77	31,03	2,27	0,03	-2,64
-6suprec3b.10	IIIb	AB64	AB85	1,94	23,93	3,18	0,03	-2,57
-6suprec3b.11	IIIb	Ab85	Le	2,34	24,51	2,06	-0,03	-2,57
-6suprec4.2	IV	AA430902	AA285	0,44	22,56	2,84	0,02	-2,58
-6suprec4.4	IV	NTH1	AA122	1,26	3,68	3,12	0,08	2,49
-6suprec5.5	V	AD79	AD280	1,13	25,39	2,10	-0,01	-2,57
-6suprec6.2	VI	Q363	P446	0,44	22,90	5,63	-0,02	-2,58
-6suprec6.4	VI	P393	AC8	0,61	32,10	4,72	0,01	-2,64
-6suprec7.2	VII	Gs3B	AD146	0,40	35,13	6,88	0,00	-2,64
-6suprec7.4	VII	AA160	AB114	0,66	35,17	4,58	0,00	-2,64
-6suprec7.7	VII	AD237	AA505	1,41	30,74	1,95	0,00	-2,64

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-9suprec1a.1	Ia	AD147	AA155	0,01	21,72	2,30	-0,03	-3,26
-9suprec2.1	II	ThiolP	AB113	0,01	69,49	1,89	-0,01	8,01
-9suprec2.8	II	P54	AA303	1,61	23,08	5,45	0,01	-3,27
-9suprec2.9	II	AA303	D23	1,62	15,87	5,53	0,01	-3,27
-9suprec3a.3	IIIa	X51594	PSP4OSG	0,69	15,38	4,19	-0,06	-1,91
-9suprec3b.1	IIIb	PSAS	PsAs1	0,01	14,79	7,21	-0,02	-1,93
-9suprec3b.6	IIIb	AA72	AB140	0,76	19,08	2,18	0,00	-1,62
-9suprec3b.7	IIIb	AB140	AA355	0,82	13,93	2,24	0,01	-1,83
-9suprec3b.11	IIIb	AB85	Le	2,15	21,32	6,79	0,00	-1,62
-9suprec3b.12	IIIb	Le	AB141	2,56	24,11	4,73	0,00	-1,62
-9suprec4.3	IV	AA285	NTH1	1,06	22,91	4,06	0,00	-3,27
-9suprec4.4	IV	NTH1	AA122	1,11	22,15	4,06	0,00	-3,27
-9suprec4.5	IV	AA122	AC32	2,27	17,63	7,31	-0,07	-3,25
-9suprec5.1	V	AA27	AD68	0,12	20,32	3,48	-0,07	-3,28
-9suprec5.2	V	AD68	CHPSGAPAI	0,89	18,12	2,53	-0,03	-3,26
-9suprec5.5	V	AD79	AD280	1,48	20,46	5,35	-0,05	-1,91
-9suprec5.6	V	AD280	AB146	1,51	16,29	4,35	-0,05	-1,91
-9suprec6.4	VI	P393	AC8	0,79	69,49	1,64	-0,01	8,01
-9suprec7.2	VII	Gs3B	AD146	0,35	18,29	2,26	0,05	-3,26
-9suprec7.4	VII	AA160	AB114	0,69	22,49	5,01	0,07	-3,27
-9suprec7.7	VII	AD237	AA505	1,37	70,29	1,73	-0,01	8,01
-9suprec7.8	VII	AA505	AA206	1,60	23,63	3,27	0,00	-1,62

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-12suprec1a.1	Ia	<i>AD147</i>	<i>AA155</i>	0,09	13,85	10,18	-0,04	-2,32
-12suprec1a.2	Ia	<i>AA155</i>	<i>PsAs2</i>	0,28	14,93	11,67	-0,04	-2,32
-12suprec1a.3	Ia	<i>PsAs2</i>	<i>AB32</i>	0,42	2,36	14,69	-0,26	0,30
-12suprec2.1	II	<i>ThiolP</i>	<i>AB113</i>	0,20	2,51	4,71	-0,24	-1,83
-12suprec2.2	II	<i>AB113</i>	<i>AA332</i>	0,52	3,10	6,10	-0,21	-1,54
-12suprec2.5	II	<i>AB109</i>	<i>M16903</i>	1,10	3,79	4,89	-0,04	1,81
-12suprec2.7	II	<i>PutTIP</i>	<i>P54</i>	1,35	14,27	3,06	0,03	-2,33
-12suprec2.8	II	<i>P54</i>	<i>AA303</i>	1,40	14,50	2,85	0,03	-2,33
-12suprec2.10	II	<i>D23</i>	<i>A</i>	2,09	8,28	2,11	-0,04	1,81
-12suprec3a.2	IIIa	<i>PSDAHI</i>	<i>X51594</i>	0,67	7,47	7,01	-0,06	1,84
-12suprec3a.3	IIIa	<i>X51594</i>	<i>PSP4OSG</i>	0,69	12,60	2,38	-0,03	-2,33
-12suprec3b.1	IIIb	<i>PSAS</i>	<i>PsAs1</i>	0,01	12,71	1,93	0,01	-2,33
-12suprec3b.7	IIIb	<i>AB140</i>	<i>AA355</i>	0,85	6,52	2,67	0,06	1,69
-12suprec3b.9	IIIb	<i>AD270</i>	<i>AB64</i>	1,69	2,60	1,72	-0,05	-1,48
-12suprec6.1	VI	<i>AB125</i>	<i>Q363</i>	0,34	12,98	4,36	0,00	1,29
-12suprec6.4	VI	<i>P393</i>	<i>AC8</i>	0,79	6,49	9,70	-0,06	1,77

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-15suprec1a.1	Ia	<i>AD147</i>	<i>AA155</i>	0,01	11,71	2,55	-0,04	-2,16
-15suprec1a.2	Ia	<i>PsAs2</i>	<i>AB32</i>	0,61	13,75	4,30	-0,09	-2,15
-15suprec2.7	II	<i>PutTIP</i>	<i>P54</i>	1,29	11,42	3,44	0,03	-2,17
-15suprec2.9	II	<i>AA303</i>	<i>D23</i>	1,63	7,69	1,62	0,04	-2,15
-15suprec2.10	II	<i>D23</i>	<i>A</i>	2,09	11,88	2,66	0,05	-2,15
-15suprec3b.4	IIIb	<i>AB111</i>	<i>AD73</i>	0,44	7,33	2,97	-0,06	-2,16
-15suprec3b.7	IIIb	<i>AB140</i>	<i>AA355</i>	1,04	14,44	4,05	0,03	-2,17
-15suprec3b.8	IIIb	<i>AA355</i>	<i>AD270</i>	1,07	12,94	3,92	0,03	-2,16
-15suprec3b.9	IIIb	<i>AD270</i>	<i>AB64</i>	1,50	7,91	1,92	-0,02	-1,71
-15suprec3b.12	IIIb	<i>Le</i>	<i>AB141</i>	2,47	10,93	3,38	0,01	-1,68
-15suprec5.1	V	<i>AA27</i>	<i>AD68</i>	0,02	13,47	3,53	-0,05	-2,18
-15suprec5.2	V	<i>AD68</i>	<i>CHPSGAPAI</i>	0,34	14,92	2,43	-0,02	2,37
-15suprec6.1	VI	<i>AB125</i>	<i>Q363</i>	0,40	14,60	1,55	0,05	2,39
-15suprec6.4	VI	<i>P393</i>	<i>AC8</i>	0,64	10,99	1,88	0,07	2,38
-15suprec7.7	VII	<i>AD237</i>	<i>AA505</i>	1,44	13,06	2,15	0,00	2,38
-15suprec7.8	VII	<i>AA505</i>	<i>AA206</i>	1,56	9,90	3,18	0,01	1,50

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-6suppf1a.1	Ia	<i>AD147</i>	<i>AA155</i>	0,01	4,36	3,36	0,18	3,22
-6suppf1a.2	Ia	<i>AA155</i>	<i>PsAs2</i>	0,14	18,23	1,88	0,01	-2,92
-6suppf1a.3	Ia	<i>PsAs2</i>	<i>AB32</i>	0,67	5,44	3,29	0,11	-4,04
-6suppf2.1	II	<i>ThiolP</i>	<i>AB113</i>	0,22	6,10	4,66	-0,04	2,71
-6suppf2.2	II	<i>AB113</i>	<i>AA332</i>	0,23	5,95	4,89	-0,10	3,15
-6suppf2.5	II	<i>AB109</i>	<i>M16903</i>	1,03	3,78	5,80	-0,12	3,03
-6suppf2.6	II	<i>M16903</i>	<i>PutTIP</i>	1,20	4,46	6,16	-0,10	2,69
-6suppf2.8	II	<i>P54</i>	<i>AA303</i>	1,61	3,91	4,66	-0,14	-3,53
-6suppf2.10	II	<i>D23</i>	<i>A</i>	1,68	4,52	4,58	-0,13	-3,05
-6suppf3b.1	IIIb	<i>PSAS</i>	<i>PsAs1</i>	0,11	4,83	3,10	0,10	4,03
-6suppf3b.2	IIIb	<i>PsAs1</i>	<i>Y13321</i>	0,13	17,41	7,99	0,08	-2,92
-6suppf3b.3	IIIb	<i>Y13321</i>	<i>AB111</i>	0,29	17,45	4,39	0,05	-2,92
-6suppf3b.5	IIIb	<i>AD73</i>	<i>AA72</i>	0,50	32,49	7,50	0,04	-2,63
-6suppf3b.6	IIIb	<i>AA72</i>	<i>AB140</i>	0,74	3,92	3,68	-0,06	2,64
-6suppf3b.7	IIIb	<i>AB140</i>	<i>AA355</i>	1,02	33,51	6,00	0,03	-2,63
-6suppf3b.8	IIIb	<i>AA355</i>	<i>AD270</i>	1,08	18,12	2,53	0,04	-2,91
-6suppf3b.9	IIIb	<i>AD270</i>	<i>AB64</i>	1,32	4,31	2,47	0,13	2,72
-6suppf3b.11	IIIb	<i>AB85</i>	<i>Le</i>	1,98	14,70	5,95	0,04	-2,92
-6suppf4.1	IV	<i>AB40</i>	<i>AA430902</i>	0,17	4,44	3,54	0,12	2,63
-6suppf4.2	IV	<i>AA430902</i>	<i>AA285</i>	0,32	4,65	3,11	0,11	2,62
-6suppf4.3	IV	<i>AA285</i>	<i>NTH1</i>	0,77	5,11	2,38	-0,11	-2,77
-6suppf4.4	IV	<i>NTH1</i>	<i>AA122</i>	1,47	28,95	1,55	0,00	-2,64
-6suppf5.5	V	<i>AD79</i>	<i>AD280</i>	1,48	19,20	2,80	0,00	-2,92
-6suppf6.2	VI	<i>Q363</i>	<i>P446</i>	0,44	19,43	4,35	-0,04	-2,93
-6suppf6.4	VI	<i>P393</i>	<i>AC8</i>	0,61	32,10	4,72	0,01	-2,64
-6suppf7.2	VII	<i>Gs3B</i>	<i>AD146</i>	0,40	35,13	6,88	0,00	-2,64
-6suppf7.3	VII	<i>AD146</i>	<i>AA160</i>	0,47	29,94	4,35	0,00	-2,64
-6suppf7.4	VII	<i>AA160</i>	<i>AB114</i>	0,66	35,17	4,58	0,00	-2,64
-6suppf7.5	VII	<i>AB114</i>	<i>AA317</i>	1,10	16,75	2,67	0,00	-2,92
-6suppf7.7	VII	<i>AD237</i>	<i>AA505</i>	1,41	30,74	1,95	0,00	-2,64
-6suppf7.8	VII	<i>AA505</i>	<i>AA206</i>	1,55	31,61	2,32	0,00	-2,64

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-9suppf1a.1	Ia	<i>AD147</i>	<i>AA155</i>	0,01	23,91	1,94	-0,02	-3,25
-9suppf1a.3	Ia	<i>PsAs2</i>	<i>AB32</i>	0,62	24,75	1,86	-0,04	-3,25
-9suppf2.1	II	<i>ThiolP</i>	<i>AB113</i>	0,01	69,49	1,89	-0,01	8,01
-9suppf2.7	II	<i>PutTIP</i>	<i>P54</i>	1,24	24,53	1,80	0,01	-3,25
-9suppf2.8	II	<i>P54</i>	<i>AA303</i>	1,61	25,35	4,98	0,00	-3,26
-9suppf2.9	II	<i>AA303</i>	<i>D23</i>	1,63	23,29	4,98	0,00	-3,26
-9suppf2.10	II	<i>D23</i>	<i>A</i>	1,70	24,85	1,56	0,00	-3,25
-9suppf3a.3	IIIa	<i>X51594</i>	<i>PSP4OSG</i>	0,69	15,38	4,19	-0,06	-1,91
-9suppf3b.1	IIIb	<i>PSAS</i>	<i>PsAs1</i>	0,01	14,79	7,21	-0,02	-1,93
-9suppf3b.2	IIIb	<i>PsAs1</i>	<i>Y13321</i>	0,18	68,38	1,58	0,01	8,01
-9suppf3b.5	IIIb	<i>AD73</i>	<i>AA72</i>	0,56	69,41	1,78	0,02	8,02
-9suppf3b.6	IIIb	<i>AA72</i>	<i>AB140</i>	0,76	19,08	2,18	0,00	-1,62
-9suppf3b.7	IIIb	<i>AB140</i>	<i>AA355</i>	0,82	13,93	2,24	0,01	-1,83
-9suppf3b.11	IIIb	<i>AB85</i>	<i>Le</i>	2,15	21,32	6,79	0,00	-1,62
-9suppf3b.12	IIIb	<i>Le</i>	<i>AB141</i>	2,56	24,11	4,73	0,00	-1,62
-9suppf4.2	IV	<i>AA430902</i>	<i>AA285</i>	0,69	66,78	2,38	0,01	8,01
-9suppf4.3	IV	<i>AA285</i>	<i>NTH1</i>	1,04	24,69	5,88	-0,02	-3,25
-9suppf4.4	IV	<i>NTH1</i>	<i>AA122</i>	1,10	21,11	5,27	-0,02	-3,25
-9suppf4.5	IV	<i>AA122</i>	<i>AC32</i>	2,27	19,81	6,70	-0,06	-3,24
-9suppf5.1	V	<i>AA27</i>	<i>AD68</i>	0,13	22,22	3,17	-0,06	-3,26
-9suppf5.2	V	<i>AD68</i>	<i>CHSGAPAI</i>	0,89	20,31	2,10	-0,02	-3,25
-9suppf5.3	V	<i>CHSGAPAI</i>	<i>AB130</i>	1,03	18,77	5,32	-0,02	-3,25
-9suppf5.5	V	<i>AD79</i>	<i>AD280</i>	1,48	20,46	5,35	-0,05	-1,91
-9suppf5.6	V	<i>AD280</i>	<i>AB146</i>	1,50	2,52	4,74	-0,07	-1,77
-9suppf6.4	VI	<i>P393</i>	<i>AC8</i>	0,79	69,49	1,64	-0,01	8,01
-9suppf7.1	VII	<i>AD135</i>	<i>Gs3B</i>	0,34	23,86	1,72	0,03	-3,25
-9suppf7.2	VII	<i>Gs3B</i>	<i>AD146</i>	0,35	20,42	1,80	0,03	-3,25
-9suppf7.3	VII	<i>AD146</i>	<i>AA160</i>	0,61	21,65	2,34	0,06	-3,25
-9suppf7.4	VII	<i>AA160</i>	<i>AB114</i>	0,68	24,72	4,15	0,06	-3,25
-9suppf7.5	VII	<i>AB114</i>	<i>AA317</i>	0,83	69,80	1,73	0,01	8,01
-9suppf7.7	VII	<i>AD237</i>	<i>AA505</i>	1,37	70,29	1,73	-0,01	8,01
-9suppf7.8	VII	<i>AA505</i>	<i>AA206</i>	1,60	23,63	3,27	0,00	-1,62

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-12suppf1a.1	Ia	AD147	AA155	0,05	2,61	15,93	-0,27	0,30
-12suppf1a.2	Ia	AA155	PsAs2	0,27	17,88	14,12	-0,06	-2,30
-12suppf1a.3	Ia	PsAs2	AB32	0,46	2,77	17,55	-0,27	0,27
-12suppf2.10	II	ThiolP	AB113	0,20	2,51	4,71	-0,24	-1,83
-12suppf2.2	II	AB113	AA332	0,52	3,10	6,10	-0,21	-1,54
-12suppf2.5	II	AB109	M16903	1,10	3,79	4,89	-0,04	1,81
-12suppf2.7	II	PutTIP	P54	1,34	16,78	2,73	0,02	-2,32
-12suppf2.8	II	P54	AA303	1,41	16,22	2,28	0,01	-2,32
-12suppf2.10	II	D23	A	2,09	8,28	2,11	-0,04	1,81
-12suppf3a.1	IIIa	DipeptIV	PSADH1	0,02	5,73	3,45	-0,06	1,82
-12suppf3a.2	IIIa	PSADH1	X51594	0,67	7,47	7,01	-0,06	1,84
-12suppf3a.3	IIIa	X51594	PSP4OSG	0,69	14,81	3,38	-0,05	-2,31
-12suppf3b.1	IIIb	PSAS	PsAs1	0,01	14,66	2,68	-0,01	-2,32
-12suppf3b.7	IIIb	AB140	AA355	0,85	6,52	2,67	0,06	1,69
-12suppf3b.9	IIIb	AD270	AB64	1,75	16,61	2,18	0,00	-2,31
-12suppf3b.11	IIIb	AB85	Le	1,98	10,22	1,62	0,00	-2,32
-12suppf4.2	IV	AB40	AA430902	0,15	16,07	2,52	-0,04	-2,31
-12suppf6.1	VI	AB125	Q363	0,34	12,98	4,36	0,00	1,29
-12suppf6.4	VI	P393	AC8	0,79	6,49	9,70	-0,06	1,77

QTL	LG	Marcadores Flanqueantes		Posición (cM)	LOD (H ₀ :H ₃)	R ² (0:1; %)	Efecto Aditivo	Efecto Dominante
-15suppf1b.3	Ib	AA258	AC75	0,29	13,16	1,79	-0,05	-2,09
-15suppf2.7	II	PutTIP	P54	1,28	13,31	3,26	0,03	-2,10
-15suppf2.10	II	D23	A	2,09	13,52	2,09	0,03	-2,09
-15suppf3a.3	IIIa	X51594	PSP4OSG	0,77	12,15	1,66	0,00	2,24
-15suppf3b.5	IIIb	AD73	AA72	0,48	9,99	1,99	-0,02	-2,10
-15suppf3b.9	IIIb	AD270	AB64	1,43	12,76	3,58	0,00	-1,51
-15suppf3b.11	IIIb	AB85	Le	2,11	14,36	3,16	0,01	2,24
-15suppf3b.12	IIIb	Le	AB141	2,43	14,21	3,89	0,00	-1,50
-15suppf4.1	IV	AB40	AA430902	0,05	14,02	2,65	-0,02	-2,10
-15suppf4.2	IV	AA430902	AA285	0,29	14,90	1,60	-0,02	2,24
-15suppf4.3	IV	AA285	NTH1	1,09	12,99	1,59	-0,05	2,24
-15suppf4.4	IV	NTH1	AA122	1,12	16,07	1,65	-0,05	2,24
-15suppf4.5	IV	AA122	AC32	2,24	12,73	1,67	-0,02	2,24
-15suppf5.1	V	AA27	AD68	0,04	16,41	6,54	-0,08	-2,11
-15suppf5.2	V	AD68	CHSGAPAI	0,34	16,21	3,70	0,01	2,24
-15suppf6.1	VI	AB125	Q363	0,40	15,96	2,26	0,03	2,24
-15suppf6.4	VI	P393	AC8	0,69	13,27	2,08	0,05	2,24
-15suppf7.5	VII	AB114	AA317	0,83	13,52	2,33	0,00	2,24
-15suppf7.7	VII	AD237	AA505	1,44	12,76	2,91	-0,02	2,23
-15suppf7.8	VII	AA505	AA206	1,71	12,91	3,34	0,00	1,64
-15suppf7.9	VII	AA206	AA176	1,88	13,77	1,90	0,01	2,24

Anexo IV.5. Resumen de los análisis de qPCR para Terese y Champagne sin aclimatar y aclimatadas con los criterios de selección y cribado de genes establecidos en este trabajo

	Te_Na vs		Te_NA vs		Cg/Te Cg Trtmt	Te / Cg Susc (Te) Tol (Cy)		Ef Tu_AC Tu_AC	
	Te_AC	Te_AC							
Ps_004	-1,63	36,56	-22,48	-0,04	No	No	No	No	A
Ps_006	-7,33	-33,5	4,57	0,22	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_007	-1,57	312,48	-199,46	-0,01	No	No	No	No	A
Ps_009	-59,55	-37,09	0,62	1,61	SOBexp	A	A	No	No
Ps_011	-2,98	-1,96	0,66	1,52	No	M B	No	No	No
Ps_013	-1,7	-1,84	1,08	0,93	No	No	No	No	No
Ps_014	-1,5	17,16	-11,45	-0,09	No	No	No	No	Me
Ps_016	-3,39	-3,11	0,92	1,09	SOBexp	B	B	No	No
Ps_017	-1,13	25,7	-22,64	-0,04	No	No	No	No	A
Ps_018	-1,39	8,68	-6,23	-0,16	No	No	No	No	B
Ps_019	-3,02	-6,44	2,13	0,47	SOBexp	B	Me	No	No
Ps_020	1,99	34,33	17,27	0,06	No	No	No	No	A
Ps_021	-4,62	-2,09	0,45	2,21	SOBexp	B	M B	No	No
Ps_022	-3,14	-7,85	2,5	0,4	SOBexp	B	Me	No	No
Ps_023	-7,04	-14,79	2,1	0,48	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_024	-1,47	51,44	-35,01	-0,03	No	No	No	No	A
Ps_025	1,14	111,63	97,96	0,01	No	No	No	No	A
Ps_026	-46,2	-359,77	7,79	0,13	SOBexp	A	M A	No	No
Ps_028	-33,38	-39,49	1,18	0,85	SOBexp	A	A	No	No
Ps_029	-39,57	-4,76	0,12	8,32	SOBexp	A	B	No	No
Ps_030	-2,52	-6,39	2,54	0,39	SOBexp	M B	Me	No	No
Ps_033	-1,31	103,06	-78,77	-0,01	No	No	No	No	A
Ps_035	-51,64	-143,13	2,77	0,36	SOBexp	A	M A	No	No
Ps_038	-2,82	-9,62	3,41	0,29	SOBexp	M B	Me	No	No
Ps_039	-12,21	No Amp			No	Me	No	No	No
Ps_041	-2,34	47,64	-20,38	-0,05	No	M B	No	No	A
Ps_043	-1,04	-2,61	2,52	0,4	No	No	M B	No	No
Ps_044	-221,88	-10,11	0,05	21,95	SOBexp	M A	Me	No	No
Ps_047	-1,41	-1,43	1,01	0,99	No	No	No	No	No
Ps_049	-7,63	-7,99	1,05	0,95	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_053	-3,16	-40,97	12,96	0,08	SOBexp	B	A	No	No
Ps_054	-18,34	-64,23	3,5	0,29	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_057	18,23	22,6	1,24	0,81	subexpr	No	No	Me	A
Ps_058	-11,37	-3,57	0,31	3,18	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_059	-12,02	-9,28	0,77	1,3	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_060	-5,75	-1,82	0,32	3,16	No	Me	No	No	No
Ps_061	-3,43	-3,93	1,15	0,87	SOBexp	B	B	No	No
Ps_062	-3,04	-2,52	0,83	1,21	SOBexp	B	B	No	No
Ps_064	-6,37	31,36	-4,92	-0,2	No	Me	No	No	A
Ps_065	-462,8	-28,79	0,06	16,07	SOBexp	M A	A	No	No
Ps_066	-27,24	36,67	-1,35	-0,74	No	A	No	No	A
Ps_068	-22,16	-31,29	1,41	0,71	SOBexp	A	A	No	No
Ps_070	1,43	27,01	18,94	0,05	No	No	No	No	A
Ps_071	-63,56	-9,79	0,15	6,49	SOBexp	M A	Me	No	No

	Te_Na vs		Te_NA vs		Cg/Te Cg Trtmt	Te / Cg Susc (Te) Tol (Cy)		Ef Tu_AC Tu_AC	
	Te_AC	Te_AC							
Ps_072	2,43	46,16	19,03	0,05	subexp	No	No	M B	A
Ps_073	-1,88	-1,84	0,98	1,02	No	No	No	No	No
Ps_075	1,02	2,4	2,36	0,42	No	No	No	No	M B
Ps_076	-6,41	-3,65	0,57	1,76	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_078	-2,67	202,32	-75,65	-0,01	No	M B	No	No	A
Ps_079	-31,47	28,54	-0,91	-1,1	No	A	No	No	A
Ps_081	-20,53	5,14	-0,25	-3,99	No	Me	Me	No	No
Ps_082	7,58	5,99	0,79	1,27	subexp	No	No	B	Me
Ps_083	-8,53	-9,64	1,13	0,89	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_084	-40,48	-22,78	0,56	1,78	SOBexp	A	A	No	No
Ps_085	1,43	57,51	40,25	0,02	No	No	No	No	A
Ps_087	-19,99	1,94	-0,1	-10,28	No	Me	No	No	No
Ps_088	-80,03	15,63	-0,2	-5,12	No	A	No	No	Me
Ps_089	-23,58	-75,3	3,19	0,31	SOBexp	A	A	No	No
Ps_090	-1,61	47,97	-29,88	-0,03	No	No	No	No	A
Ps_091	-5,11	-4,68	0,92	1,09	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_092	-8,54	-10,47	1,23	0,82	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_094	-4,42	-9,82	2,22	0,45	SOBexp	B	Me	No	No
Ps_095	-22,67	6,53	-0,29	-3,47	No	A	No	No	Me
Ps_096	-1648,78	-314,44	0,19	5,24	SOBexp	M A	M A	No	No
Ps_098	-11,25	4,29	-0,38	-2,62	No	Me	No	No	B
Ps_100	-16,05	-21,57	1,34	0,74	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_101	-14,95	-184,44	12,33	0,08	SOBexp	Me	M A	No	No
Ps_105	-13,31	-30,80	2,31	0,43	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_106	-1,47	13,05	-8,9	-0,11	No	No	No	No	Me
Ps_108	-13,83	6,27	-0,45	-2,21	No	Me	No	No	Me
Ps_110	-2,34	52,7	-22,56	-0,04	No	M B	No	No	A
Ps_111	-2,68	-1,13	0,42	2,37	No	M B	No	No	No
Ps_113	-26,49	-115,59	4,36	0,23	SOBexp	A	No	No	M A
Ps_115	-17,91	-18,35	1,02	0,98	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_117	-17,32	3,27	-0,19	-5,3	No	Me	No	No	Bajo
Ps_118	-23,77	-28,86	1,21	0,82	SOBexp	A	A	No	No
Ps_119	1,53	2,05	1,34	0,75	No	No	No	No	M B
Ps_122	1,46	37,81	25,96	0,04	No	No	No	No	A
Ps_123	1,09	28,48	26,19	0,04	No	No	No	No	A
Ps_124	-2,95	-2,16	0,73	1,36	No	M B	M B	No	No
Ps_126	-14,53	-72,26	4,97	0,2	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_127	-11,19	-6,68	0,6	1,67	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_128	1,64	213,83	130,36	0,01	No	No	No	No	A
Ps_129	-1,59	19,8	-12,46	-0,08	No	No	No	No	Me
Ps_130	-24,78	-153,65	6,2	0,16	SOBexp	A	M A	No	No
Ps_131	2,28	2,31	1,01	0,99	subexp	No	No	M B	M B
Ps_132	-48,03	-2,27	0,05	21,13	SOBexp	A	M B	No	No

Te: Terese, Cg: Champagne; NA: No Aclimatada; AC: Aclimatada; EF Trtmt: Efecto Tratamiento; SOBexp: Sobreexpresión; subexp: subreexpresión; Susc: línea susceptible; Tol: línea tolerante; M A: Muy Alto A: Alto; Me: medio; B: bajo; M B: Muy bajo; No: no hay efecto

Anexo IV.6. Resumen de los análisis de qPCR para Cheyenne y ZP-1366 sin aclimatar y aclimatadas con los criterios de selección y cribado de genes establecidos en este trabajo

	Tu_Na vs Tu_AC	Tu_NA vs Tu_AC	Cy/Tu Cy	Tu/Cy	Ef Trtmt	SOBexp		subexp	
						Susc (Tu)	Tol (Cy)	Susc (Tu)	Tol (Cy)
Ps_004	-34,8	-1,07	0,03	32,54	No	A	No	No	No
Ps_006	-2,6	-1,29	0,5	2,02	No	M B	No	No	No
Ps_007	-46,62	2,92	-0,06	-15,99	No	A	No	No	M B
Ps_009	-22,7	-28,22	1,24	0,8	SOBexp	A	A	No	No
Ps_011	-1,6	2,72	-1,71	-0,59	No	No	No	No	M B
Ps_013	1,1	-2,97	-2,7	-0,37	No	No	M B	No	No
Ps_014	-32,07	-1,82	0,06	17,6	No	A	No	No	No
Ps_016	-2,32	-2,45	1,06	0,95	No	M B	M B	No	No
Ps_017	-57,71	1,2	-0,02	-48,21	No	A	No	No	No
Ps_018	-20,12	-5,36	0,27	3,75	SOBexp	A	B	No	No
Ps_019	-1,66	-1,17	0,71	1,42	No	No	No	No	No
Ps_020	-12,08	6,42	-0,53	-1,88	No	Me	No	No	Me
Ps_021	-1,37	-3,8	2,77	0,36	No	No	B	No	No
Ps_022	-1,72	-1,69	0,98	1,02	No	No	No	No	No
Ps_023	-3,1	-20,95	6,75	0,15	SOBexp	B	A	No	No
Ps_024	-100,76	-1,08	0,01	93,59	No	M A	No	No	No
Ps_025	-44,62	434,4	-9,73	-0,1	No	A	No	No	No
Ps_026	-1316,19	-63,27	0,05	20,8	SOBexp	M A	A	No	No
Ps_028	-28,44	-16,58	0,58	1,72	SOBexp	A	Me	No	No
Ps_029	-18,05	-7,29	0,4	2,47	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_030	-1,38	-2,53	1,83	0,55	No	No	M B	No	No
Ps_033	-66,53	1,21	80,71	0,01	No	A	No	No	No
Ps_035	-35,36	-25,45	0,72	1,39	SOBexp	A	A	No	No
Ps_038	-1,03	-3,74	3,63	0,28	No	No	B	No	No
Ps_039	-19,74	-2,89	0,15	6,84	SOBexp	Me	M B	No	No
Ps_041	-42,53	1,27	-0,03	-33,44	No	A	No	No	No
Ps_043	2,72	2	0,74	1,36	subexp	No	No	M B	M B
Ps_044	-101,18	-15,07	0,15	6,71	SOBexp	M A	Me	No	No
Ps_047	2,39	-2,15	-0,9	-1,11	No	No	M B	M B	No
Ps_049	-3,48	-2,68	0,77	1,3	SOBexp	B	M B	No	No
Ps_053	-125,6	-2,65	0,02	47,42	No	M A	M B	No	No
Ps_054	-631,24	-3,86	0,01	163,62	SOBexp	M A	M B	No	No
Ps_057	11,88	72,71	6,12	0,16	subexp	No	No	Me	A
Ps_058	-4,15	-8,83	2,13	0,47	SOBexp	B	B	No	No
Ps_059	-6,31	-23,86	3,78	0,26	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_060	-2,1	-2,61	1,24	0,8	No	M B	M B	No	No
Ps_061	-2,31	-1,77	0,76	1,31	No	M B	No	No	No
Ps_062	-1,6	-2,49	1,56	0,64	No	No	M B	No	No
Ps_064	-9,63	1,29	-0,13	-7,48	No	Me	No	No	No
Ps_065	-242,93	14,35	-0,06	-16,93	SOBexp	M A	No	No	Me
Ps_066	-596,33	1,14	0	-522,24	No	M A	No	No	No
Ps_068	-631,23	-38,51	0,06	16,39	SOBexp	M A	A	No	No
Ps_070	-9,69	-51,07	5,27	0,19	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_071	-167,56	-2200,72	13,13	0,08	SOBexp	M A	M A	No	No

	Tu_Na vs Tu_AC	Tu_NA vs Tu_AC	Cy/Tu Cy	Tu/Cy	Ef Trtmt	SOBexp		subexp	
						Susc (Tu)	Tol (Cy)	Susc (Tu)	Tol (Cy)
Ps_072	-9,02	1,98	-0,22	-4,56	No	Me	No	No	No
Ps_073	1,17	-1,87	-1,6	-0,62	No	No	No	No	No
Ps_075	3,42	-2,28	-0,67	-1,5	No	No	M B	No	No
Ps_076	-2,28	-4,01	1,76	0,57	SOBexp	M B	B	No	No
Ps_078	-64,25	5,86	-0,09	-10,96	No	A	No	No	Me
Ps_079	-4,28	2,23	-0,52	-1,92	No	B	No	No	M B
Ps_081	-449,33	-35,92	0,08	12,51	SOBexp	M A	A	No	No
Ps_082	3,35	2,9	0,87	1,15	subexp	No	No	B	M B
Ps_083	-5,84	-6,47	1,11	0,9	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_084	-14,77	-35,83	2,43	0,41	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_085	-15,32	2,03	-0,13	-7,56	No	Me	No	No	M B
Ps_087	-363,64	1,96	-0,01	-185,72	No	M A	No	No	No
Ps_088	-1106,26	1,56	0	-707,39	No	M A	No	No	No
Ps_089	-671,67	-123,18	0,18	5,45	SOBexp	M A	A	No	No
Ps_090	-29,21	1,73	-0,06	-16,84	No	A	No	No	No
Ps_091	-2,73	-2,72	0,99	1,01	No	M B	M B	No	No
Ps_092	-5,76	-6,59	1,14	0,88	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_094	-1,13	-7,04	6,23	0,16	No	No	Me	No	No
Ps_095	-340,36	-42,36	0,12	8,03	SOBexp	M A	A	No	No
Ps_096	-809,61	-3266,63	4,03	0,25	SOBexp	M A	M A	No	No
Ps_098	-155,54	1	-0,01	-155,09	No	M A	No	No	No
Ps_100	-8,82	-5,01	0,57	1,76	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_101	-10,09	-16,86	1,67	0,6	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_105	-7,12	-6,15	0,86	1,16	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_106	-21,17	1,28	-0,06	-16,54	No	A	No	No	No
Ps_108	-30,07	-1,42	0,05	21,16	No	A	No	No	No
Ps_110	-56,1	1,2	-0,02	-46,86	No	A	No	No	No
Ps_111	-1,81	-2,2	1,21	0,82	No	No	M B	No	No
Ps_113	-382,77	-463,43	1,21	0,83	SOBexp	M A	M A	No	No
Ps_115	-510,21	-19,13	0,04	26,67	SOBexp	M A	Me	No	No
Ps_117	-2411,38	-21,22	0,01	113,62	SOBexp	M A	A	No	No
Ps_118	-16,27	-62,63	3,85	0,26	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_119	2,92	2	0,69	1,46	subexp	No	No	M B	M B
Ps_122	-9,91	3,22	-0,32	-3,08	No	Me	No	No	B
Ps_123	-19,68	2,47	-0,13	-7,95	No	Me	No	No	M B
Ps_124	-1,3	-9,56	7,35	0,14	No	No	Me	No	No
Ps_126	-5,15	-15,74	3,05	0,33	SOBexp	Me	Me	No	No
Ps_127	-5,49	-6,29	1,15	0,87	SOBexp	Me	B	No	No
Ps_128	-18,14	2,51	-0,14	-7,22	No	Me	No	No	M B
Ps_129	-9,17	1,31	-0,14	-6,98	No	Me	No	No	No
Ps_130	-7,36	-34,16	4,64	0,22	SOBexp	Me	A	No	No
Ps_131	-6,34	27,58	-4,35	-0,23	No	Me	No	No	A
Ps_132	-1429,45	158,85	-0,11	-9	No	M A	No	No	M A

Tu: ZP-1366, Cy: Cheyenne; NA: No Aclimatada; AC: Aclimatada; EF Trtmt: Efecto Tratamiento; SOBexp: Sobreexpresión; subexp: subreexpresión; Susc: línea susceptible; Tol: línea tolerante; M A: Muy Alto A: Alto; Me: medio; B: bajo; M B: Muy bajo; No: no hay efecto



Capítulo VIII

Abstract

APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS IN FIELD PEA (*PISUM SATIVUM* L.) BREEDING

ABSTRACT

INTRODUCTION

PLANT BREEDING AND PLANT GENETICS

Plant breeding began with the beginning of agriculture and the domestication of the first crops, using the genetic variability that arises in wild and cultivated plants to improve these crops (Ellstrand *et al.*, 1999). In the nineteenth century, with the beginning of modern genetics is also born plant breeding. The scientific basis for the inheritance of genes in plant species allow to develop more specific, higher precision and efficient plant breeding programs.

A plant breeding program must consider outcomes linked to a need. Achieving these objectives depends markedly on the implementation of the different previous phases that are established within the breeding program: (1) collecting and sorting the material, (2) study the origin, evolution, diversity and behavior of the material, (3) study of the variability and inheritance of varietal differences and (4) study of the problem to improve tolerance ranges, inheritance, and expression and selection of breeding lines.

The first phase involves, chiefly, obtaining ordered collections of cultivated plants which represent existing range of variation and, secondly, descriptions and clear classification of this material, based on observations and measurements of morphological, physiological, genetic, cytologic, ecological and plant pathology (Frankel, 1947). This phase is crucial for the development of all subsequent work. Moreover, the development of the final stages of a breeding program can be enhanced by employing the use of tools and techniques developed by other sciences to meet the objectives of the program more effective and efficient. Molecular markers are a versatile and powerful tool applicable to all phases of a plant breeding plan.

Molecular markers are particularly useful when it is necessary to select breeding characters controlled by numerous genes, each of which contributes to the development of low proportion character (Weeden and Muehlbauer, 2004). Most of these markers, developed and used in the past, were based on genomic DNA (gDNA), and consequently can come from both transcribed regions as non-transcribed regions of the genome (Gupta and Rustgi, 2004). These DNA-based markers, derived from any region of the genome, have also been described as RDMs (Random DNA Markers) and can be generated thousands of them, phenotypically neutral and randomly for any species (Bagge *et al.*, 2007; Varshney *et al.*, 2007). However, more recently, interest has shifted toward the development of molecular markers based on the translated region of the genome (GTMs, Gene Targeted Markers).

Molecular markers have allowed the study of diversity based on the variation in the DNA sequence, which has provided (1) the understanding of the domestication of cultivated species (White and Doebley, 1998), (2) the review of history of plant breeding (Narvel *et al.*, 2000, Russel *et al.*, 2000), (3) the conservation of genetic diversity through germplasm and / or lines grown in several species (Métais *et al.*, 2002; Steiger *et al.*, 2002) and (4) identification of cultivars (Rongwen *et al.*, 1995, Russel *et al.*, 1997). Genetic markers were initially used in

genetic mapping to determine the order of genes along chromosomes. Obtaining these genetic maps is related to the study of the variability and inheritance of varietal differences allowing the collection of genetic linkage maps and mapping of quantitative traits corresponding to QTL (Quantitative Trait *loci*). Linkage maps have helped identifying DNA markers linked to genes of agronomic importance, such as disease resistance, and have allowed the identification of DNA sequences related to these genes for use as diagnostic tools in plant breeding.

More recently, molecular markers have been used to study the effect of modern breeding plans on genetic diversity in cultivated species (Soleimani *et al.*, 2002). Moreover, molecular markers have been used successfully in other approaches of plant breeding, using them in QTL detection and localization, or their use in MAS (Marker Assisted Selection), map-based cloning, or genetic labeling, *inter alia*.

PEA

Pea is an herbaceous species with high level of autogamy, annual and presents great morphological variability. Pea genome is approximately 4,712 Mbp, distributed in seven pairs of chromosomes ($2n = 14$).

Pea is grown in Europe since prehistoric times, and its origin has been studied by several authors finding increasingly evidences of an ancient crop initiation of this species. Domestication began in the Stone Age in Asia being the focus of origin discussed by several authors. Without specifying the geographical origin, is recognized for its first expansion temperate regions of Europe and Asia to extend late by other climate regions and other continents.

The field pea, *Pisum sativum* L., is situated within the genus *Pisum*, which belongs to the family *Fabaceae*, and is within the subfamily *Papilionoidae* with genus like *Lathyrus*, *Lens*, *Vicia* or *Vavilovia*. The internal taxonomy of the genus *Pisum* has been much discussed, both in terms of the number of taxa within the genus, as its location within it. In this work we take as a reference the taxonomic classification of Ambrose and Maxted published in 2000 which reflects the separation in three species within the genus *Pisum*: *P. fulvum*, *P. abyssinicum* and *P. sativum*. Within the species *P. sativum* are two subspecies: *P. sativum* subsp. *sativum* encompasses *sativum* and *arvense* varieties, and *P. sativum* subsp. *elatius* which includes three varieties: *elatius*, *brevipedunculatum* and *pumilio*.

The pea crop carries a pedological conditions: medium or light textured soils, well drained and fresh, with a pH between 5.5 and 8. The general climate requirements are relatively cold temperatures and wet weather. Depending on the different climatic conditions in each region are nowadays available a large number of varieties adapted to different requirements (productivity, quality, tolerance or resistance to various biotic or abiotic stresses, etc), allowing crop extension to new regions or improve yield. With respect to cold tolerance varieties differ spring and winter varieties, the latter being more flexible allowing also in spring sowing and increased production (Ramos, 1996; Laguna *et al.*, 1997; Caminero, 2002).

Animal feeding is the main use as a crop. There are several reasons for growing pea what is important in the world, Europe and Spain in particular, in the first place has interest in the context of sustainable agriculture and more consistent with the conservation of the environment, and also has a beneficial effect recognized on subsequent cereal crops that include rotational. Secondly, the increase in vegetable protein needs in feed formulation decreasing in them the animal protein.

In 1994 the European Union created a strategic plan to reduce import needs and promote self-sufficiency in vegetable protein, this plan included support for growing grain legumes, including pea. Currently, the pea is the most common legume in Spain and Europe, and the fourth worldwide (FAO, 2011) and although Europe continues to import most of the protein required for animal feed pea production has increased. This causes not only an increase in the cultivated area, but a growing interest in this crop and its properties. Breeders are interested in increased yield through increased biomass production and / or an extension of the production area. Increasing the

biomass, as a greater number of seeds, can be accomplished by sowing in autumn. But to achieve this goal, peas must withstand various stresses including winter freezing is particularly important (Bozoglu *et al.*, 2007).

Pea varieties autumn-winter sowing have a longer growth cycle which can enable them produce more biomass and increased seed yield, they can also enter the flowering period earlier and avoid stress due to high temperatures and low availability of water stress that usually appear in late spring. Nevertheless, autumn-winter sowing is possible only if the varieties are resistant to cold, ie varieties that can survive the winter without damage or slight damage.

In our region, the negative effect of low temperatures can be translated into declining productivity, this may be due to the effect on germination, flowering or even the physical integrity of the plant which can encourage greater involvement by bacterial and other biotic stresses character, all these consequences mainly derived from primary effect of low temperatures on the plant, the formation of intra-or extracellular ice. Also been detected sowing problems associated with winter as the bedding (Dordio, 1997), the emergence of parasitic plants such as *Orobanche crenata* (Rubiales *et al.*, 1998, Abbate *et al.*, 1997) or bacterial blight (*Pseudomonas syringae*) (Biddle, 2001; Fondevilla *et al.*, 2011b, Martin-Sanz *et al.*, 2013) that although it may appear with the spring sowing are further enhanced with the advancement in sowing date.

Plants have developed winter support adaptive responses to seasonal changes, adapt to developmental and physiological level, using complementary strategies: escape the freezing and / or frost tolerance achieved through a prior cold acclimation. The mechanisms associated with this strategy are the impediment, whose basis is the reduction or avoidance of intracellular ice formation (Wery *et al.*, 1993), and tolerance, defined as the ability of the plant to withstand icing both extra-and intracellular through membrane stabilization mechanisms. These mechanisms of frost tolerance in plants can only be developed if the frost is preceded by a period of relatively low temperatures but not to the freezing point: cold acclimation process. The icy getaway involves the delay in the transition from vegetative to reproductive, as during the plant reproductive phase is more sensitive to stress and have any direct effect on crop productivity.

Due to the existence of these strategies in turn encompass different processes that shaped the cold tolerance understood as a complex stress, it is easily understandable that the first characteristic that defines this tolerance is that of being a quantitative character whose range of variability is ample, this implies both quantitative gene action and the synergistic action of several genes or gene families which complicates their study and selecting cold tolerant lines that are agronomically competitive and adapted to each region. This complexity leads to a lack of knowledge of genes directly involved in cold tolerance and their real effect.

Cultural crop practices exert their impact on the microenvironment in which the pea acclimates and withstand winter. Therefore, many factors can affect both the ability to acclimate pea and severity of the stresses to tolerate. Namely, winter hardness tolerance in pea represents tolerance to harsh winter conditions which are complex and highly variable (Swensen and Murray, 1991) and should be evaluated under field conditions. While tolerance to cold or frost can be accurately measured under controlled conditions.

As for the evaluation of cold tolerance, in regions where low temperature is the main limiting factor in surviving winter cold tolerance can be a good indicator of the winter hardness, and can be measured directly (Murray and Swensen, 1991). Controlled freezing assays allow precise control over experimental conditions and facilitate replication experiments in time (Liesenfeld *et al.*, 1986). The design of such assays has been described in detail in the use of controlled environment chambers to evaluate different levels of frost tolerance in the case of peas (Caminero, 2002).

However, evaluation methods in controlled environment chambers are not designed properly to differentiate between narrow ranges of tolerance or for segregating populations. In this aspect, it seems clear that obtaining molecular markers linked to genes for tolerance to frost, which can be used in marker-assisted selection, will play an important role in defining breeding plans for winter sowing.

MOLECULAR TOOLS IN PEA BREEDING

There are several centers of plant genetic resources including peas in their germplasm collections, being highly representative for the high number of entries that have: Vavilov Research Institute of Plant Industry (Russia), Nordic Gene Bank (Sweden) or John Innes Centre (United Kingdom). In Spain there are also genebank collections linked with pea, like the Plant Genetic Resources Centre (CRF), the Mission Biological Galicia (MB-CSIC) and the Agricultural Technological Institute of Castilla y León (ITACyL).

Major germplasm collections have accumulated a large number of wild pea accessions, but many of them are duplicates under different designations what lies in difficulties in phylogenetic analysis and classification. In fact, comparing the results of different phylogenetic analysis is difficult due to the different populations of accessions evaluated and incomplete information about their taxonomic attribution and source of wild representatives included (Kosterin and Bogdanova, 2008).

Today the cultivated pea gene background is diverse, reflecting its early domestication and its subsequent expansion in culture. However, the genetic diversity found in today's pea cultivars in Eastern Europe has been described as very scarce, especially in the improved varieties as spring forage sowing. Baranger *et al.* (2004) and Tar'an *et al.* (2005) showed a close genetic diversity among related varieties Eastern Europe, especially in spring sowing pea. In contrast, Tar'an *et al.* (2005) show a high genetic diversity in lines whose origins are Canada and Australia.

Studies of diversity in pea have been directed towards the study of bio-systematics in the genus *Pisum* (Hoey *et al.*, 1996, Ellis *et al.*, 1998), or to the establishment of different molecular markers to analyze the genetic diversity within *Pisum* (Lu *et al.* 1996; Posvec and Griga, 2000; Burstin *et al.* 2001; Simionuc *et al.*, 2002). Recently, studies of diversity in pea encompassing both approaches have attempted (Baraguer *et al.*, 2004). In recent years, it has been shown that the most informative phylogenetic advances are obtained by combining several types of markers, characterized by different evolutionary rates, and thus allowing to obtain complementarity reveal genetic information (Baranger *et al.*, 2004). Several authors describe a clear genetic distinction between ecotypes and cultivars (Hoey *et al.*, 1996, Ellis *et al.*, 1998; Baranger *et al.*, 2004) and separation between accessions or by end use: animal or human, or according to their date of sowing: fall or spring (Baranger *et al.*, 2004). Even they have used methods based on retrotransposons (SSAP: Sequence-Specific Amplification Polymorphism, IRAP: Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism and REMAP: RETrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) to determine the genetic fingerprint of varieties and, based on this identification of varieties, develop genetic maps in pea (Ellis *et al.*, 1998; Kalendar *et al.* 2010). In a plant breeding program, the estimation of the genetic relationships among parental lines can be useful in determining what material should be combined in crosses to maximize genetic gain. The background of genetic diversity among parental lines provides a wide range of allelic variation that can be used to create new favorable gene combinations (Tar'an *et al.*, 2005).

It has been developed a wide range of DNA-based markers in *Pisum* including microsatellite markers based on retrotransposon, and anchored marker genes. All markers have been used for various purposes: to construct genetic consensus maps (Loridon *et al.*, 2005, Aubert *et al.*, 2006), analysis of diversity (Barangers *et al.* 2004; Jing *et al.*, 2005 Smykal *et al.*, 2008), and detect QTL (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2004; Burstin *et al.*, 2007; Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008).

Most molecular markers developed and used in the 90s, been based on the resulting gDNA RDMs (Random DNA Markers), such as RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) or ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Gupta and Rustgi, 2004). These markers have limited usefulness in comparative mapping studies. Although various pea maps can be compared to each other through common *loci*, most of the markers used in different mapping populations remain RAPDs or AFLPs, making difficult to transfer information among cross populations in pea (Brauner *et al.*, 2002).

On the other hand, has been emphasized the development of molecular markers from transcript regions of the genome, with the increasing availability of EST and cDNA libraries. Based on these markers based on transcript sequences, has taken another step toward developing GTM markers (Gene-Targeted Markers) in pea have been developed STS (Gilpin *et al.*, 1997, Weeden *et al.*, 1999), CAPs, dCAPs, ASPs (Aubert *et al.*, 2006) and have been employed in obtaining linkage maps and analysis of synteny with *Medicago sativa*. The use of CAPs has enabled localize genes in pea and other crops, Gilpin *et al.* (1997) designed primers based pea cDNA sequences and mapped a number of CAPs *loci* on the consensus linkage map or in other maps.

The main RILs populations for mapping derived from intraspecific crosses of *Pisum sativum*. These populations come specifically for the linkage analysis of RIL generation (F₈ generation and later) In a study of the relationship between genetic and cytogenetic maps in pea (Hall *et al.*, 1997) found a difference between the lengths maps, 1800 cM against, approximately 750 cM. A linkage map of pea consisting mainly on RAPDs resulted in the length of the map 1139 cM (Lacou *et al.*, 1998). The map expansion in general and the disparity between the genetic and physical maps have been discussed in various species (Sybenga, 1996).

Throughout the time genetic maps have been developed using different types of more specific genetic markers such as SSR (Weeden *et al.* 1998; Pilet-Nagel *et al.* 2002; Prioul *et al.* 2004; Loridon *et al.* , 2005), have published comparative maps between *Medicago sativa* and *P. sativum* (Kalo *et al.*, 2004, Aubert *et al.* 2006) and, even consensus maps with extensive information on different types of markers (Loridon *et al.*, 2005) or informative sequences, EST, (Gilpin *et al.*, 1997). Also been constructed anchoring linkage maps resistance genes (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000) or QTL associated with resistance to various biotic stresses (Hunter *et al.*, 2001; Tar'an *et al.*, 2003; Prioul *et al.*, 2004; Frew *et al.*, 2002; Fondevilla *et al.*, 2011b).

Most traits of agricultural interest in pea, as in other plant species are quantitatively inherited. Also, many of the characters associated with the yield of this crop have shown correlated with each other and have been studied, such as pod dehiscence (Weeden *et al.*, 2002) or significantly high correlation found between seed yield and the number of pods per plant (Dore *et al.*, 1998). The complexity of these phenotypic traits showing continuous variation comes from the segregation of alleles of many interacting *loci* (QTL), which effects depend on the temperature. The study of quantitative traits in pea is rather limited; work was performed according to the weight of seed (Timmerman-Vaughan *et al.*, 1996), the color of cotyledon (McCallum *et al.*, 1997), stem length and the number of internodes (Irzykowska *et al.*, 2002) related to the yield characteristics and the protein content of seeds (Wolko and Irzykowska, 2004).

QTL mapping provides the opportunity to extend the results of classical genetic studies. QTL studies have analyzed the color pea and seed weight (Timmerman-Vaughan *et al.*, 1996; McCallum *et al.*, 1997), the development of plant architecture (Dirlewanger *et al.* 1994; Tar 'an *et al.*, 2003), the ability of branching (Rameau *et al.*, 1998) and disease resistance (Pilet-Nayel *et al.* 2002; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002). The maximum development of this approach based on the location of QTL on linkage maps in pea has been linked closely to the study of resistance against different abiotic and biotic stresses. In this sense, most of the work done under this approach pose the ultimate aim of applying the results to MAS.

Between different biotic on which QTL studies have been conducted, include those caused by two fungi: *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, causing wilt in pea, and *Mycosphaerella pinodes*, causing ascochytirosis. In the case of *Fusarium oxysporum* different breeds were detected to cause pathogenesis, several authors have linked these races resistance to different linkage groups on the genetic map of pea (Coyne *et al.* 2000; McPhee *et al.*, 2012). With respect to *Mycosphaerella pinodes*, found numerous QTL associated with resistance to this pathogen, since the early studies (Clulow *et al.*, 1991; Dirlewanger *et al.*, 1994; Wroth, 1998; 1999), based mainly on the description of the disease and its basic genetic linkage, to more complete studies (Bretag and Ramsey, 2001; Tar'an *et al.*, 2003, Timmerman-Vaughan *et al.*, 2004). Regarding resistance *Uromyces pisi* Barilli *et al.* (2010) described a QTL associated with resistance to this pathogen with 65% of variance explained in LGIII pea. Relative to other

pathogens, have been described resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* in LGII VI and VII (Hunter *et al.* 2001 Fondevilla *et al.*, 2011).

In pea for QTL correlate the relative maturity of the plant and the field tolerance to *Acochyta* blight, both correlations showed phenotypic traits (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002). Therefore, QTL mapping also provides information on the genetic basis of phenotypic correlations. In one of the first studies of QTL in pea, five genes showed to determine the seed character well known as rough mutant. The five genes encoding enzymes involved in starch synthesis: starch branching enzyme I (r, Bhattacharya *et al.*, 1990), ADPglucose pyrophosphorylase (rb, Martin and Smith, 1995), plastidial phosphoglucomutase (Harrison *et al.*, 1998), sucrose synthase (rug4, Craig *et al.*, 1999), and starch synthase II binding granule (rug5, Craig *et al.*, 1998). Other genes, including those coding for AGPase, PepC, and AAP1, had drastic effects on seed size and its composition when their expression was altered in transgenic legumes (Weber *et al.*, 2005).

The yield can be increased by early sowing (Caminero. 2002) and the use of early-flowering seeds (Dumolin *et al.*, 1996). Otherwise, another important determining factor in the sowing date and the cultivar is the required product (Bozoglu *et al.*, 2007). A study on sowing date showed that early sowing date increased seed yield and protein content (Ceyhan and Onder, 1999). Belcher (1999) evaluated spring pea cultivars sown in autumn and winter and spring. Winter cultivars produced significantly higher yields when planted in autumn but yields were reduced severely at sowing in spring (Bozoglu *et al.*, 2007).

Historically, it is considered frost tolerance in pea as a quantitative character, polygenic genes controlled by several additive genes (Markarian and Andersen, 1966; Andersen and Markarian, 1968; Auld *et al.*, 1983). Subsequently, Cousin *et al.* (1985) found intermediate dominance for cold tolerance and Liesenfeld *et al.* (1986) suggested that only 3 or 4 genes may be responsible for that character, also found that any of them is linked to the genes encoding hilum pigmentation (chromosome 6, current LGII) and seed coat pigmentation (chromosome 1 coincides with the current consensus map LGVI). Auld *et al.* (1985) discuss another gene or linkage group on chromosome 3 (current linkage group V) recessive gene linked to "er" which confers resistance to *Erysiphe polygoni*. Monti *et al.* (1993) found that, within the material of his essays, cold tolerance is dominant over susceptibility. However, the character of frost tolerance, despite its apparent complexity, appears to be highly heritable (Cousin *et al.*, 1993). Also Eteve (1985) suggests the possibility that there may be an influence on the cytoplasmic hardness tolerance winter, which seems to be confirmed in studies Liesenfeld *et al.* (1986).

In a study in the ITACyL on pea breeding associated with frost tolerance has contributed to the definition of pea ideotype for early sowing in Castilla y León (Caminero, 2002). In this sense, this study defined as ideal characteristics high branching capacity in the early stages of growth during the initial winter rigors phenology character as medium late reproductive cycle, mid or high height and elevated number of nodes to the first sheath and total number of nodes, seed size not large and high survival percentage of assessments in controlled environment chamber at -9°C, however the leaf morphology was found as not decisive (Caminero, 2002). More recently, Lejeune-Henaut *et al.* (2008) not only located several QTL associated with winter hardness, closely linked to molecular markers, but also showed the tight linkage between one of its *locus* QTL and *Hr*, primarily responsible for the advancement of flowering LGIII.

Current strategies to achieve the understanding of frost tolerance have focused on the processes of cold acclimation. In this sense, many of the pea breeding programs focused on this topic have been based on the progress made in other plant species. Specifically, the factors involved in legumes cold acclimation influence the expression of stress proteins to cold (Xin and Browse, 2000), accumulation of sugars, particularly sucrose (Hekneby *et al.* 2006), observing a increase of sucrose synthesis pathway during cold acclimation (Strand *et al.*, 2003). Such factors also favor the accumulation of other cryoprotectants, such as proline (Bravo *et al.*, 2001) and starch, whereas low levels of sucrose phosphatase synthase were detected in relation to the process of cold acclimation (Hekneby *et al.*, 2006) as well as changes occur on the lipid composition of the membrane (Dalmanndóttir *et al.*, 2001).

Further, these advances in proteomics associated with cold acclimation favor equally advances in other phases of improved winter hardness associated to pea. An example of these advances is the detection of winter hardness QTL associated with closely linked molecular markers to favoring the MAS application, but which GTM molecular markers are linked to whose function is known and involved in seed quality, as is the case with *Tri loci* linked to one of the QTL associated with frost damage (Lejeune-Henaut *et al.*, 2008). Progress in pea transcriptomic associated responses by different conditions has enabled comprehensive analysis of the transcriptome of this species, becoming plant biochemical model presented as a coverage almost complete transcripts in relation to aerial tissues (Frassen *et al.*, 2011).

The post-genomic technologies have enabled more progress in genetic profiling studies have been quickly integrated into the field of plant science. These technologies can provide a valuable source to decipher complex regulatory networks, improving our knowledge of the mechanisms underlying the different plant-pathogen systems and the identification of relevant genes in biological processes. Among methods for measuring gene expression in biological systems, the more accurate is based on the quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR, Die *et al.*, 2010). This technology, RT-qPCR, is currently the most sensitive method for detecting mRNA (reviewed in Bustin, 2000, 2002, Wong and Medran, 2005; Bustin *et al.*, 2009).

The current approach is applied to improve the utilization of technological tools for most markers develop ever better to allow MAS with the hope that this will speed up the development of improved cultivars for farmers. In general, the rare genomic sources developed for winter legumes and limited saturation QTL associated genomic regions make difficult the identification of markers linked and highly accurate position determination of the QTL (Rubiales *et al.* 2009b). The effectiveness of MAS could increase in a short period of time with the adoption of new developments in marker technology with the integration of comparative mapping and functional genomics. Saturation could be key genetic maps with genetic markers located in active regions and to detect gene expression QTL (eQTL) to a selection by more reliable.

OBJECTIVES

The overall objective of this work is to contribute to the development and application of molecular tools useful for breeding field pea, linking with the activities related to the breeding for obtaining new varieties developed in the Agricultural Technological Institute of Castilla y León (ITACyL).

The attainment of this overall objective arises through three approaches applicable to such breeding program, for each of which raises the following specific objectives:

1. Exploratory analysis of the genetic background of a representative germplasm collection of *Pisum* genus.
2. Preliminary studies related to genetic mapping required for the application of molecular markers assisted selection as support.
3. Determining, by studying gene expression of candidate genes related to processes of cold acclimation and winter hardness.

MATERIALS AND METHODS

STUDY OF GENETIC VARIABILITY AND GENETIC ANALYSIS OF POPULATIONS

We selected a total of 288 accessions belonging to the genus *Pisum*. Among all accessions, 40 lines corresponded to accessions of the genus *Pisum*, grouping different taxa within the genus, excluding *P. sativum*. The remaining 244 pea lines belonged to the taxon *P. sativum* and corresponded to cultivars, ecotypes, wild lines and commercial lines. Among the different accessions that composed the study sample, a total of 58 lines were

commercial varieties whose geographic origin was not included in the analysis. The remaining accessions were matched: 54.3% of European descent, 25.2% were Asian accessions, 10.9% of American entries, 6.5% from Africa, and 2.6% came from Oceania.

All lines were obtained through donations from genebanks from different research centers: United States Department of Agriculture (USDA), Institut National de Recherche Agronomique (INRA), John Innes Centre (JIC), National Centre for Plant Genetic Resources (CRF) of the National Research Institute for Agriculture and Food Technology (INIA) and the Institute of Technology of Castilla y León (ITACyL). The information in the passport data and characterization of each of the accessions were obtained from the databases available donor from genebank and others related.

For the study population and diversity analysis were selected those molecular markers submit at least biallelic polymorphism. The final list of selected markers to be analyzed in the pea line set consisted on 31 RBIP, 20 SSR and 32 GTM: 5 ASP, 10 CAP, 9 Size, and 8 STS.

DNA isolation was performed using the protocol "Norm's Mini Mix: DNA Isolation Microprep" based on the CTAB method (Doyle and Doyle, 1990) and obtained through the USDA-ARS (Pullman, WA). DNA quantification and quality control was performed using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

The PCR amplification reactions were performed based on the previously described mixes by different authors and optimizing the concentrations for optimal resolution with the lowest possible concentrations. Amplification conditions were the same as those given by the authors who designed each type of marker.

For all CAPs, and STS dCAPs described by Gilpin *et al.* (1997) and Weeden *et al.* (1998), an aliquot was removed 10 μ l, 25 μ l of starting to check correct amplification product PCR obtained. Enzymatic digestion of the amplification product was carried out on the remaining volume of 15 μ l.

All amplification products obtained from PCR amplifications were resolved by horizontal electrophoresis in agarose gels. Staining was performed using a solution of ethidium bromide at 5 mg / mL. For viewing and photographing the gels used the Gel Doc XR transilluminator Gel Documentation System (BioRad).

Initial analysis were based on a descriptive study of genetic variability based on the observed number of alleles, percentage of polymorphic *loci*, effective number of alleles and Shannon index. The calculation of these parameters was performed using different software and based on the definitions made by various authors.

To study the distribution of genetic variability within and among taxa of the genus *Pisum* estimated two indices of diversity: the polymorphism index (Pj) and the index of heterozygosity (Hj). Furthermore, analysis of molecular variance (AMOVA: Analysis of Molecular VAriance) was used to study the distribution of variability. All statistics were calculated using the described Arlequin program v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

The population structure was analyzed based on a distance-based model described by Link *et al.*, (1995) to establish relations between defined groups within the population. Groups within the collection to study were defined in terms of the taxa. The algorithm used for constructing the dendrogram was based on neighbor-joining, NJ (Saitou and Nei, 1987 Studier and Keppler, 1988). All analysis was conducted using the free program construction and drawing of evolutionary trees away TREECON for Windows v1.3b (Van de Peer and De Wachter, 1994).

In order to set the number of groups in which the sample was structured to study and obtain the distribution and the degree of membership of each group accessions used a parametric model-based method using the program STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). The method based on parametric models using Bayesian clustering is performed for the overall sample similar to what is applied in the model based on distances, ie has been performed for all the overall molecular markers, and separately for RBIP, SSR and GTM. Furthermore, the analysis was

performed including geographic and physiologically information to determine whether clustering of the lines under these conditions.

From the results obtained by the method based on parametric models defined groups encompassed the sample. Expected heterozygosity was estimated for each *loci* in each of these groups. Finally plotted the number of alleles at *loci* relative to each of the groups defined and expected heterozygosity for each *loci*. For graphical representations Arlequin program was used v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

Depending on the structure obtained from the Bayesian method for germplasm collection studied groups were established within the sample. On these groups were performed PCA (Principal Component Analysis) to reduce the dimensionality of molecular data and represent the data in order to detect relationships between groups and an underlying structure. Finally, the graphical representation was performed in a two-dimensional space based on the first two components after applying a Varimax rotation. All the factor analysis was performed using SPSS v15.0.1 for Windows (IBM, USA).

Finally, we performed a multidimensional scaling analysis, PCoA (Principal Coordinates Analysis). This type of analysis is based on the distance metric to visualize Euclidean similarity or distance between samples was carried out from a distance matrix F_{ST} , allowing assigning, for accessions, a location in a space with a reduced number of dimensions, allowing to establish differences and similarities among the groups. This type of analysis was performed by SPSS v15.0.1 for Windows (IBM, USA).

GENETIC MAPPING AND QTL ANALYSIS OF AGRONOMIC AND ASSOCIATED WITH FROST TOLERANCE TRAITS

The construction of linkage maps was based on 3 mapping populations: PopESP, obtained from the crossing of the commercial variety "Cheyenne" and genotype ZP-1366, of Turkish origin, obtained from genebank ITACyL; PopFRA corresponding to cross between the cultivars French "Champagne" and "Terese" and PopUSA, obtained by crossing American commercial varieties "Medora" and "Melrose". The three populations were obtained by the technique of "Single Seed Descent" to obtain recombinant inbred lines (RILs) of F₆ plants in the case of PopESP, F₈ and F₉ in PopUSA PopFRA. For PopFRA, these RILs were obtained by INRA and their material was donated to the completion of this work, as PopUSA whose RILs were obtained from the USDA and donated to ITACyL. Finally, the population PopESP was developed entirely in the ITACyL as part of the field pea breeding program developed at this center. Mapping populations were obtained from a total of 94 RILs from PopESP, 144 RILs from PopFRA and 144 RILs from PopUSA.

All experimental methodology applied to obtain genetic maps has been based on the applied genetic variability analysis and analysis of population genetics, such that the methods employed to obtain the results matrices were the same. Once the genotypic data matrix for molecular markers was obtained, were added data concerning the differential morphological characters and proceeded to test segregation. Each marker was tested for the segregation ratio of 1:1, as expected for a Mendelian segregation for this population, using the Chi-square (χ^2 , df 1, p = 0.05).

The linkage maps for segregating markers in the three populations were performed using the program MAPMAKER / EXP version 3.0b (Lincoln *et al.*, 1992). The markers were positioned using the commands "try", "place" and "ripple" of the same program. Haldane function was used to calculate the distances in centiMorgan (cM). LOD thresholds to assign markers to linkage groups were set at $LOD \geq 3.0$ and the threshold distance of 30 cM. Genetic maps were designed from the results of linkage between markers using the program MapChart v 2.2 (Voorrips, 2002).

PopESP and PopFRA populations were sowed in two locations, Zamadueñas and Peñafior, in autumn and spring, and during two successive seasons, 2006-2007 and 2007-2008. The design of all crops was based on the experimental design of randomized complete block, including all lines assessed by molecular markers.

Evaluations during the first field year were conducted for each test based on agronomic traits: (1) percentage of seed germination (% SG), assessed as a percentage of total seed germinated over the sown, (2) feasibility germinated plant (% PV), evaluated as percentage of viable plants regarding germinated plants, (3) the beginning of flowering (INF), measured as the time at which 50% viable plants had bloomed, (4) total seed weight (PT), an average total weight of the harvested seed, (5) average number of seeds (N) as the average number of seeds per unit experimental and (6) weight of 100 seeds (P100), as the average weight for 100 seeds. In the second year was performed the same evaluations and assessments were added corresponding to (7) flowering ending date (FIF), defined as the date at which 50% of the plants have finished flowering stage, (8) theoretical harvest date (COS), as the date at which 50% of the plants have dried pods, (9) average number of branches (RAM) as the average of branches per plant evaluated in a total of five plants at the time of harvest.

To evaluate cold tolerance in *s. str.*, reducing other environmental effects that act in parallel during the winter and may affect the evaluation of the ability of the plant to tolerate low temperatures, we proceeded to perform a test on the population PopUSA under 4 different temperatures: -6°C, -9°C, -12°C and -15°C by an experiment in controlled environment chambers. The protocol followed for completion of the freezing test was proposed by Caminero (2001) with minor modifications.

Before subjecting the plants to the acclimation process as an initial assessment of the percentage of emergences (NAS-AC) for each line tested, so as to check the germination of the plants. After 2 weeks at 4 °C were performed assessments pre-frost (Pre-Fr), which were evaluated: (1) percentage of viable plants (% Viab-Pre-Fr), defined as the percentage of living plants after acclimation. Post-frost assessments (Post-Fr) were performed the day after having finished the frost test for all temperatures and assessed: (2) percentage of surviving plants to frost (% SUP-Post-Fr) treated as the percentage of living plants regarding to % Viab-Pre-Fr. Finally, after two weeks of conditioning were conducted evaluations recovery (Rec), in which we calculated: (3) the recovery percentage (SUP-Rec%) depending on the number of viable plants as a % SUP-Post-Fr and (4) development of apices (Br), quantifying the average number of new branches in terms of% SUP-Rec. The valuation of the plant was carried out according to three points: damage leaves, stems damage and overall damage. The damage scales relied on those defined by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008).

Once all field evaluations and climatic chamber were concluded, was set as initial data matrix for each of the lines evaluated. The matrix integrated each individual assessment for each repetition as independent variables. Each variable was subjected to analysis of variance using SPSS v15.0.1 for Windows (IBM, USA).

After obtaining the various linkage maps using the program MAPMAKER / EXP output data with quantitative trait analysis allowed detection of QTLs by Windows program QTL Cartographer (WinQTLCart) v2.5 (Wang *et al.*, 2005) following the conditions described in Timmerman-Vaughan *et al.* (2002) and Lejeune-Hénaut *et al.* (2008). The QTL were mapped using composite interval mapping (CIM), selecting the program itself model 6 (5 markers over control), standard model, with an accuracy of 1 cM, a window size set at 10 cM and 5 control markers. The markers used as cofactors were selected by the method of forward and backward regression (inside and outside probability where each set has a value of 0.1). The percentage of variance, R^2 , under $H_0: H_3$ ($H_0: a = 0, d = 0, H_3: a \neq 0, d \neq 0$, where a is the additive effect and d the dominant effect) was estimated by the program. The QTL detected by CIM were declared significant if exceeding the significance threshold determined after running a test of 1,000 permutations ($\alpha = 0.05$) for each evaluated quantitative trait in each population. Higher threshold $LOD = 2.50$, was selected for CIM for all traits.

The screening criteria applied to all CIM results for the QTL were: select those QTL with LOD value > 2.50 and R^2 values $> 1\%$. Linkage maps were constructed by MapChart v2.2 (Voorrips, 2002) QTL associated with each characteristic, obtained by QTL Cartographer Windows (WinQTLCart) v2.5 (Wang *et al.*, 2005). The map was constructed following the selection of the QTL according to the comparisons above, for each of the temperatures, in order to compare all the features evaluated together with temperature tested.

DIFFERENTIAL EXPRESSION ANALYSIS ASSOCIATED WITH PEA ACCLIMATION

The lines chosen for the study of differential expression associated with acclimation in pea were selected based on prior information concerning possible differential behavior to winter hardness, in particular by the degree of frost tolerance described for each accession, distinguishing lines frost-tolerant and frost susceptible lines. We selected the six parents of three crosses used in genetic mapping section and associated QTL analysis of agronomic characters and frost tolerance: Medora and Melrose as PopUSA parentals, Terese and Champagne as PopFRA parentals and ZP- 1366 and Cheyenne as PopESP parentals.

In order to find out candidate genes related to cold tolerance pea sequences submission was achieved in the Genbank database / EMBL mRNA corresponding to *P. sativum*. From this search 132 genes were selected by their relationship in response to various abiotic stresses in related species and their respective sequences. For each of the selected sequences were designed optimal 132 primer pairs for use in real time PCR by applying PrimerExpress software (Applied Biosystems, USA). We confirmed the specificity of each sequence and the amplification system designed targeting the pea gene selected by the BLASTN megablast option against available sequences of *Pisum* genus.

To quantify relative assays in real time PCR, qPCR, differential expression between tolerant and susceptible lines subjected to different treatments was used as endogenous control 18S amplification system, Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (VIC / TAMRA Probe, First Limited, Applied Biosystems, USA).

To study the effects of acclimation on different pea lines, trials were designed on controlled environment chambers for evaluating tests and collect tissue samples from the three frost tolerant genotypes (Ml, Cg and Cy) and the three genotypes susceptible to frost (Md , Te and Tu). In order to compare the difference in expression levels, we designed two experiments: Control or acclimation (NA) and acclimation (AC).

Obtaining RNA, from collected tissue samples, was performed using a protocol based on the use of TRIzol (Invitrogen, UK) according to manufacturer's recommendations. RNA quantification and quality control of RNA isolation was performed by two techniques: (1) a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) analysis to verify RNA quality and quantity and, (2) electrophoresis agarose gel in 1X TAE, to verify the absence of contaminants such as DNA. Synthesizing a single-stranded DNA copy from the extracted total RNA was used oligo (dT) and M-MLV RT reverse transcriptase (Invitrogen, UK) and according to manufacturer's recommendations.

Prior to any testing proceeded to optimize PCR conditions for conventional test systems designed for DNA amplification pea. The amplification conditions were also adjusted to the length and sequence features of the primers designed, as taken into account the size of the expected product. The amplification products were resolved on agarose gels in 1% 1 x TAE and visualized after ethidium bromide staining.

After removal of these ineffective amplification systems were, we proceeded to optimize the conditions for qPCR. The concentration of the reagents for the tests was optimized to reduce the reaction volume and to select the necessary amount of cDNA. In this sense, TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) was used for all tests with the 18S rRNA as buffer system and 2 µl of the cDNA obtained from reverse transcription. Amplification conditions followed for all experiments performed were those recommended for the reference gene 18S by the commercial (Applied Biosystems, USA).

In the case of systems designed was employed the same amount of cDNA and the concentration recommended by manufactures (Applied Biosystems, USA): 1 × PCR mix Universal SYBR Green PCR Master Mix, in a final volume of 20 µl reaction. Based on these conditions concentrations of primers were modified. Tested concentrations, in nM, were (in forward-reverse direction): 50-50, 50-100, 100-50, 100-100, 50-300, 300-50, 100-300, 300-100 and 300-300.

Relative quantification of variations in gene expression by qPCR was performed using the equations, assumptions, experimental designs and validations described in User Bulletin No. 2 Applied Biosystems (P / N 4303859). We followed the performance standards suggested by Bustin *et al.* (2009) for the development of relative quantification experiments and the results obtained by quantitative PCR. Calculations were performed by comparative Cq method or $2^{-\Delta\Delta Cq}$ Method.

Before performing the relative quantification analysis proved the sensitivity and precision in quantifying amplification systems tested. Based on these results, it could set the limit of detection (LOD: Limit of Detection) of 18S amplification system and the limit of quantification (LOQ: Limit of Quantification). The construction of the standard curve performed based on the results of LOD and LOQ mentioned. The regression line was constructed according to the dilutions for the linear dynamic range. We calculated the regression coefficient R^2 to check the linearity of the system. Finally calculated system efficiency, E, based on the equation: $E=10^{-1/s}-1$, being s the slope.

Determining the difference in expression of the genes analyzed was used always in control conditions on susceptible genotype, in this case Medora. Comparing the differential expression was performed on samples subjected to testing AC, two weeks acclimation at 4°C. Were separated by side systems which showed overexpression between genotypes and, secondly, the underexpression showing. Finally, those systems were prepared amplification showed no significant difference ($p < 0.05$) in the expression levels between genotypes.

Both, overexpression and underexpression, were divided into two levels, a high level of differential expression for those amplification systems showed absolute values greater than 3, and a low level of differential expression when $\Delta\Delta Cq$ absolute values were between 2 and 3. Values between -2 and 2 were considered similar expression between the two genotypes, assuming no differential expression.

We defined the criteria for comparative analysis between the expression levels of the two types of pea lines, tolerant (Ml) and susceptible (Md), with respect to the control (NA) against after acclimation status (AC). So that we could differentiate the different causes of the variation in expression levels, expressed as $\Delta\Delta Cq$.

To verify that the results obtained for genotypes Melrose Medora and kept regardless of the line analyzed we studied selected amplification systems in the other 4 genotypes, two susceptible: Terese (Te) and ZP-1366 (Tu), and two tolerant: Champagne (Cg) and Cheyenne (Cy) and, compared with the results obtained previously in genotypes Medora (Md) and Melrose (Ml). Since Cq values were calculated and analyzed $\Delta\Delta Cq$ to test results: (1) the differential expression levels of the samples without acclimation and after acclimation, (2) the results of the separate evaluation of susceptible genotypes and tolerant genotypes, after the control experiment and after acclimation treatment, (3) the joint analysis of differential expression shown by the six lines evaluated. Finally we could identify genes whose expression was enhanced or suppressed by the effect of acclimation, regardless of specific genotype.

RESULTS AND DISCUSSION

STUDY OF GENETIC VARIABILITY AND GENETIC ANALYSIS OF POPULATIONS

After selection and screening processes, a total of 83 molecular markers were selected: 31 RBIP, 20 SSR and 32 GTM. Molecular markers are analyzed to detect a total of 233 alleles, which represents an average of 2.84 alleles per *locus*. However, differences were observed among the different types of molecular markers. Specifically, the GTM showed a mean of 2.28 alleles per *locus* and, similarly the RBIP reached an average of 2.28 alleles per *locus*. Moreover, the SSR showed a mean of 4.15 alleles per *locus*.

The number of alleles observed by RBIP was established between 1.53 and 3.20, which was similar to that found by Smýkal *et al.* (2008a) of 2.69 alleles observed by RBIP. Referring to the number of effective alleles and Shannon index, this paper presents values of 1.74 and 0.62 respectively, and these results are similar to those found

in the present work (effective number of alleles: 1.46 to 1.90 and Shannon index: 0.33 to .070). Finally, Martin-Sanz *et al.* (2011) obtained between 2 and 4 alleles per *locus*, corresponding to the number of alleles detected maximum and minimum in our work. Therefore, the results obtained in terms of the number of allelic variants, the degree of polymorphism and genetic variability detected by such markers, are consistent with the detailed information on other related work.

Related to Shannon index, the variability detected by RBIP in *P. sativum* was the lowest of the three types of markers. For other taxa, except *P. arvense* in the GTM and RBIP values were similar (0.52), the lowest values detected for GTM. In relation to the values obtained for the percentage of polymorphism, the RBIP showed the lowest values in the groups that encompass taxa *P. abyssinicum*, *P. arvense* and *P. elatius*, while GTM showed them to *P. fulvum* and *P. humile*. The group *P. sativum* showed 100% state of polymorphic *loci*, by contrast, *P. humile* and *P. abyssinicum* only reached 43% of polymorphic *loci* for GTM and RBIP respectively.

The multiallelic character resulted from SSR analysis was expected, since many previous works describe these as highly polymorphic markers (Tam *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2006; Ijaz and Khan, 2009), including studies in pea (Flavell *et al.* 1998; Becher *et al.* 2000; Barangers *et al.* 2004; Tar'an *et al.*, 2005) which shows its high polymorphism, accuracy, codominance and genome coverage, the same so that its strength is shown in pea (Burstin *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2002; Loridon *et al.*, 2005).

The SSR markers are widely used and have served as a tool in the study of *Pisum* genus diversity in previous work mentioned and more current (Smýkal, 2006; Smýkal *et al.*, 2008a; 2008b; Nasiri *et al.*, 2009; Sarimakis *et al.*, 2010) demonstrating its usefulness and versatility. The number of alleles observed by SSR established between 1.85 and 4.6, so this result is similar to that found Burstin *et al.* (2001) alleles of 2.9 and 3.6 in total polymorphic *loci* alleles. Instead, it is slightly lower than found by Baranger *et al.* (2004), which reached an average number of alleles per SSR 5.6, but explains the presence of 50% of rare alleles. Furthermore, these results are consistent with other similar studies performed in autogamous species *Medicago* sp (Diwan *et al.*, 2000), barley (Becker and Heun, 1995) or coconut (Perera *et al.*, 2000).

In relation to the application of markers based on GTM, in diversity published papers, number is much smaller. However, Baranger *et al.* (2004) used STS, inter alia, for studying STS pea diversity and detected a large number of alleles (3.60) only overcome by SSRs. These results are slightly higher than those found in this study (1.44 to 3.00), but also reveal a high percentage of rare alleles, up to 38%.

The results obtained for each type of molecular marker are consistent with those obtained by other authors. The comparison among the values obtained for the parameters analyzed in relation to the type of molecular marker states that SSR markers displayed higher number of allelic variants, were more polymorphism and shoed a wider range of genetic variability detected, characteristics defined in previous studies. In general, for all parameters presented, SSR allow establishing a greater range of variation in the variability found for each group. By contrast, proved RBIP molecular markers with a smaller range of variation within the taxon *P. sativum*, which can reduce the ability to detect and differentiate between potential subgroups of this taxon and within them.

However, although the degree of genetic diversity detected by RBIP considered within taxon has proved lower than that detected by the SSR, have proved to be suitable for studies involving various related taxa, this approach has also been suggested by other authors (Smýkal *et al.*, 2008a; Jing *et al.*, 2012). GTM markers have presented lower number of alleles, average polymorphism and lower range of variability but their values were higher than the RBIP in all groups of *P. sativum* (the taxon *P. sativum*, and wild groups and ecotypes). That assessment demonstrate GTM as a type of molecular markers potentially interesting in the study of *P. sativum* interrelated lines in accordance with the work of Konovalov *et al.* (2009) referring to the CAPs.

In our sample the G_{ST} value was indicated that 34.3% of the total variability is due to variability among taxa. Intra-group variability was high since the value of P_s of 0,201, degree of polymorphism intra-group, is close to the

value of 0.306, corresponding to the polymorphism present in the sample Total evaluated. D_{ST}/P_S was 0.522, which means that most of the intra-group variability has a high incidence in the total variability.

AMOVA analysis established that the major source of variation resided among different accessions. The highest percentage of genetic variability (72.57%) corresponded to differences in the source of variation in accessions origins hierarchical taxa, followed by the differences among taxa (19.59%) and finally to the differences among origins within of each taxon (7.83%). The results from the AMOVA suggest that there are differences among taxa within the genus *Pisum*, although there are a significant source of variability within them, which seems to have been explained by the geographical origin, at least as far as distribution among continents concerned. Thus, a rating as to the geographical origin does not seem appropriate to further the population structure of the collection under study.

To try to understand the relationship among different taxonomic groups have been considered again eight accessions groups based on the six taxa hitherto used, performing a grouping and study according to the UPGMA method, as the Nei index for distance identity (1972) and getting four dendrograms corresponding to global data, and the results for each individual marker, RBIP, SSR and GTM respectively (Figure 1).

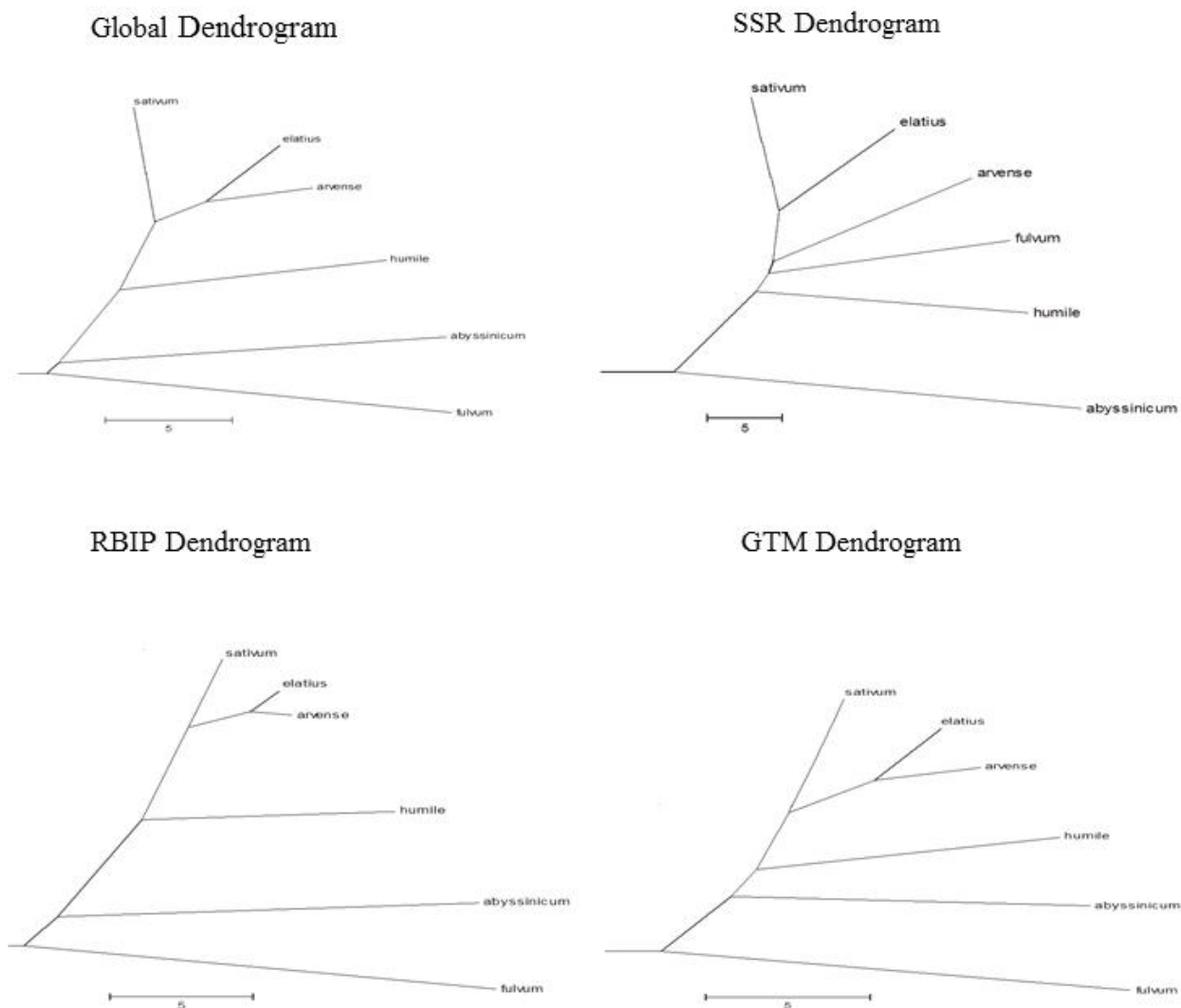


Figure 1. Genetic distance dendrograms for each type of markers and global

The more related groups to the taxon *P. sativum* were *P. elatius* and *P. arvense*, although the relationship among them depends on the type of molecular marker. Thus, there is a prior binding of *P. arvense* and *P. elatius* before joining *P. sativum* in the global dendrogram and those based on RBIP and GTM information. However, in the case of SSR dendrogram, previously bind *P. elatius* and *P. sativum*, forming a joint node which subsequently binds the taxon *P. arvense*.

Regardless of whether from the dendrograms obtained could be two or three subspecies within *P. sativum*, classification into five possible lineages presented by the global dendrogram obtained from the RBIP and GTM (*P. abyssinicum*, *P. fulvum*, *P. humile*, *P. elatius* and *P. sativum*) were consistent with the provisions of Knox and Ellis (2001) and Martin-Sanz *et al.* (2011), although the grouping methodology may differ slightly among studies. Also, most of the earlier work associated to dendrograms studies except Kosterin and Bogdanova (2008) and Jing *et al.* (2010) showed a greater similarity between *P. sativum* and *P. elatius* than with other taxa, which was also observed in our study, considering that those papers are not included specific accessions of *P. humile* or *P. arvense*. Only Nasiri *et al.* (2009) included in their study the taxon *P. arvense*. However, in this case situated nearest taxon *P. fulvum*, no *P. elatius*, as opposed to showing our results so far discussed. This divergence observed between defined using GTM and RBIP, was detected also in Nasiri *et al.* (2009), and open the discussion on the divergent information also comes from the dendrogram obtained using SSR. It is noteworthy that the overall dendrogram and those obtained by RBIP and GTM taxa show similar distributions, while the dendrogram obtained from SSR has proven to be different.

The analysis performed by Bayesian clustering method with the STRUCTURE program algorithm, based on parametric models has shown a clear separation of the accessions *P. sativum* from other taxa. Similarly, it has tended to separate the commercial varieties, local varieties and cultivars lines. However, depending on the type of marker and the analysis, these groups can be subdivided under different criteria.

In reference to the taxa not *P. sativum*, are clearly separated *P. fulvum* and *P. abyssinicum* of other taxa as *P. asiaticum* and *P. jomardii*, while *P. elatius* shows tendency to partition between the two groups. Separation of *P. fulvum* and *P. abyssinicum* only been detected by RBIP while type SSR markers and GTM have favored the separation of taxa clearly Asian origin.

For all analysis, increasing the number of groups in which is divided the sample, it has shown a clear trend toward the separation of pea accessions of purple flower, and in more than one case, it suggests a tendency of grouping according to geographical origin. The groups encompass purple flower accessions presented the highest values of differentiation, unlike accessions groups not *P. sativum* in which the degree of genetic similarity has proved remarkable. It has been observed that the global analysis using larger sample RBIP tendency to group according to the taxonomic classification, while SSR allowed classified according to the geographical origin, although there was a trend to geographically separate accessions by GTM, although the latter markers were groups depending on the type clear accession.

The color of the flower, as qualitative morphological character, has been important in the analysis of diversity developed by Baranger *et al.* (2004) and Smýkal *et al.* (2008b). Both studies found high correlation between the grouping of the accessions and the morphological character, among others. Our study also found a relationship between genetic diversity and color of the flower, as the analysis performed by SSR and GTM seem to find a related genetic structure to separate the materials grown by this morphological character.

The degree of differentiation has also been influenced by the type of marker used in the analysis and evaluated according to the group. In this sense, RBIP and SSR established taxa not being *P. sativum* as groups with lower genetic differentiation, and this has also remained in the joint analysis of markers, while GTM analysis by these groups showed a greater degree of differentiation, considering that the greatest degree of genetic similarity lay in highly restricted groups of accessions grown very specific features such as flower color or seed shape.

This change in the degree of differentiation estimations may be due to the different regions of the genome that evaluates each type of marker. Thus the SSR and RBIP are molecular markers whose target sequences are untranscribed from the genome, while the GTM are based on the amplified gene sequences, and therefore, transcript regions of the genome of pea.

The results presented are consistent with those obtained by Smýkal *et al.* (2008b). In their work suggested that the combination of two types of markers, SSR and RBIP, is more informative than individually. An approximation by RBIP is more accurate in phylogeny studies of a wide germplasm while using SSR approach would provide high resolution discrimination among closely related accessions. Therefore, depending on the type of markers used for statistical analysis of the collection structure may differ, favoring taxonomic interpretation of results. Overall influential criteria in the genetic hierarchy depends on taxonomic information, the type of material, its geographic origin and color of flower.

With respect to the structure of the collection, the results are consistent with those reported by other authors regarding clustering of taxa, as is the case Kosterin and Bogdanova (2008), but differ with respect to the results obtained by recent work Jing *et al.* (2010) or Martin-Sanz *et al.* (2011) in reference to the relations of *P. elatius* with other taxa. The differences in the grouping of taxa and accessions is common in the study of diversity of the genus *Pisum*, so that now remains unclear taxonomic organization of the genus and there are various theories about the relationships among the different accessions within the species *P. sativum*.

In an individual comparison, the work presented by Jing *et al.*, (2010, 2012) represent the largest effort to date in terms of number of accessions tested, which makes their work a reference to consider. However, the first genetic diversity analysis RBIP obtained by a single molecular marker type, so that the information may be biased. In this sense, the results from our sample RBIP and the additional information are consistent with their theories as *P. abyssinicum* is such as a different and greater degree of differentiation than *P. fulvum*, which has a high degree of genetic similarity, whereas *P. elatius* is divided between the two groups. The second paper (Jing *et al.*, 2012) adds a larger number of accessions from new collections and includes other markers, SSAP, also based on retrotransposons. The results of this second work largely confirm those obtained by RBIP. Our results agree with those suggested by the authors of the paper (Jing *et al.*, 2010) and Vershinin *et al.* (2003) with respect to *P. fulvum* as the ancestral taxon, and to *P. abyssinicum* as taxon formed from the junction of *P. fulvum* and other wild taxon, *P. elatius*.

The principal component analysis, PCA, allowed to clearly separating the taxa *P. abyssinicum* and *P. fulvum* each other, establishing close relationships among *P. arvense*, *P. humile* and *P. abyssinicum*. Also showed a trend toward structuring in three groups according to the type of material: landraces, wild relatives and a group of commercial varieties and cultivars. It also seems to have detected a certain differentiation between accessions of European and Asian origins of other materials, an apparent influence on the structure motivated by association with the color of the flower. Finally, we have detected a number of accessions that seem to encompass relatively divergent variability of the wholeness of the collection, at least as regards the possible implications of the variability provided by the projection on the second axis in Figure 2.

Taxa separation is consistent with previous work (Jing *et al.*, 2010, 2012, Martin-Sanz *et al.*, 2011), which shows the separation between *P. fulvum* and *P. abyssinicum*, while *P. elatius* distribution exhibits greater variability it contains. However, unlike these papers, in our case this type of analysis has allowed us to establish some influence on the genetic structure within the genus *P. sativum*, while not strictly or blunt, it seems at least have some influence by factors related to the geographical origin as a continent of origin, type of accession in their wild character of local variety or cultivar and as for his association with certain morphological characteristics such as flower color.

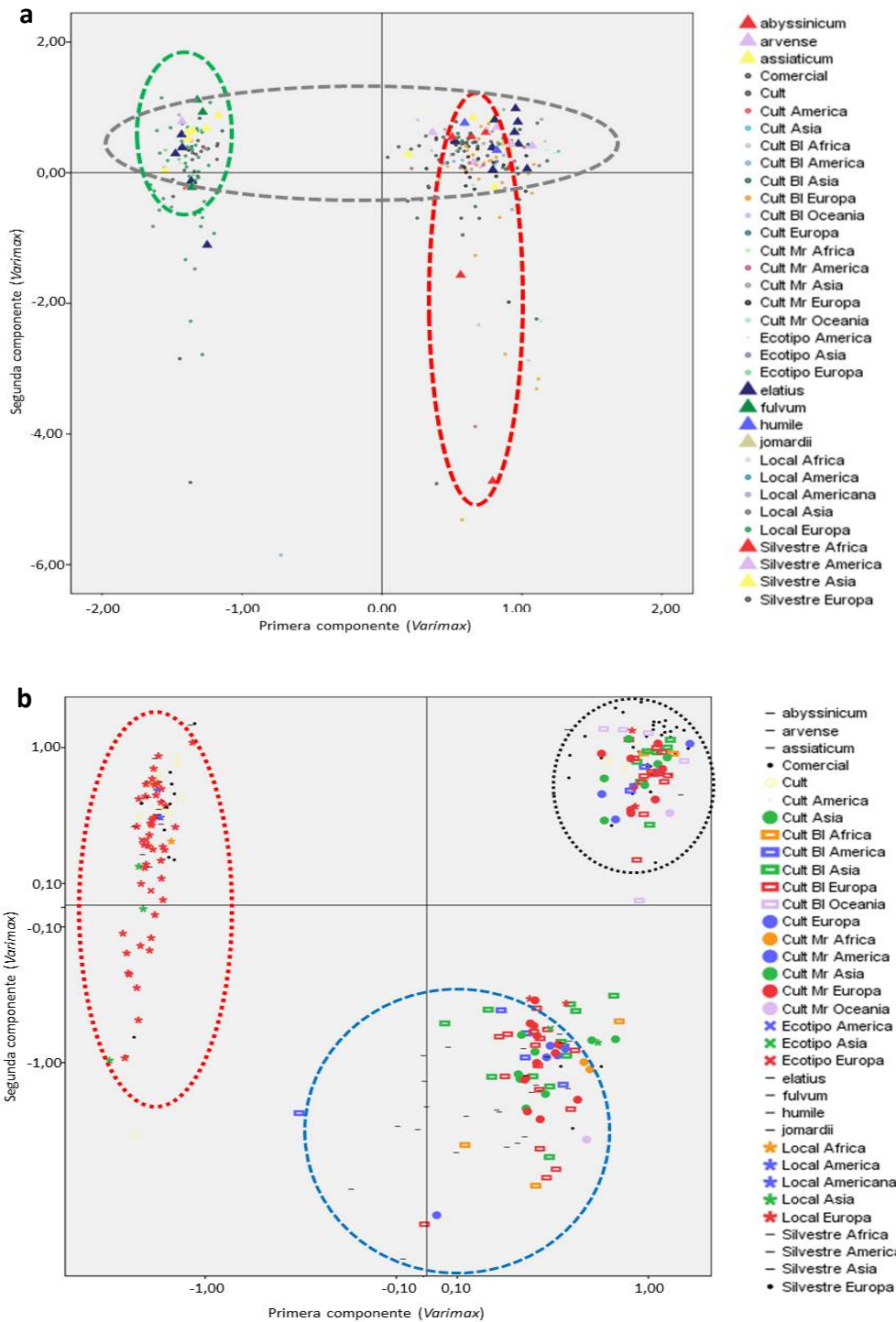


Figure 2. Varimax rotation two-dimensional representation of the first two principal components factor analysis (a) by taxonomic group, (b) as crop type and geographical origin

Unlike dendrograms, PCoA allowed graphical representation without the limitation of a peer group, which may alter the structure of the relationships between groups. The results showed clearly separated how different taxa within the genus *Pisum*, so that related taxa *P. sativum* were placed along one dimension positive values. *P. abyssinicum* and *P. fulvum* corresponded to groups at extreme positive values of the dimension 1 and clearly stood at opposite ends of dimension 2 (Figure 3).

The quadrant corresponding to positive values for both dimensions showed the taxon *P. abyssinicum* as group farthest from the axis, however in this quadrant are placed more or less close to other taxa as *P. humile*, *P. jomardii*, *P. asiaticum* and *P. arvense*. *P. elatius* was found within the positive values of dimension 1, but the group of Asian accessions stood at positive values of the dimension 2, while the other lines of *P. elatius* were

placed closest to *P. fulvum*. In negative values of dimension 1 trend was observed clustering of the different types of accessions within *P. sativum*. For positive values of the dimension 2 were located purple flower cultivars and then with positive values but slightly lower accessions were placed with white flower. In quadrant with negative values for the dimension two local varieties were found, although again there was separation of local groups along dimension 1. With more negative values ranged wild accessions as moving toward positive values of dimension 1 appeared different ecotypes.

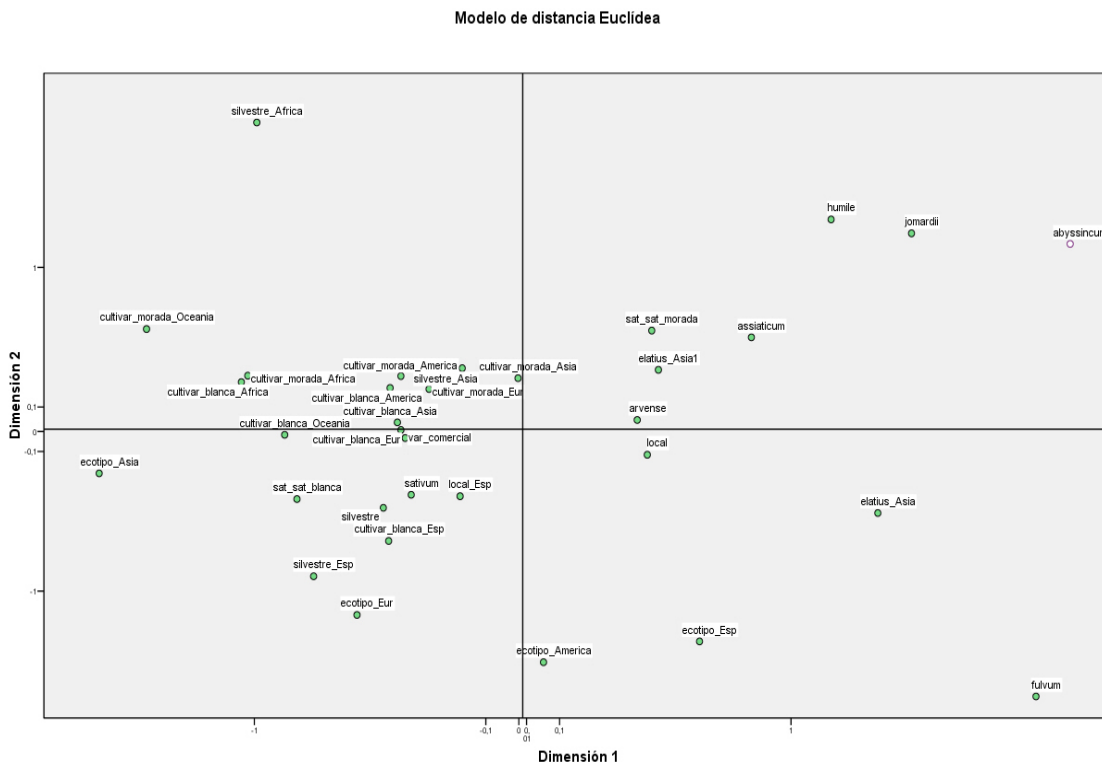


Figure 3. Groups represented in two dimensions obtained by the index based PCoA F_{ST}

In terms of geographical origin greater similarity was observed for all types of crops, among accessions of Asian, European and American. Slightly wider apart at the genetic level the groups were found accessions of African origin, and finally, probably due to geographical isolation, groups with greater genetic distance from the rest were from Oceania.

The results showed as the main criterion of separation in two-dimensional space belonging to different taxa, just as it was observed that the separate distribution of the accessions of *P. sativum* of different types, and the distribution based on the color of the flower. There was a tendency for the distribution of cultivars according to their geographical origin; however this distribution was subjugated to other separation criteria.

Therefore, numerous analysis confirmed by the multidimensional scaling, show clear separation of the taxa *P. abyssinicum* and *P. fulvum*, the distribution between both of *P. elatius*, the presence of *P. jomardii* and *P. asiaticum* as independent taxa related to Asian and closer to the previous taxa to *P. sativum*. Within *P. sativum*, more divergent groups are ecotypes, wild accessions and landraces. Among the commercial cultivars and varieties are distributed on the basis of morphological characters, specifically the color of the flower and, based on this first distribution kernels are separated into several geographical areas: Asia-Europe-America, Africa and Oceania.

All analysis confirmed the separation of taxa *P. abyssinicum* and *P. fulvum* as farther taxa within the genus (Polans and Saar, 2000; Knox and Ellis, 2001; Verzhinin *et al.* 2003; Kosterin and Bogdanova, 2008; Nasiri *et al.* 2009; Jing *et al.*, 2010 and Martin-Sanz *et al.*, 2011) and the intermediate position *P. elatius* and *P. humile* suggested as correct the assertion by Ellis *et al.*, (1998) who considered both as the central hub for the

domestication of the genus. A taxonomic level, this work provides the distinction between taxa from the Asian origin of them over others. Thus, taxa as *P. asiaticum* or *P. jomardii* accessions are located near *P. elatius* with the same clearly Asian and genetically apart from other taxa.

Furthermore, sorting genetic level taxon *P. sativum* has shown a lack of agreement on a structure based solely on geographical origin. The analysis have identified the importance of each type of pea accession variability, remaining in the background geographic origin, still lags behind morphological characters as the color of the flower.

Finally, at the level of molecular markers different outputs reflect variability mediated each type of marker depending on the amplified sequence. In this respect, our results support the idea of using RBIP for phylogenetic studies *Pisum* genus level while SSR markers and GTM are most useful to the species level. However, global analysis show that the combined use of several types of markers provides more complete information at both genetic variability and diversity in the study of population genetics.

GENETIC MAPPING AND QTL ANALYSIS OF AGRONOMIC AND ASSOCIATED WITH FROST TOLERANCE TRAITS

Three linkage maps were obtained from three mapping populations based on three different RIL populations: PopESP, PopFRA and PopUSA (Figure 4). The sizes of the resulting maps have been similar, from 1187.9 cM obtained for the PopESP population, with a total of 59 markers to the 1379 cM and 1385 cM, with a number of markers 47 anchored and 64, obtained in PopFRA PopUSA respectively. The size of the PopESP map was about the same size as the one published by Laucou *et al.* (1998), 1139 cM, and almost identical in length to the map presented by Fondevilla *et al.* (2011b). The size of the PopFRA and PopUSA maps was very similar to those obtained by other authors, such as consensus map Loridon *et al.* (2005), 1430 cM (Haldane, 1919), with 229 SSR. The size of our maps PopFRA PopUSA and is similar to those published previously (Ellis *et al.*, 1992; Gilpin *et al.*, 1997; Hall *et al.* 1997; Pilet-Nayel *et al.* 2002; Tar'an *et al.* 2003; Prioul *et al.*, 2004; Aubert *et al.*, 2006). However, the map size we have obtained is smaller than the consensus map obtained by Weeden *et al.* (1998), 2416 cM, and exceeds the size predicted for forming chiasmata: 750 cM (Hall *et al.*, 1997).

Maps that allow for QTL analysis, and be transferable and some extrapolation would allow further studies, based on the detected polymorphisms between parental from the three crossings populations during diversity analysis, have been taken into account in previously published mapping markers anchored, as several type of SSR (Burstin *et al.* 2001; Loridon *et al.* 2005), STS (Gilpin *et al.* 1997; Timmerman-Vaughan *et al.*, 1993) and others as CAPs, Size or ASP (Aubert *et al.*, 2006).

In all populations, the results obtained allowed to assign linkage groups obtained by comparing them with other previously published maps (Weeden *et al.*, 1998; Loridon *et al.*, 2005, Aubert *et al.*, 2006) through bridge markers, mainly SSRs and, to a lesser extent sequence-based markers, GTMs. The results obtained for the composite map shows the presence of a total of 28 homologous *loci* or markers bridge 3 of them present in the three populations: morphological features *Af*, *A* and SSR, *AD146*. Homologous *loci* are distributed along all linkage groups except LGVI, which has no homology between the *loci* of any of the groups tested.

Through bridge markers have been assigned to linkage groups I and II and the two groups LGA, LGB defined in PopESP. It established a bridge between *BirteX5* present in LGA and LGI in PopFRA, and another bridge between *Cs*, LGB anchored to that obtained in LGII of PopFRA. Through these connections have been confirmed in LGII *AD81* position and anchored by first time on LGI *281x40* RBIP.

results and the consensus map. The number of markers linked LGII this region is much lower than that found in other regions of the map presented by Loridon *et al.* (2005). Similarly, other described maps have also shown a small number of markers associated with this region (Aubert *et al.*, 2006), or even voids were detected in this region (Deulvot *et al.*, 2010). This linkage group corresponds to chromosome 6 pea genome, as described in Hall *et al.* (1997) and as described by Fuchs *et al.* (1998) and Poyser and Ellis (2002), referring to the position of the centromere is classified as acrocentric. Taking this into account, reducing the number of *loci* can be anchored in this region due to the location in the region of the centromere and a lower percentage of recombinations in the area.

Just another region in consensus map presented by Loridon *et al.* (2005) has been no associated with the maps obtained in this work, an intermediate region of LGIII. As in the previous case, the density of markers associated with the region is smaller than that shown in the other linkage groups. Similarly, the reduction in the density of mapped markers in this region occurs in the map described by Aubert *et al.* (2006). Again, this linkage group, LGIII, corresponds to chromosome 5 described by Hall *et al.* (1997) and according to Fuchs *et al.* (1998) and Poyser and Ellis (2002) this is acrocentric chromosome. Therefore, and taking into account the decrease of *loci* associated with this region is repeated along the bibliography reviewed arises again hypothesized that this centromere is located in that region.

The composite map obtained in our study may relate to the consensus map Loridon *et al.* (2005) for 67 markers, with the map of Aubert *et al.* (2006) using 65 markers and the consensus map Weeden *et al.* (1998) by 5 markers, as with the maps produced by Ellis *et al.* (1992) and Hall *et al.* (1997). The microsatellite consensus map described in Loridon *et al.* (2005) and the composite map obtained here have the link of PopFRA as common population derived from the cross Terese x Champagne, which has facilitated their comparison both common markers as their order.

In addition to SSR, the composite map presented in this study share marker with other previous works as markers based on gene sequences in common with the map of Gilpin *et al.* (1997), and numerous CAPs and STS, among others, with the map published by Aubert *et al.* (2006), allowing the approximate position of genes mapped in these studies on a map that has been obtained in this work. In this sense in our map were *loci* with known function that would allow, after a hypothetical QTL detection with some influence, investigate the possible effect on a trait of interest caused by differentials in the plant metabolism. The use of these markers based on genes allows for, in pea, functional maps enriched in genes coding and add potential points of linkage between pea and related species, including the model species *M. truncatula* for future approaches in obtaining candidate genes in pea (Aubert *et al.*, 2006).

Specifically correspondence found with other work such as is the case in LGIII *PepC* which matches Aubert *et al.* (2006) and Konovalov *et al.* (2005), *Gsp* in LGVI in common with Aubert *et al.* (2006), Hall *et al.* (1997) and Gilpin *et al.* (1997). The map obtained is connected with the consensus pea map (Weeden *et al.*, 1998) using molecular markers and classic: *Af* located in LGI, *A* in LGII, *Le* in LGIII, *Rbcs* in LGV, *Gsp* and *Pl* in LGVI.

Finally, we have obtained for the first time on the map position of 21 molecular markers distributed over seven linkage groups. They also confirmed the position of other 29 markers that were located in different linkage groups depending on the maps or had shown segregation distorted populations evaluated in other studies. This shows the usefulness of combining maps from different locations to allow the integration of a greater number of mapping information and the importance of using "bridge" markers to be polymorphic in a population over to allow compare different pea genetic maps.

The QTL analysis of agronomic character was done on each population and the global results are shown in Figures 4 and 5. The onset of flowering, INF, showed QTL in all linkage groups. However, showed differences in the percentage of variance explained, which reached its maximum, 30.7%, within LGIII between *PsAAP2* and *AA175*.

QTL en PopESP (Cheyenne x ZP-1366)

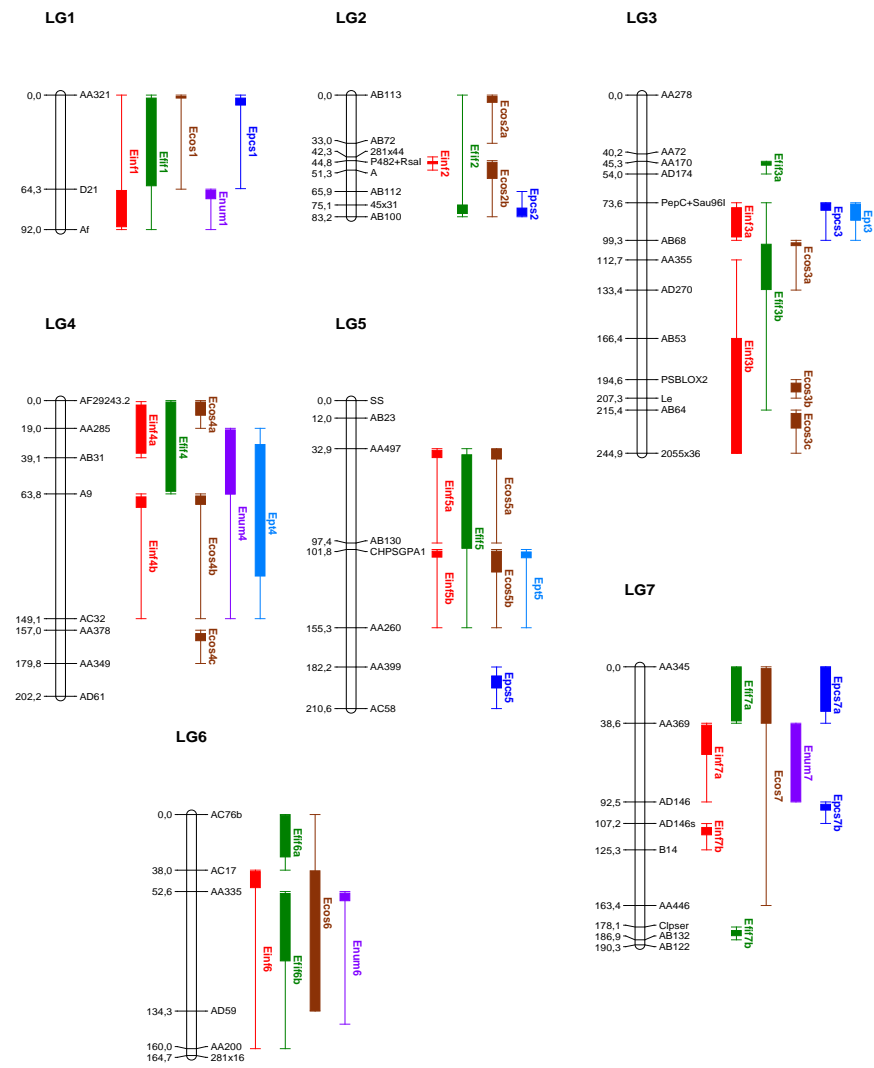


Figure 4. QTL associated to agronomic characters in PopESP

QTL en PopFRA (Terese x Champagne)

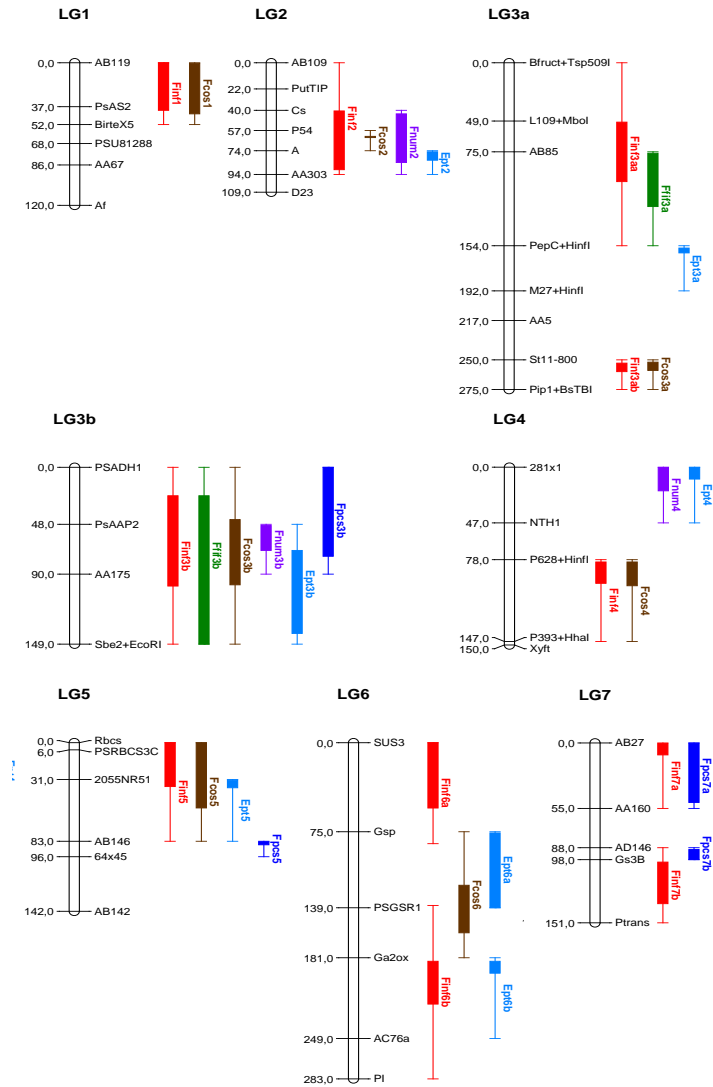


Figure 5. QTL associated to agronomic characters in PopFRA

This QTL is comparable to QTL obtained by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008) defined as WFD3.1, which is located on *AA175* and showed the maximum values of R^2 , as in our work and that relates to the flowering *locus Hr* and the effect of photoperiod. Also this QTL detected in our analysis inf3 is the only QTL for flowering initiation showing a predominant additive effect clearly higher than the other as suggested in the literature on the inheritance of few additive genes (Auld *et al.* 1983; Cousin *et al.* 1985; Liesenfeld *et al.* 1986). The importance of this reference character winter hardness lies in the relationship thereof with one of the methods to frost tolerance where an efficient mechanism involves delaying the transition of the vegetative phase into the reproductive phase, due to the sensitivity to freezing increases after the start of flowering (Fowler *et al.*, 2001).

Moreover, besides the importance of this QTL in LGIII, linked to *AA175*, has been to consider other possible colocalization with the results of Lejeune-Hénaut *et al.* (2008). As in their results, we have detected, in both populations, a QTL for flowering initiation in the lower region of the linkage group III, near *Le* and *Bfruct loci*, but their involvement is not yet clear. The WFD5.1 QTL overlapped with the QTL region detected in both populations of this work and showed R^2 values close to 10% like-Hénaut Lejeune *et al.* (2008), although related, not only to the advancement of sowing date but also, with the spring sowing. In this sense, the authors (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) show the association of this *locus* QTL WFD5.1 with *Tri*; undesirable dominant allele in the selection of pea lines for the production of feed, because it contains two structural genes encoding for the major trypsin inhibitors in pea (Domoney *et al.*, 1994, 1995).

The QTL associated with the end of flowering, FIF, have been strongly dependent on sowing date. The end of flowering, like the beginning, has been associated again to tolerant genotypes for *locus PepC*. Compared to QTL associated with the onset of flowering, matches were observed regarding high values and high LOD percentage of variance explained both traits, in both cases coinciding with mapped QTL associated to *AA175* marker in LGIII.

The distribution of the QTL associated with harvesting theoretical date, COS, covered all linkage groups having detected in both populations QTL for all groups except LGVII linkage. Among all detected QTL for this quantitative trait detection of QTL highlighted with the highest percentage of variance found in LGVII (ecos7.2, 28.92%) and LGII to present the QTL with the highest LOD values (ecos2,4 with 5.29).

The QTL associated with the tendency to form branches, RAM, showed clear differences depending on location and population, so that in the 2007-2008 season QTL was detected in PopESP population explained over 85% of the variance found in the formation of branches in Peñaflores. However, in the comparison between populations and sites highlighted the QTL in LGIII with explained variances close to 15% or above in both populations and different locations. These QTL, as well as for the QTL associated with the onset of flowering, are located in two specific regions: one associated with the *locus AA175*, and another associated with *Le*, coinciding both with the QTL WFD3.1 and WFD3.2, respectively.

The tendency to form branches may relate to called rosette growth, previously associated with winter hardness (Andersen and Markarian, 1968; Liesenfeld *et al.*, 1986). Markarian and Andersen (1966) even proposed the genetic control of this type of growth for three genes, and concluded that the formation of a compact rosette is critical for winter survival. In this sense, Auld *et al.* (1985) determined the strong linkage between hardness genes winter with the recessive gene *er-2* located in LGIII near *AA278* (Katoch *et al.*, 2010). In the present work, we have located a QTL associated with the formation of branches, *eram3.2*, overlapping in this region.

The QTL related to the total weight of seeds harvested, PT, were found in three of seven linkage groups in PopFRA population. However, only in PopESP, the associated QTL located two linkage groups: LGIII (ept3.5) and LGIV (ept4.2). The QTL associated with linkage group LGIII (ept3.5), linked to the *locus PepC* tolerant genotype. Moreover, the QTL obtained for PopESP (ept4.2) showed a low LOD value, but reached explain more than 10% of the variance in the trait exhibited by LGVI PopESP. A QTL was only found associated with the total weight PopFRA assessments (fpt6.2) which was only associated total weight QTL in PopFRA showed LOD whose value

exceeded 54, explained 47.68% of the variance obtained for this trait and additive effect was high associated to tolerant genotype being able to be a good candidate for MAS.

Noteworthy is the presence of a QTL linked to *PsAAP2* marker associated with the weight of one hundred seeds, P100, since this marker was placed adjacent to *AA175* in linkage group III. The QTL associated with traits such as the start and end of flowering, harvest date and the formation of branches have shown colocalizations in the same region, all with percentages of explained variance on each evaluation, high. Similarly, QTL were located in that region for total number and weight traits, although in both traits R^2 values were not high.

In relation to the overlap among QTL associated to the number of seeds showed major QTL in LGIV and LGII, in the latter case a clear effect explained variances slightly above 14%. As for the total weight QTL were found located in LGIII and LGIV, highlighting the first high LOD values, and the second a higher R^2 value. In relation to the QTL associated with seed yield and yield components and development yield of Timmerman-Vaughan *et al.* (2005), our results were consistent with this work.

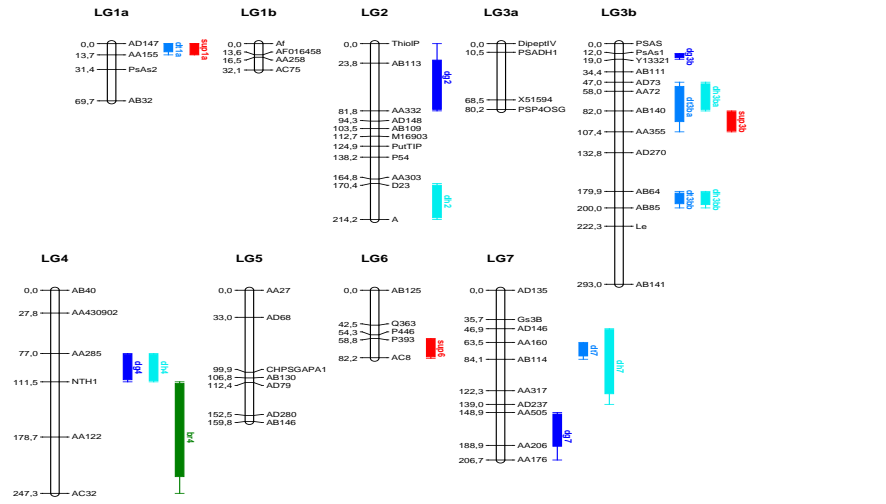
By analyzing the relationship between the QTL associated with different quantitative traits in PopESP highlighted the overlap most QTL for flowering start and end and the date of harvest. Similarly, the QTL coincided start and end of flowering associated mostly in spring sowing and LGVII LGIII while QTL associated with autumn sowing for both traits were located LGIV and LGV groups and were located in a shared positions in LGI, II and VI. In PopFRA, the colocalization of QTL for the start and end of flowering only occurred in LGIII. These overlaps in LGIII again giving weight to the case in which this linkage group, in particular the region near *AA175*, plays a key role in bloom and its relationship with winter hardness.

The relationship among characters associated with blooming and seed-associated traits reflected by overlapping QTL in most linkage groups among any of the seed-associated traits and initiation of flowering. These overlaps have been more evident in PopESP. The distribution of QTL has depended on the environment, and population. However, it has been shown how quantitative traits related to phenology in pea showed overlapping regions within linkage groups and their effect depended on sowing date, while traits associated with seed and crop yield have been mapped to specific regions and tend to overlap with the beginning of flowering. The differences found between the different environments and among populations highlight the need to evaluate not only various locations together and years, as suggested by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008), but also different populations.

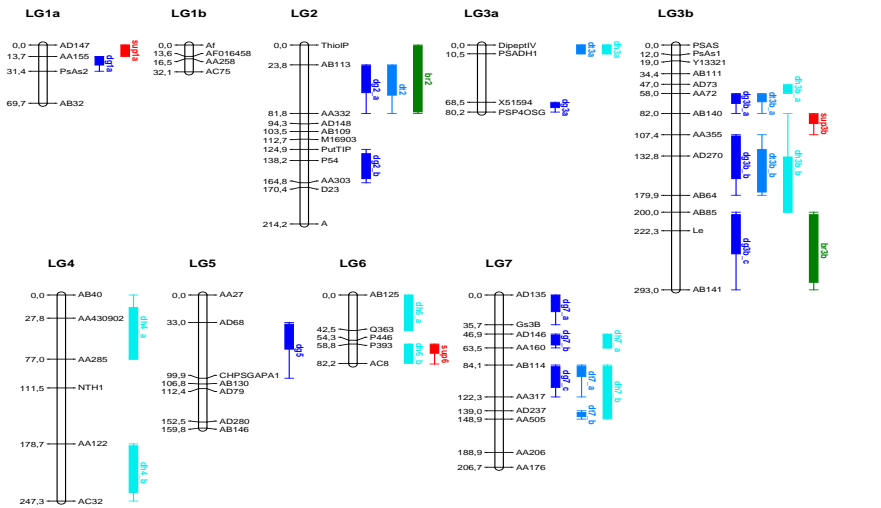
Regarding the study of frost tolerance tests were performed in controlled environment chambers. General damages have been analyzed independently in each of the replicas grouped according temperature analysis. The QTL analysis of each damage evaluation was done independently for each temperature and the global results are shown in Figures 6 and 7.

Application of Molecular Markers in Field Pea (*Pisum sativum* L.) Breeding

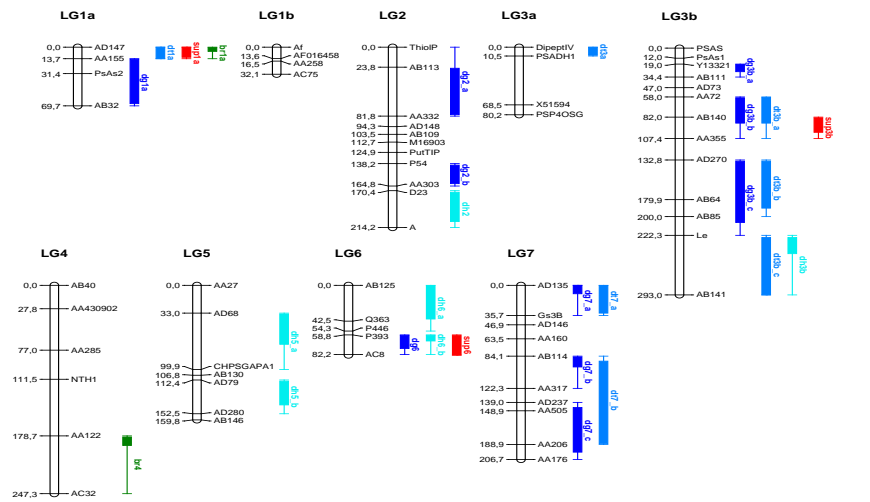
-6°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)



-12°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)



-9°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)



-15°C QTL en PopUSA (Medora x Melrose)

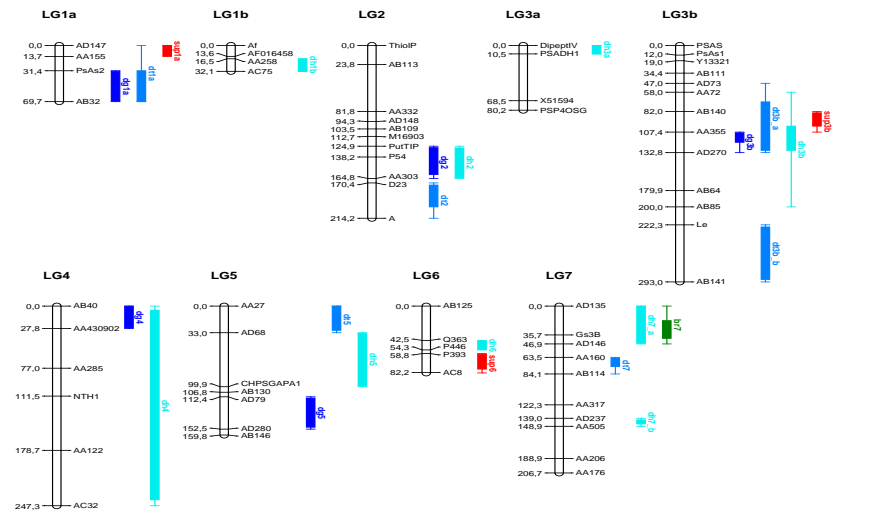


Figure 6. QTL associated to winter hardness detected between -6°C y -9°C

Figure 7. QTL associated to winter hardness detected between -12°C y -15°C

In summary, all QTL associated with general damage to any level showing overlap between the temperatures tested, being more evident in two temperature ranges, an initial range between -6°C and -9°C and a second range with extreme temperatures, -12°C and -15°C. Also, the colocalization of QTL observed in a large number of related GTMs genes involved in the metabolism of sugars at different levels. Specifically, the repeated detection of QTL in the region associated with the enzyme invertase and could be a candidate gene to cause the effect of the QTL. This enzyme has been implicated in response to stress caused by low temperatures and by many authors in a variety of plant species such as potatoes (Sin'kevich *et al.*, 2008;), chickpea (Kaur *et al.*, 2008;) and *Arabidopsis* (Usadel *et al.*, 2008), among others.

After evaluating the QTL associated with the survival rate within each temperature, the overlap joint analysis showed all three QTL temperature gradient: at LGI (suprec1a.1) LGIII (suprec3b.7) and LGVI (suprec6. 4). At this point, the similarities observed in the work of Lejeune-Henault *et al.* (2008) at QTL level associated with frost tolerance in field, such that at work in these three QTL detected linkage groups. These authors also found a QTL associated with frost tolerance in LGV, which showed no overlap with our analysis of all temperatures but, yes two QTL colocalize at -6°C to -9°C. Therefore, the results of this study are consistent with those obtained by Lejeune-Henault *et al.* (2008) argue, along with the results of QTL associated with the onset of flowering shown in field evaluations, the main effect of a QTL associated with *Hr locus* and the secondary role of two QTL located on LGI and LGVI, leaving pending to confirm the effect of the QTL on LGV WFD5.1.

The QTL associated with survival percentage linked to *AD79* marker in the LGV linkage group may be linked to the QTL described as WFD5.1 Lejeune-Henaut *et al.* (2008) and associated with frost tolerance. In this respect, the authors describe the presence of a QTL in a wide region spanning LGV, depending on the condition evaluated, from *AA475* to microsatellite *AD79* to any of the locations. Our results, located in that region a QTL associated survivability versus winter hardness. This feature is directly related to the winter frost tolerance evaluated by Lejeune-Henaut *et al.* (2008), although they have not evaluated the same parameters. However, the coincidence of the results obtained in both studies, comparing evaluations carried out in the field with those in controlled environment chamber; establish that this QTL should be linked to the ability of pea to tolerate frost.

If we compare the QTL corresponding to the formation of branches resulting from frost tests with those obtained under field conditions by the composite map obtained in this work it was observed the coincidence of QTL in three regions of the map. LGIII coincided in the corresponding QTL PopESP (eram3.10) and PopFRA (fram3a.1) contains 12br3b.11, in the region of the *loci Le* and *AB64*, although in the case of the two QTLs were associated field frost tolerant genotypes whereas in the case of tests of -12°C showed additive effect linked QTL genotype susceptible. LGVII the QTL detected in at -15°C (-15br7.1) coincides in position with the QTL detected PopESP (eram7.2) associated both to the *locus AD146*. Finally, the corresponding QTL PopESP, eram4.5 and PopFRA, fram4.2, overlapped in the same region corresponding to the QTL test -6°C, -6br4.4 and -9°C, in-9br4.5 a region near the *locus NTH1*. In this latter linkage group, the QTL under controlled conditions showed additive effect and paired high tolerant genotype, Melrose, as in the case of PopFRA, also linked to Champagne with an additive effect. The comparison between the QTL obtained in the field and on camera for the formation of branches have shown matches. However, these matches are limited to certain regions and temperature dependent. It is remarkable overlap between the QTL in both populations obtained under field conditions with frost tests at -6°C to -9°C, showing a possible correlation in their genetic control.

Regarding the association of these QTL detected gene sequences to those regions anchored map of Aubert *et al.* (2006), along with markers bridge obtained in this work and anchored to the map

PopUSA, have established the correspondence of QTL associated with linkage group LGII, located in the assessment at -12°C, with the GTM *ThiolP* and *PepTrans*, and LGVII the QTL detected after evaluation at -15°C with GTM *Gs3b*. Specifically, *Peptrans* and *Gs3b* corresponded to QTL associated also located in relation to the overall damage mentioned above. The three GTM share their relationship with protein metabolism, highlighting their involvement in nitrogen assimilation and mobilization of amino acids and oligopeptides.

Discussed the arrangement of the QTL associated with different features for each temperature tested for patterns similar behavior and relationships between features. The display on the map allowed us to observe how the QTL for the quantitative trait of survival after recovery appeared overlapping with QTL associated with overall damage and damage to stem. However, when evaluated at temperatures below the detected QTL overlap and leaf damage mainly to stem damage. Similarly, it was found that the QTL associated with the formation of buds were located in the linkage map independently of other QTL, though with decreasing temperature shoot formation appeared linked QTL associated with stem damage.

At temperatures of -6°C to -9°C both survival and the ability to form new buds not found strongly associated with other quantitative traits, while at temperatures of -12°C and -15°C these traits were associated with damage suffered in stems. Another feature observed in the linkage maps was the emergence of increasingly QTL on linkage groups in which at -6°C showed no QTL (LGIA, LGIIIa and LGV) or only one (LGVI). Therefore, it appears that with decreasing temperature, the effect on pea plant affect a larger number of genes. The distribution of this increased number of genes involved in each feature shown by the expansion effect of the expression of said traits associated with other regions of the map.

The results obtained in the detection of QTLs associated with frost tolerance and agronomic traits associated affected by the winter hardness showed different effects on the genome of pea. A large number of QTL have been found and checked the effect of temperature and winter harshness in the association of the QTL shown in different linkage groups or associated with different *loci*.

Finally, after observing the presence of overlap between QTL in temperatures close to most traits assessed, we studied the distribution thereof within linkage maps according temperatures. This study allowed us to observe interesting associations among different quantitative traits. Thus observed colocalization of survival after QTL assigned to the assigned recovery general damage and leaf damage at temperatures of -6°C and -9°C. However, at lower temperatures assigned to the QTL survival remain overlapped with leaf damage, but overlap pass stem damage rather than remaining overlapped with general damage.

In this comparison in the distribution of temperatures as QTL linkage map similarity is found in the distribution thereof as temperature ranges, as previously mentioned. Consistent with this, several authors have concluded that the test temperatures between -8°C and -12°C allow the separation between frost tolerant lines and spring varieties (Acikgoz, 1982; Auld *et al.*, 1983 Cousin, 1983).

DIFFERENTIAL EXPRESSION ANALYSIS IN ASSOCIATED WITH PEA ACCLIMATION

Based on these results it was established the limit of detection (LOD) of the amplification18S system and limit of quantitation (LOQ). That in both cases represented a 10⁻⁰⁶ dilution, corresponding to 1 pg. The regression line was defined by the equation $y = -3.3394 x + 17.485$, with a regression

coefficient close to 1 ($R^2 = 0.9987$). All indicates a high linearity of the system and efficiency of 0.9928, also close to unity, demonstrating optimal efficiency of the system 18S.

From 132 designed systems, 109 showed positive and single amplification product. In relation to each of the amplification 109 systems, the standard curve was constructed, the adjustment to the line expressed as E, the regression coefficient (R^2) and the efficiency of each system expressed. Efficiency results and adjustment of the line were optimal for all systems studied, except Ps_036 systems, Ps_051, Ps_063, and Ps_052.

As a result of these initial evaluations obtained a total of 105 valid amplification systems, corresponding to 105 candidate genes for relative quantification 18S system function. These systems have been used in expression assays to detect differential expression.

Comparative analyzes were performed between the expression levels of the two types of pea lines, tolerant (MI) and susceptible (Md), with respect to control or not acclimated (NA), compared to the status after acclimation (AC). Thus different patterns could be made in varying expression levels, depending on the values $\Delta\Delta Cq$. These patterns allowed determining differences in the effect of acclimation according to genotype and / or acclimation process itself establish relationships between variations in expression levels for acclimation, overexpression, underexpression or no effect on the tolerant genotype, compared with its effect on the susceptible genotype. Scheme that represents the patterns and to determine differences among genotypes are shown in Figure 8.

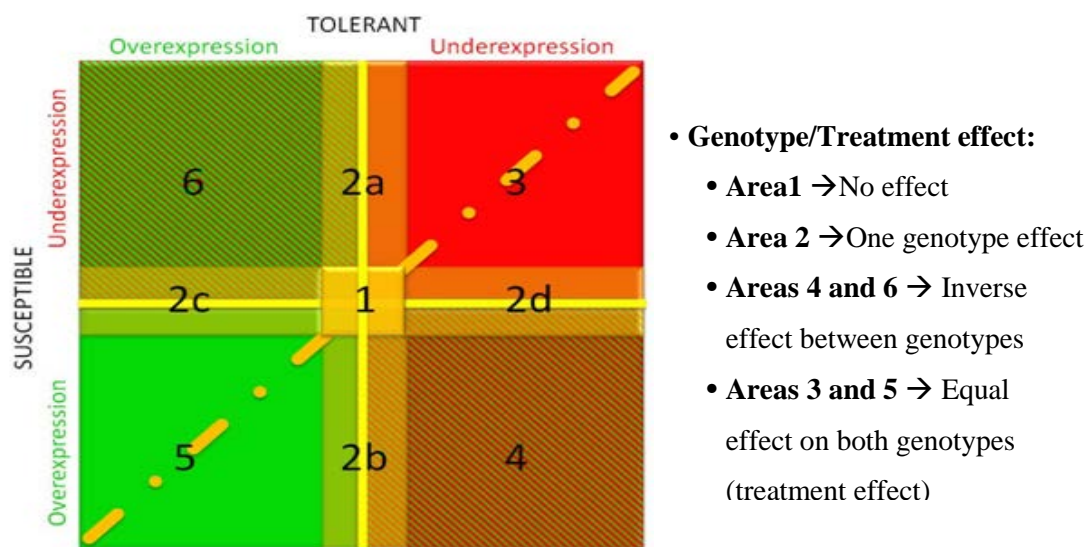


Figure 8. Patterns of variation in expression levels depending on $\Delta\Delta Cq$ ratios between each of the genotypes, control and acclimatized.

In the analysis of differential expression during acclimation due to the level of tolerance of genotypes, the results showed a total of 32 amplification systems with a marked differential expression that correspond to genes that showed different expression levels between genotypes. Thus, systems Ps_101 and Ps_064 showed overexpression in tolerant genotypes, whereas overexpression was clear in susceptible genotypes for a total of 12 amplification systems: Ps_009, Ps_014, Ps_024, Ps_071, Ps_078, Ps_081, Ps_088, Ps_089, Ps_105, Ps_108, Ps_115 and Ps_117. Regarding underexpression was detected in all susceptible lines Ps_075 system only, and for a total of 8 sets (Ps_020, Ps_072, Ps_085, Ps_122, Ps_123, Ps_128, Ps_129 and Ps_131) for tolerant genotypes. A total of 9 amplification systems showed differential expression levels between opposing tolerant and susceptible genotypes, and in this sense the pattern repeated for all systems: underexpression in genotypes

overexpression in tolerant of frost susceptible genotypes. These latter systems were Ps_007, Ps_017, Ps_033, Ps_041, Ps_066, Ps_079, Ps_090, Ps_106, and Ps_110.

Most of these systems, a total of 21, showed overexpression during acclimation in genotypes susceptible to frost (Figure 9). Among them are genes with a clear role as mitochondrial peroxyredoxin, cytochrome P450 monooxygenase, Fe-SOD, ascorbate peroxidase, glutathione reductase and chalcone isomerase. They also highlighted genes directly related to stress response, phospholipid glutathione peroxidase, allene oxide synthase, MADS-box protein, convicilin, dehydrin, phospholipase or DEAD-box RNA helicase and other phytohormonal metabolism related as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, S-adenosylmethionine synthetase 1 or phytoene desaturase. However, it is noteworthy that overexpression was also found in genes coding enzymes directly related to primary metabolism: glucose 6-phosphate dehydrogenase, as part of the metabolism of glucose, pyruvate decarboxylase, gluconeogenesis key and involved in Krebs cycle regulation Acetyl CoA level and acetyl CoA carboxylase, a key enzyme in fatty acid synthesis.

In particular, overexpression found in acclimated tolerant genotypes indicates an enhancement of nitrogen fixation by the plant, necessary for the biosynthesis of amino acids and proteins, as well as a direct action on glucose metabolism via sucrose synthase.

Only one gene showed lower transcript levels in the susceptible genotypes: cysteine protease (Ps_075). The encoded protein is associated with protein metabolism catalyst. By contrast, only two genes showed overexpression in all tolerant genotypes: leghemoglobin (Ps_101) and the gene coding for a cell cycle protein switch CCS52A (Ps_064).

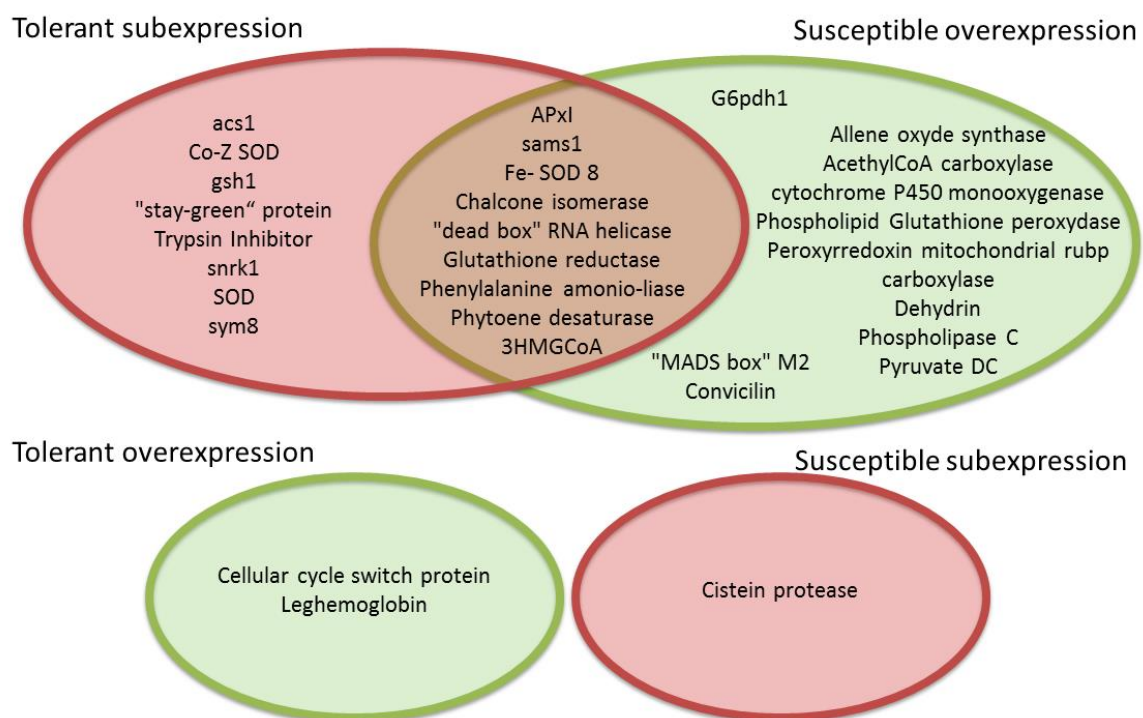


Figure 9. Distribution of genes according to differential expression shown after acclimation.

The results, based on differences in the response to the acclimation period between genotypes show how maintenance of the pea plants at low temperatures has had an effect on the system of regulation at the transcriptional level much more noticeable in those considered susceptible genotypes. Susceptible

genotypes upregulation presented in a large number of genes, as compared with tolerant genotypes. This suggests that the treatment at 4 ° C with greater intensity affects susceptible genotypes, and an intensification of the system of regulation in gene expression.

It has been shown the effect of temperatures of 4°C in susceptible genotypes causes frost answers related to the defense against oxidative stress, indicating the presence of reactive species. The global analysis of all genes overexpressed in these susceptible genotypes has allowed linking to various stresses responses before on different plants. Therefore, our results suggest that treatment at 4 ° C, far from favoring a process of acclimation in frost-susceptible genotypes in pea genotypes subjected to these stressful situations, triggering defense responses.

The small number of genes that showed upregulation in tolerant genotypes, and its close relationship to nitrogen fixation limits the interpretation of the processes that involve the acquisition of frost tolerance during acclimation. In this sense, the analysis has established a comparison between levels of frost tolerance in genotypes undergoing treatment. Therefore, there was not taken into account the levels of basal expression expressed by the different genotypes, recognizing them as the baseline expression levels under control conditions, ie without treatment.

The combined analysis of differential expression levels due to the level of tolerance in relation to acclimation allowed extracts those amplification systems determinants in the process of acclimation. This pooled analysis supports the hypothesis that low temperature treatment causes a change in the regulation of transcription of genes much more widespread in those genotypes that behave as susceptible to stress by frost. So that, of the 26 amplification systems with differential expression due to the interaction acclimation x tolerance level, about 70% are genes showing overexpression in susceptible genotypes or, underexpression in tolerant genotypes. Upregulation which have been subjected susceptible genotypes during treatment at 4 ° C has affected genes mainly antioxidant character (SOD, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, etc.), and function primarily defense ("DEAD box" RNA helicase, allene oxidase, cell cycle protein switch, etc.).

Only four amplification systems had negative regulation on tolerant genotypes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1, precursor γ -glutamylcysteine synthetase, kinase-related protein snf1 and SOD. The four genes are directly related to the stress response, so their reduction in transcript levels suggests that these genotypes do not interpret the acclimation process as a stress on the need to be so activating transcription widespread repair and defense genes.

During treatment of acclimation, tolerant genotypes showed upregulation of transcription level of a total of eight genes. The candidate genes as genes that confer tolerance to frost obtained in this study correspond to genes coding for proteins: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 (ACS2), P54 protein, transcription factor "MADS box", trypsin inhibitor, LoxN lipoxigenase, heat shock protein, protein rich in proline and stachyose synthase. These are the only eight genes that are overexpressed in the three tolerant genotypes in relation to the process of acclimation, and thus are genes of interest for further study on the role they perform in the acclimation process that allows them to acquire tolerance to frost.

Genes overexpressed in frost-susceptible genotypes encompass genes coding for proteins whose primary role is a direct response to stress. The transcription of genes for proteins with antioxidant capacity are expressed primarily in the presence of ROS, which could indicate that the accessions evaluated susceptible respond to treatment at 4 ° C as a condition of oxidative stress.

The same analysis on various genotypes three tolerant and three susceptible allowed to eliminate individual variations, and to observe the behavior in the transcript levels of genes in terms of acclimation on the degree of tolerance of the genotypes. Evaluating expression changes between control conditions and acclimation in the six genotypes allowed describe the role of several genes affected by the acclimation process *per se*. This analysis enabled set discriminate those genes whose transcript level regulation were affected during the acclimation process in a differential way as to tolerance / susceptibility pea lines.

After evaluating the results, it is hypothesized the importance, not only to find the genes responsible for conferring tolerance to frost-tolerant genotypes, the high number of genes exhibiting upregulation in susceptible genotypes, they may be partakers of the effect of susceptibility of these varieties. So that is suggested as important in frost tolerance in pea may be the expression of certain genes in tolerant varieties such as overexpression of genes in susceptible lines.

Throughout this work, the results within each stage of the breeding program have marked the need for joint assessments and interlinked all analyzes in order to clarify the guidelines to follow in the pea breeding program in relation to frost tolerance. However, the results show the need to rethink the sequence of steps in achieving the objective of obtaining winter tolerant pea varieties showing yields which are competitive at the market, as well as characters linked to quality and agronomic factors demanded by the consumer.

In this sense, this work supports the hypothesis of acclimation process as necessary for a phase pea genotypes frost tolerant to acquire the necessary degree of winter hardness. During treatment at 4 ° C all analyzed pea accessions showed changes in the expression of a total of 23 genes, regardless of genotype. From the total of these 23 genes, 13 genes showed overexpression in independently regulating the genotype and only 1 SAMDC showed downregulation. Among the 13 genes that showed overexpression, highlighted genes involved in the metabolism of proteins (albumin, trypsin inhibitor, arginine decarboxylase, heat shock proteins, proline rich protein or vicilin) but also relating to carbohydrate metabolism (galactinol synthase, stachyose synthase, sucrose transporter protein) and the hormonal regulation (ACS2, PsIPT2, 20 Ga oxidase). However, also overexpressed genes transcription regulators (MADS box, DNA-5-cytosine methyltransferase, KNOX class 1) and other direct response to stress (apyrase, lipoxygenase LoxN, cytochrome P450, adh, gshs, cell proliferation antigen). The 9 remaining amplification systems have demonstrated induction during treatment at 4°C, though overexpression levels varied depending on the genotype.

However, the results have shown distinct differences in the behavior before the treatment at 4°C between pea lines considered susceptible and lines considered as tolerant. Specifically, there has been a greater effect on the expression levels of various genes in susceptible genotypes, such effects associated with overexpression of genes directly related to the defensive response to oxidative stress. Furthermore, tolerant lines presented downregulation in a large number of genes, whereas only very specific genes showed overexpression under acclimation conditions.

Genes whose expression is associated with the acclimation process can be analyzed from the point of view of the results obtained in QTL analysis associated with agronomic traits of interest and frost tolerance *per se*. In this regard it is noteworthy that the gene encoding the P54 protein has been shown to be inducible under conditions of acclimation in cold tolerant genotypes. It also corresponds to a GTM, *P54*, linked to the linkage group LGII during mapping analysis. In the region in which such GTM is located are detected numerous QTL associated not only to agronomic characters as emergences percentage or total number of seeds, but also characters associated with frost tolerance as

general damage evaluated the range between -9°C and -15°C or leaf damage assessed at -15°C . Furthermore, in the same region is located a QTL associated with the onset of flowering, said key character winter hardness tolerance as exposed Henaut Lejeune *et al.* (2008).

Overexpression of a trypsin inhibitor in tolerant genotypes detected during acclimation can be related to WFD5.1 QTL associated with the winter hardness tolerance (Lejeune-Henaut *et al.*, 2008). In this regard, as mentioned previously, this QTL was associated by the authors to *Tri locus*, coding for a trypsin inhibitor. In this case, the link seems undesirable, since expression of this gene would imply a change in the protein composition of the seeds. Tolerant line selection based on that specific QTL by MAS may involve co-selection of this gene, resulting in a reduction in the quality of protein crop pea seed, resulting not optimal for use in animal feed.

Other genes whose expression was shown relative to the winter hardness has been *ACSI* coding gene, which showed a clear inhibition tolerant genotypes during acclimation. The amplification system obtained for this gene was designed from accession number AF016458, which corresponds well with one of the mapped SSR in our work and located in LGI, near the *Af* morphological marker. Through *Af* as a marker bridge, which can be determined in the same region in which this gene is located are located QTL associated with frost: leaves showed damage to -15°C and the percentage of survival. Furthermore, this gene corresponds to a defined GTM Aubert *et al.* (2006) and ACS1 and could be used for the application of techniques based on MAS.

Regarding the absence of alterations in expression tolerant genotypes, the gene coding for SnRK1 has shown inhibition in expression during acclimation, in this sense, Deulvot *et al.* (2010) located a SNP, *Snrk1*, based on this gene in LGVI linkage group. Through bridge as *GA2ox* markers (Aubert *et al.*, 2006) and *AD59* (Loridon *et al.*, 2005) has been able to place this SNP in relation to the maps obtained in this work, and in this region have overlapping QTL associated different characters agronomically important as the total number of seeds and the total weight of seed, and other characters associated with winter hardness emergences as percent and the time of flowering. In this regard, previously discussed the role of this enzyme at the level of carbohydrate metabolism as well as on various enzyme level regulator and its relationship to the control of flowering time, suggesting their direct involvement with frost tolerance in pea.

Finally, genes encoding galactinol synthase and stachyose synthase have shown regulation oppositely tolerant genotypes during the acclimation process. Inhibition has shown the first and the second induction showed transcription. Both genes are involved in carbohydrate metabolism and, more specifically, with the formation of RFOs (raffinose family oligosaccharides). Furthermore, both are located close, about 1 cM, within LGV and linked to the SNPs GAL and STS1 as is described by Deulvot *et al.* (2010). Our results demonstrate independent regulation of both genes. However, due to the proximity of the *loci* available, in this case the application of MAS may hinder obtaining clearly tolerant genotypes without the use of more accurate tools for determining the differential expression of both genes. This expression appears to be involved in the acclimation process is necessary to achieve the winter hardness tolerance.

When selecting genotypes that combine agronomic characteristics and desired quality, along with a degree of tolerance to the winter hardness that would achieve competitive returns, not only based techniques can be applied in MAS. Since, as demonstrated in this work, said selection based on the selection markers can determine other undesirable joint markers. In this sense, knowledge of the genes involved in both the winter hardness tolerance as those involved in the adaptation of pea seed quality and competitive yield is essential. In the work of selecting genotypes adapted to different stresses, the

information of the genes involved in such adaptation and final impact on plant metabolism are necessary. In this sense, the use of GTM markers not only allows selection by MAS, but also to determine which genes are being selected and predicts the behavior of each genotype obtained through selection. Also, GTM have shown a degree of variability present optimally within the species *Pisum sativum*, indicating the presence of allelic variants in the same taxon, which can be analyzed and selected genotypes for obtaining improved and adapted to the needs.

Genes involved in the acclimation process have shown relative to the QTL associated with agronomic traits in QTL pea well as associated with winter hardness in overall as well as frost tolerance *per se*. It has demonstrated the relationship of these genes, not only the winter hardness but its involvement at different stages of plant metabolism, affecting other characters such as the protein and carbohydrate metabolism, and affecting the quality of seeds. By variability based markers allows not only genes on the genetic map locating the genes involved in the winter hardness, but to determine the co-selection of other genes and examine the effect of the different allelic variants for each of the markers.

CONCLUSIONS

EXPLORING THE GENETIC BACKGROUND OF A REPRESENTATIVE GERmplasm COLLECTION OF *PISUM* GENUS.

STUDY THE GENETIC VARIABILITY ENCOMPASSED IN THE COLLECTION AND INFLUENCE IN THEIR HIERARCHY AND STRUCTURE OF FACTORS RELATED TO THE TAXONOMY, GEOGRAPHIC ORIGIN AND EVOLUTION, THE TYPE OR STATUS OF ACCESSIONS AND DISTRIBUTION OF SOME MORPHOLOGICAL CHARACTERS.

1. The results support the hypothesis of *Pisum* genus consists of three species: *P. fulvum*, *P. abyssinicum* and *P. sativum*, placing *P. arvense*, *P. elatius* and *P. humile* among them and postulating possible common links in the evolutionary process.
2. *P. sativum* and *P. elatius* taxa have proved that bring greater internal variability within the collection studied, while *P. fulvum*, *P. abyssinicum* and *P. humile* have been more genetically homogeneous and showed characteristic presence of several alleles at each of them, but not in any way imply exclusivity thereof.
3. In the underlying structure within the taxon *P. sativum* highlights the influence of the type or status of the accessions, discriminating among landraces, accessions considered as wild and a compact group of cultivated materials, cultivars and commercial varieties, with a relatively low contribution of the latter to the variability detected in the collection.
4. Expression of some morphological characters has been related to the genetic structure of the collection, and the flower color draws attention to the genetic distribution. Despite, the geographical origin, but seems to have some influence, there has been found as an inappropriate criterion to study genetic distribution when considering raw variation.

ANALYZE PARTICULAR AND GLOBAL INFORMATION PROVIDED BY DIFFERENT TYPES OF MOLECULAR MARKERS IN THE STUDY OF VARIABILITY AND THEIR INFLUENCE ON STRUCTURE DETECTION.

5. Detecting influential criteria in the internal structure of the collection has been dependent on the type of marker used, highlighting markers RBIP regarding discrimination among taxa. GTM markers have contributed to find relationships based on the type or accessions status. SSR have facilitated to detect the possible influence on the structure of criteria related to the geographical origin.

PRELIMINARY STUDIES RELATED TO GENETIC MAPPING NEEDED FOR FUTURE APPLICATION OF MOLECULAR MARKER, AS SUPPORT, FOR MARKER ASSISTED SELECTION.

OBTAIN PARTIAL LINKAGE MAPS WORKING IN THREE POPULATIONS SEGREGATING FOR AGRONOMIC TRAITS OF INTEREST AND DEVELOP A COMPOSITE MAP FROM THEM.

6. Three partial linkage maps have been obtained based on the analysis on three different segregating populations with 59, 47 and 64 markers anchored and estimated sizes 1187.9 cM, 1379 cM and 1385 cM, respectively.
7. A composite map has been built as a combination of the three previous maps, with a total of 139 markers, 95 SSR, 9 RBIP, 13 CAP, 10 STS, 5 Size, 2 ASP, and 5 morphological markers, spread over 7 linkage groups and almost total coverage of pea genome previously mapped in previous studies.
8. A total of 21 molecular markers have been anchored, for the first time, 10 SSR, 9 RBIP, 1 CAP and, 1 STS, having confirmed the position of other 29 molecular markers that, either showed segregation distortion, or there were discrepancies in their location in previous published maps.

IDENTIFY AND MAP QTL ASSOCIATED WITH AGRONOMIC TRAITS OF INTEREST: YIELD AND SOME OF ITS COMPONENTS; PHENOLOGY, FROST TOLERANCE, MORPHOLOGY.

9. QTLs were detected both associated with precocious flowering and associated with frost tolerance and winter hardiness, co-located with QTL relating to yield and productivity of the crop, a relationship also exists among the QTL associated with the percentage of survival after freezing evaluated controlled environment chamber and QTL associated with winter damage evaluated in winter field hardiness.
10. It has been shown relation between the localitation of QTL relative to damage frost with *loci* related to protein and carbohydrate metabolism through several markers GTM.
11. The distribution of the QTL associated with damage caused by frost and its importance has been dependent on the frost temperature intensity used for phenotyping.

DETERMINING, BY STUDYING GENE EXPRESSION, OF CANDIDATE GENES RELATED PROCESSES AND TOLERANCE TO COLD ACCLIMATION.

ANALYZE THE LOW TEMPERATURE DIFFERENTIAL EXPRESSION OF GENES POTENTIALLY INVOLVED WITH ADAPTATION AND HARDENING PROCESSES PREVIOUSLY REPORTED.

12. A total of 14 genes showed variation in expression during treatment at 4°C, most involved in the metabolism of proteins and carbohydrates, but also appeared genes involved in phytohormonal metabolism as well as genes coding for transcription enzymes and factors.

LINK DIFFERENTIAL REGULATION OBSERVED WITH POSSIBLE FROST TOLERANCE, DETERMINING THE REGULATORY EFFECT OF TEMPERATURE ACCLIMATION ON THE EXPRESSION LEVELS OF THE DIFFERENT GENOTYPES.

13. The regulation shown by tolerant genotypes under conditions of 4°C has been implicated genes related to protein and carbohydrate metabolism, as well as genes involved in nitrogen fixation, while susceptible genotypes showed overexpression of genes related to defense responses in situations of stress.

RELATE CANDIDATE GENES WITH QTL ASSOCIATED WITH FROST TOLERANCE AND OTHER AGRONOMIC TRAITS OF INTEREST, AND MAPPED MOLECULAR MARKERS THAT MAY BE CAPABLE OF BEING USED IN MARKER ASSISTED SELECTION

14. Genes with differential expression in tolerant genotypes have been related to QTL associated with winter hardiness tolerance and phenological characters, so QTL associated with yield and GTM markers located in specific regions of pea linkage map.

REFERENCES

- Abbate,V., Cavallaro,V., Crinò,P., and Ranalli,P. 1997. Winter varieties of grain legumes in Italy. In: AEP (ed.). Problems and prospects for winter sowing of grain legumes in Europe. 3-4 December 1996. Dijon, France. 19-26.
- Andersen,R.L. and Markarian,D. 1968. The inheritance of winterhardiness in *Pisum* III. Stem branching in Autumn growth. *Euphytica* 17:473-478.
- Andersen,J.R. and Lubberstedt,T. 2003. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8(11):554-560.
- Aubert,G., Morin,J., Jacquin,F., Loidon,K., Quillet,M.C., Petit,A., Rameau,C., Lejeune-Henaut,I., Huguet,T., and Burstin,J. 2006. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 112(6):1024-1041.
- Auld,D.L., Ditterline,R.L., Murray,G.A., and Swensen,J.B.. 1983. Screening peas for winter hardiness under field and laboratory conditions. *Crop Science* 23:85–88.
- Auld,D.L., Field,L.A, and Crock,J.C. 1985. Univ. of Idaho, Exp. Stn.Prog. Report . No. 228 (citado por Murray y Swensen, 1991).

- Bagge, M., Xia, X., and Lubberstedt, T. 2007. Functional markers in wheat. *Current Opinion in Plant Biology* 10:211-216.
- Baranger, A., Aubert, G., Arnau, G., Laine, A.L., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Lejeune-Henaut, I., Lallemand, J., and Burstin, J. 2004. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108(7):1309-1321.
- Barilli, E., Prats, E. and Rubiales, D. 2010. Benzothiadiazole and BABA improve resistance to *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in *Pisum sativum* L. with an enhancement of enzymatic activities and total phenolic content. *European Journal of Plant Pathology* 128: 483-493.
- Becher, S.A., Steinmetz, K., Weising, K., Boury, S., Peltier, D., Renou, J.P., Kahl, G., and Wolff, K. 2000. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 643–651.
- Becker, J., and Heun, M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology* 27:835-845.
- Belcher, S.J. 1999. Evaluation of winter and spring pea cultivars (*Pisum sativum*) sown in autumn and spring. *Aspects of Applied Biology*, 56: 135-140.
- Bhattacharyya, M.K., Smith, A.M., Ellis, T.H.N., Hedley, C., and Martin, C. 1990. The wrinkled seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell* 60: 115-122.
- Biddle, A. 2001. Seed Treatment, Challenges and Opportunities. The BCPC Publications, UK.
- Bozoglu, H., Peksen, E., Peksen, A. and Gulumser, A. 2007. Determination of the yield performance and harvesting periods of fifteen pea (*Pisum sativum* L.) cultivars sown in autumn and spring. *Pakistan Journal of Botany* 39(6):2017-2025.
- Brauner, S., Murphy, R.L., Walling, J.G., Przyborowski, J., and Weeden, N.F. 2002. STS markers for comparative mapping in legumes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 616–622.
- Bravo, L.A., Ulloa, N., Zúñiga, G.E., Casanova, A., Corcuera, L.J., and Alberdi, M., 2001. Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Plant Physiology* 111:55–65.
- Bretag, T.W., and Ramsey, M. 2001. Foliar diseases caused by fungi. In: Kraft, J.M., Pflieger, F.L. (eds) *Compendium of pea diseases and pests*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minn., pp 24–28.
- Burstin, J., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Aubert, G., and Baranger, A. 2001. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. *Plant Breeding* 120:311-317.
- Burstin, J., Gallardo, K., Aubert, G., Bordat, A., Marget, P., Magnin-Robert, J.B., Houtin, H., Rond, C., Martinello, M., Chauveau, A., Le Signor, C., and Duc, G. 2007. Diversity in *Pisum sativum* and comparative mapping with *Medicago truncatula*. In 6th European Conference on Grain Legumes "Integrating legume biology for sustainable agriculture" (12-16 novembre 2007, Lisbon congress centre, Portugal: AEP Association Européenne des protéagineux), pp. 11.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169–93.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4):611-22.
- Caminero, 2002. Adaptación a la siembra invernal y tolerancia al frío en guisante (*Pisum sativum* L.). PhD. Thesis. Universidad de León.

- Cavalli-Sforza, L.L., and Bodmer, W.F. 1981. *Genética de las Poblaciones Humanas*. Ed. Omega, Barcelona.
- Ceyhan, E., and Onder, M. 1999. Konya Ekolojik Sartlarında Farklı Ekim Zamanlarının Yemelik Bezelye (*Pisum sativum* L.) Cesitlerinde Verim ve Kalite Uzerine Etkileri. *Turkiye III. Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt III Cayır Mera Yem Bitkileri ve Yemelik*
- Clulow, S.A., Matthews, P., and Lewis, B.G. 1991. Genetical analysis of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea seedlings. *Euphytica* 58:183–189.
- Cousin, R. 1983. In *Perspectives for Peas and Lupin as Protein Crops*. Thompson, R., and Casey, R. (eds). Nijhoff, Netherlands, pp 146-164.
- Cousin, R., Messenger, A., and Vingere, A. 1985. Breeding for yield in combining peas. In: Hebblethwaite, P.D., Heath, M.C., and Dawkins, T.C.K. *The pea crop. A basis for improvement*. Butterworths, London, pp. 115-129.
- Cousin, R., Burghoffer, A., Marget, P., Vingere, A., and Eteve, G. 1993. Morphological, physiological and genetic basis of resistance in pea to cold and drought. In: Singh, K.B., and Saxena, M.C. (eds), *Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes*. John Wiley and Sons, Sayce Publishing and ICARDA, West Sussex, pp 311–321
- Coyne, C.J., Inglis, D.A., Whitehead, S.J., McClendon, M.T., and Muehlbauer, F.J. 2000: Chromosomal location of Fwf, the Fusarium wilt race 5 resistance gene in *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* 32:20-22.
- Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., and Smith, A.M. 1998, Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10:413–426
- Craig, J., Barratt, P., Tatge, H., Déjardin, A., Handley, L., Gardner, C.D., Barber, L., Wang, T.L., Hedley, C., Martin, C., and Smith, A.M. 1999. Mutations at the rug4 locus alter carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant Journal* 17:353–362
- Dalmanndóttir, S., Helgadóttir, Á., and Gudleifsson, B.E. 2001. Fatty acid and sugar content in white clover in relation to frost tolerance and ice-encasement tolerance. *Annals of Botany* 88:753–759.
- Deulvot, C., Charrel, H., Marty, A., Jacquin, F., Donnadiou, C., LejeuneHénaut, I., Burstin, J., and Aubert, G. 2010. Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea. *BMC Genomics* 11: 468-478.
- Die, J.V., Román, B., Nadal, S., and González-Verdejo, C.I. 2010. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta* 232:145-153.
- Dirlewanger, F., Issac, P.G., Ranade, S., Belajouza, M., Cousin, R.D.E., and Vienne, D. 1994 Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 17–27.
- Diwan, N., Bhagwat, A.A., Bauchan, G.R., and Cregan, P.B. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40:887-895.
- Domoney, C., Welham, T., Ellis, N., and Hellens, R. 1994. Inheritance of qualitative and quantitative trypsin inhibitor variants in *Pisum*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:387-391.
- Domoney, C., Welham, T., Sidebottom, C., and Firmin, J.L. 1995. Multiple isoforms of *Pisum* trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. *FEBS Letters* 360:15-20.
- Dordio, A.M. 1997. Winter varieties on grain legumes in Portugal. In: AEP (ed.) *Problems and prospects for winter sowing of grain legumes in Europe*. 3-4 December 1996. Dijon, France. 15-18.

- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Dumolin, V.B., Denis, J.B., Henaut, I.L., and Eteve, G. 1996. Interpreting Yield Instability in Pea Using Genotypic and Environmental Covariates. *Crop Science*, 36: 1154.
- Ellis, T.H.N., Turner, L., Helleus, R.P., Lee, D., Harker, C.L., Enard, C. *et al.* 1992 Linkage maps in pea. *Genetics* 130, 649–663.
- Ellis, T.H., Poyser, S.J., Knox, M.R., Vershinin, A.V., and Ambrose, M.J. 1998. Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Molecular and General Genetics* 260(1):9-19.
- Ellis, T.H. and Poyser, S.J. 2002. An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist* 153:17-25.
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C., and Hancock, J.F. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology & Systematics* 30:359-363.
- Etève, G. 1985. In *The Pea Crop: A Basis for Improvement*. Hebblethwaite, P.D., Heath, M.C., and Dawkins, T.C.K., (eds). Butterworths. London, UK, pp 131-136.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- FAOSTAT. 2010 Food and Agricultural Organization of the United Nations. Data, various years <http://faostat.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>. (Accessed 30th July 2012).
- Flavell, A.J., Knox, M.R., Pearce, S.R., and Ellis, T.H. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant Journal* 16(5):643-650.
- Fondevilla, S., Fernández-Aparicio, M., Satovic, Z., Emeran, A.A., Torres, A.M., Moreno, M.T., and Rubiales, D. 2010. Identification of quantitative trait *loci* for specific mechanisms of resistance to *Orobanche crenata* in pea. *Molecular Breeding* 25:259-272.
- Fondevilla, S., Küster, H., Krajinski, F., Cubero, J., and Rubiales, D. 2011a. Identification of common genomic regions controlling resistance to *Mycosphaerella pinodes*, earliness and architectural traits in different pea genetic backgrounds. *Euphytica* 18:43-52.
- Fondevilla, S., Martín-Sanz, A., Satovic, Z., Fernández-Romero, M-D., Rubiales, D. and Caminero, C. 2011b. Identification of quantitative trait *loci* involved in resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*.
- Frankel, O.H. 1947. The theory of plant breeding for yield. *Heredity* 1:109-120/123.
- Frew, T.J., Russell, A.C., and Timmerman-Vaughan, G.M.. 2002. Sequence tagged site markers linked to the sbm1 gene for resistance to pea seedborne mosaic virus in pea. *Plant Breeding* 121:512–516.
- Fuchs, J., Kühne, M. and Schubert, I. 1998. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma* 107: 272–276
- Gilpin, B.J., McCallum, J.A., Frew, T.J., and Timmerman-Vaughan, G.M. 1997. A linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics* 95:1289-1299.
- Gupta, P.K. and Rustgi, S. 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional & Integrative Genomics* 4:139-142.
- Haldane, J.B. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between linked factors. *Journal of Genetics* 8:299-309.
- Hall, K.J., Parker, J.S., Ellis, T.H.N. 1997. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. I. Standard and translocation karyotypes. *Genome* 40: 744 –754

- Halward,T., Stalker,H.T., and Rochert,G. 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. *Theoretical and Applied Genetics* 87(3):379-384.
- Harrison,C.J., Hedley, L., and Wang,T.L. 1998. Evidence that the *rug3 locus* of pea (*Pisum sativum* L.) encodes a plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *Plant Journal* 13:753–762
- Hekneby,M., Antolín,M.C., and Sánchez-Díaz,M. 2006. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Experimental Botany* 55:305–314.
- Hoey,B.K., Crowe,K.R., Jones,V.M. and Polans,N.O. 1996. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 92–100.
- Hunter,P.J., Ellis,N., and Taylor,J.D. 2001. Association of dominant *loci* for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* with linkage groups II, VI and VII of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* 103:129–135.
- Ijaz,S., and Khan,I.A. 2009. Molecular characterization of wheat germplasm using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 8:809-815.
- Irzykowska,L., Wolko,B., Swiêcicki,W.K., 2002. Interval mapping of QTLs controlling some morphological traits in pea. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7(2A): 417–423.
- Irzykowska,L., and Wolko,B. 2004 Interval mapping of QTLs controlling yield-related traits and seed protein content in *Pisum sativum*. *Journal of Applied Genetics* 45, 297–306.
- Jing,R.C., Knox,M.R., Lee,J.M., Vershinin,A.V., Ambrose,M., Ellis,T.H.N, and Flavell,A.J. 2005. Insertional polymorphism and antiquity of PDR1 retrotransposon insertions in *Pisum* species. *Genetics* 171:741–752
- Jing,R., Vershinin,A., Grzebyta,J., Shaw,P., Smykal,P., Marshall,D., Ambrose,M.J., Ellis,T.H., and Flavell,A.J. 2010. The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology* 10:44.
- Jing,R., Ambrose,M.A., Knox,M.R., Smykal,P., Hybl,M., Ramos,A., Caminero,C., Burstin,J., Duc,G., van Soest,L.J., Swiecicki,W.K., Pereira,M.G., Vishnyakova,M., Davenport,G.F., Flavell,A.J., and Ellis,T.H. 2012. Genetic diversity in European *Pisum* germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics* 125(2):367-380.
- Kalo,P., Seres,A., Taylor,S.A., Jakab,J., Kevei,Z., Kereszt,A., Endre,G., Ellis,T.H., and Kiss,G.B. 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Molecular and Genetetics Genomics* 272:235–246
- Kalendar,R., Antonius,K., Smykal,P., and Schulman,A.H. 2010. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 1419–1430.
- Katoch,V., Sharma,S., Pathania,S., Banayal,D.K., Sharma,S.K., and Rathour,R. 2010. Molecular Mapping of pea powdery mildew resistance gene *er2* to pea linkage group III. *Molecular Breeding* 25:229–237.
- Knox,M.R., and Ellis, T.H.N. 2001 Stability and inheritance of methylation states at *PstI* sites in *Pisum*. *Mol. Genet. Genomics* 265:497-507.
- Konovalov,F., Toshchakova,E., and Gostimsky,S. 2005. A CAPS Marker Set for Mapping in Linkage Group III of Pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters* 10(1): 163–171.

- Kosterin,O.E., and Bogdanova,V.S. 2008. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. *Genetic Resources and Crop Evolution*
- Laucou,V., Haurogne,K., Ellis,N., and Rameau,C. 1998 Genetic mapping in pea.1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 905–915.
- Laguna,R., Ramos,A., González,M.R., Caminero,C. and Martín,J.A. 1997. El cultivo del guisante protegino. *Agricultura Febrero*:135-141
- Lejeune-Hénaut, I., Hanocq,E., Béthencourt,L., Fontaine,V., Delbreil,B., Morin,J., Petit,A., Devaux,R., Boilleau,M., Stempniak,J.J., Thomas,M., Lainé,A.L., Foucher,F., Baranger,A., Burstin,J., Rameau,C., and Giauffret,C. 2008. The flowering *locus Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 116(8):1105–1116.
- Liesenfeld,D.R., Auld,D.L., Murray,G.A., and Swensen,J.B. 1986. Transmittance of winterhardiness in segregated populations of peas. *Crop Science* 26:49–54
- Lincoln,S., Daly,M., and Lander.E. 1992 Constructing Genetic Maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3rd edition.
- Link,W., Dixens,C., Singh,M., Schwall,M., and Melchinger,A.E. 1995 Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:27-32.
- Loridon,K., McPhee,K., Morin,J., Dubreuil,P., Pilet-Nayel,M.L., Aubert,G., Rameau,C., Baranger,A., Coyne,C., Lejeune-Hénaut,I., and Burstin,J. 2005. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111:1022–1031
- Lu,C., Shen,L., He,P., Chen,Y., Zhu,L., Tan,Z., and Xu,Y. 1997. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 94(1):145-150.
- Martin,A., Lee,J., Kichey,T., Gerentes,D., Zivy,M., Tatout,C., Dubois,F., Balliau,T., Valot,B., Davanture,M., *et al.* 2006. Two glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* 18:3252–3274.
- Martin-Sanz,A., Caminero,C., Jing,R., Flavell,A.J., and Perez de la Vega,M. 2011. Genetic diversity among Spanish pea (*Pisum sativum* L.) landraces, pea cultivars and the World *Pisum* sp. core collection assessed by retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIPs). *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(1):166-178.
- Maxted, N. and Ambrose, N. Peas (*Pisum* L.) Chapter 10. 2000. Maxted, N. and Bennett, N. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. Pp. 181-190.
- McCallum,J., Timmerman-Vaughan,G., Frew,T., Russell,A., 1997. Biochemical and genetic linkage analysis of green seed color in field pea. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 218–225.
- McPhe,K. 2005. Garden Pea, *Journal of New Seeds* 6(2-3):277-288.
- Mcphee,K., Inglis,D., Gundersen,B., and Coyne,C.J. 2012. Mapping QTL for Fusarium wilt Race 2 partial resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Breeding* 131(2):300-306.
- Metais,I., Hamon,B., Jalouzot,R., and Peltier,D. 2012. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1346-1352.

- Monti,L., Biddle,A.J., Moreno,M.T., and Plancquaert,P. 1994. Biotic and abiotic stresses of pulse crops in Europe. In: Muehlbauer,F.J., and Kaiser,.W.J. (eds), Expanding the production and use of cool season food legume. Kluwer
- Muehlbauer,F.J. 1991. Incorporation of useful characters from germplasm resources into cultivars of food legumes. In: Smith, A., and Robertson,R.S. (eds.), Legume Genetic Resources in the Semi-Arid Temperate Environments. ICARDA, Aleppo, Syria. pp. 363-393.
- Muehlbauer,F.J., and Kaiser,W.J. 1994. Using host plant resistance to manage biotic stresses in cool season food legumes. 1994. p. 233-246. In: Muehlbauer,F.J., and Kaiser,W.J. (eds.), Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Mullineaux,P.M., and Rausch,T. 2005. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. Photosynthesis Research 86(3):459-474.
- Munier-Jolain,N., and Carrouee,B. 2003. Considering pea in sustainable agriculture: agricultural and environmental arguments. Cahiers Agricultures 12(2): 111-120.
- Munier-Jolain,N., Biarnès,V., Chaillet,I., Lecoer,J., Jeuffroy,M.H., Benoît Carrouée , Crozat,Y., Guilioni,L., Lejeune,I. and Tivoli,B. 2010. Physiology of the Pea Crop. CRC Press. Enfield, NH.
- Murphy,L.D., Herzog,C.E., Rudick,J.B., Fojo,A.T., and Bates,S.E. 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. Biochemistry 29:10351-10356.
- Murray,G.A., and Swensen,J.B. 1991. Winterhardiness in pea. *Pisum* Genetics 23:4-13.
- Narvel,J.M., Fehr,W.R., Chu,W., Grant,D., and Shoemaker,R.C. 2000. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. Crop Science 40:1452-1458.
- Nasiri,J., Hagnazari,A., and SabaJ. 2009. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on SSR markers. African Journal of Biotechnology 8(15):3405-3417.
- Noctor,G., Mhamdi,A., Chaouch,S., Han,Y., Neukermans,J., Marquez-Garcia,B., Queval,G., and Foyer,C.H. 2012. Glutathione
- Perera,L., Russell,J.R., Provan,J., and Powell,W., 2000. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). Genome 43(1):15-21.
- Pilet-Nayel,L., Muehlbauer,F.J., McGee,R.J., Kraft,J.M., Baranger,A., and Coyne,C. J. 2002. Quantitative trait *loci* for partial resistance to Aphanomyces root rot in pea. Theoretical and Applied Genetics 106:28-39.
- Posvec,Z, and Griga,M, 2000. Utilization of isozyme polymorphism for cultivar identification of 45 commercial peas (*Pisum sativum* L.). Euphytica 113:251–258.
- Prasad,T.K. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. Plant Journal 10:1017–1026.
- Prasad,M., Varshney,R.K., Roy,J.K., Baylan,H.S., and Gupta,P.K. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetics 100:584-592.
- Price,J., Laxmi,A., St Martin,S.K., and Jang,J.C. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. Plant Cell 16: 2128-2150.
- Prieur,R., and Cousin,R. 1978. Contribution to establishing a technique for selecting for cold resistance in winter pea. Annales de F Amelioration des Plantes 28: 57-63.

- Prioul,S., Frankewitz,A., Deniot,G., Morin,G, and Baranger,A. 2004. Mapping of quantitative trait *loci* for partial resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.), at the seedling and adult plant stages. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1322–1334.
- Pritchard,J.K., Stephens,P., and Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945 – 959.
- Rameau,C., Denoué,D., Fraval,F., Haurongé,K., Josserand,J., Laucou,V., Batge,S., and. Murfet,I.C. 1998. Genetic mapping in pea. 2. Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture. *Theoretical and Applied Genetics* 97:916–928.
- Ramos,A. 1996. El guisante. In: El cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León. Franco,F. and Ramos,A (ed.). Junta de Castilla y León. Consejería de agricultura y ganadería. pp 77-140.
- Rongwen,J., Akkaya,M.S., Bhagwat,A.A., Lavi,U., and Cregan,P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics* 90:43-48.
- Rubiales,D., Fernández-Aparicio,M., Pérez-de-Luque,A., Castillejo,M.A., Prats,E., Sillero,J.C., Rispail,N., and Fondevilla,S. 2009a. Breeding approaches for crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) management in pea (*Pisum sativum* L.). *Pest Management Science* 65(5):553-559.
- Rubiales,D., Fernández-Aparicio,M., Moral,A., Barilli,E., Sillero,J.C., and Fondevilla,S. 2009b. Disease resistance in pea (*Pisum sativum* L.) types for autumn sowings in Mediterranean environments - a review. *Czech Journal of Genetics and Plant-Breeding* 45:135-142.
- Rubiales,D.,Ambrose,M.J., Domoney, C., and BurstinJ. 2011. Chapter 1: Pea (*Pisum sativum* L.). En: Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes. Perez de la Vega, M., Torres A.M., Cubero,I.J., and Kole,C. (eds.)1-49. CRC Press, Science Publishers, Enfield.
- Russel,J.R., Fuller,J.D., Macauley,M., Hatz,B.G., Jagoor,A., Powell,W., and Waugh,R. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accession detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95:714-722.
- Russel,J.R., Ellis,R.P., Thomas,W.T.B., Waugh,R., Provan,J., and Booth,A. 2000. A retrospective analysis of spring barley germplasm development from 'foundation genotypes' to currently successful cultivars. *Molecular breeding* 6:553-568.
- Saitou,N., y Nei,M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sarikamiş G, Yanmaz R, Ermiş S, Bakir M, and C Yüksel. 2010. Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. *Genetics and Molecular Research* 9(1):591-600.
- Sin'kevich,M.S., Sabel'nikova,E.P., Deryabin,A.N., Astakhova,N.V., Dubinina,I.M., Burakhanova,E.A., and Trunova,T.I. 2008. The changes in invertase activity and the content of sugars in the course of adaptation of potato plants to hypothermia. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(4):449-454.
- Simioniuc,D., Uptmoor,R., Friedt,W., and Ordon,F. 2002. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding* 121:429–435.
- Smykal,P. 2006. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *Journal of Applied Genetics* 47: 221–230.
- Smykal,P., Hybl,M., Corander,J., Jarkovsky,J., Flavell,A.J., and Griga,M. 2008a. Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 117(3):413-424.
- Smýkal,P., Horáček,J., Dostálová,R., Hýbl,M. 2008b.Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *Journal of Applied Genetic* 49: 155-166.

- Smýkal,P., Kenicer,G., Flavell,A.J., Corander,J., Kosterin,O., Redden,R.J., Ford,R., Coyne,C.J., Maxted,N., and Ambrose,M.J. 2011. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* 9: 4-18.
- Soleimani,V.D., Baum,B.R., and Johnson,D.A. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp *durum* (Desf.) Husn.]. *Theoretical and Applied Genetics* 104:350-357.
- Steiger,D., Nagal,C., Moore,P., Morden,C., Osgood,R., and Ming,R. 2002. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 105:209-215.
- Strand,A., Foyer,C.H., Gustafsson,P., Gardeström,P., and Hurry,V. 2003. Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell and Environment* 26:523–535.
- Studier,J.A., and Keppler,K.J. 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular Biology and Evolution* 5:729-731.
- Swensen, J.B. 1980. Development of freezing tolerance and changes in tissue moisture during hardening of *Pisum sativum* (L.) and *Pisum sativum* subsp. M.S. Thesis, University of Idaho, Moscow, USA.
- Sybenga,J. 1996. Recombination and chiasmata: few but intriguing discrepancies. *Genome* 39(3):473-484.
- Tam,S.M., Mhiri,C., Vogelaar,A., Kerkveld,M., Pearce,S.R., and Grandbastien,M.A. 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical and Applied Genetics* 110:819-831.
- Tar'an,B., Warkentin,T., Somers,D.J., Miranda,D., Vandenberg,A., Blade,S. Woods,S., Bing,D., Xue,A., DeKoeper,D., and Penner,G. 2003. Quantitative trait *loci* for lodging resistance, plant height and partial resistance to *Mycosphaerella* blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107:1482–1491.
- Tar'an,B., Zhang,C, Warkentin,T., Tullu,A., and Vandenberg,A. 2005. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48(2):257-72.
- Timmerman,G.M., Frew,T.J., Miller,A.L., Weeden,N.F., and Jermyn,W.A., 1993. Linkage mapping of *sbm-1*, a gene conferring resistance to pea seed-borne mosaic virus, using molecular markers in *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* 85:609-615.
- Timmerman,G.M., Frew,T.J., Weeden,N.F., Miller,A.L., and Goulden,D.S., 1994. Linkage analysis of *er-1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* D.C.) *Theoretical and Applied Genetics* 88:1050-1055.
- Timmerman-Vaughan,G.M., McCallum,J.A., Frew,T.J., Weeden,N.F. and Russell,A.C., 1996. Linkage mapping of quantitative traits controlling seed weight in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 93: 431-439.
- Timmerman-Vaughan,G.M., Frew,T.J., and Weeden,N.F. 2000. Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 101:241-247.
- Timmerman-Vaughan,G.M., Frew,T.J., Rusell,A.C., Khan,T., Butler,R., Gilpin,M., Murray,S., and Falloon,K . 2002. QTL mapping of partial resistance to field epidemics of *Ascochyta* blight of peas. *Crop Science* 42:2100–2111.

- Timmerman -Vaughan,G., Mills,A., Frew,T., Butler,R., Mccallum,J., Murray,S., Whitfield,C., Rusell,A., and Wilson,D. 2004. Linkage mapping of QTLs for seed yield, yield components and developmental traits in pea (*Pisum sativum* L.). En: 4th Intl. Crop Sci. Congr. Brisbane, Australia.
- Timmerman-Vaughan,G.M., Mills,A., Whitfield,C., Frew,T., Butler,R., Murray,S., Lakeman,M., McCallum,J., Russell,A., and Wilson,D. 2005. Linkage mapping of QTL for seed yield, yield components, and developmental traits in pea. *Crop Science* 45:1336-1344.
- Usadel,B., Bläsing,O.E., Gibon,Y., Poree,F., Höhne,M., Günter,M., Trethewey,R., *et al.* 2008. Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. *Plant, Cell and Environment* 31 (4):518-547.
- Van de Peer,Y., and De Wachter,R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences* 10:569-570.
- Varshney,R.K., Langridge,P., and Graner,A. 2007. Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley. *Advances in Genetics* 58:121-155.
- Vershinin,A.V., Allnutt,T.R., Knox,M.R., Ambrose,M.J., and Ellis,N.T.H. 2003. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication. *Molecular Biology and Evolution* 20:2067–2075.
- Voorrips,R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93(1):77-78.
- Wang,S., Basten,C.J., and Zeng,Z.B. 2005 Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, NCSU, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).
- Wang,L.X., Guan,R.X., Liu,Z.X., Chang,R.Z., Qiu,L.J. 2006. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Science* 46:1032-1038.
- Webb,M.S., and Steponkus,P.L. 1993. Freeze-induced membrane ultrastructural alterations in rye (*Secale cereale*) leaves. *Plant Physiology* 101:955–963.
- Weeden,N.F., Ellis,T.H.N., Timmerman-Vaughan,G.M., Swiecicki,W.K., Rozov,S.M., and Berdnikov,V.A. 1998. A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* 30:1–4.
- Weeden,N.F., Tonguc,M., and Boone,W.E. 1999. Mapping coding sequences in pea by PCR. *Pisum Genetics* 31:30–32.
- Weeden,N.F., Brauner,S., Przyborowski,J.A. 2002. Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:657-663.
- Weeden,N.F., and Muehlbauer,F.J. 2004. Genomics and genetic improvement in the cool season pulse crops pea, lentil and chickpea. Wilson, R. F., Stalker, H. T., and Brummer, E. C. *Legume Crop Genomics*. Champaign, IL, OCS Press.
- Wery,J., Turc,O. and Lecoeur,J. 1993. Mechanisms of resistance to cold, heat and drought in cool-season legumes, with special reference to chickpea and pea. In *Breeding for stress tolerance in cool season food legumes*. Singh,K.B. and Saxena,M.C. (eds.). Chichester, UK: John Wiley & Sons. pp 271-291.
- White,S. and Doebley,J. 1998. Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends Genet.* 14(8):327-332.
- Wong,M.L., and Medrano,J. 2005. RealTime PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* 39:75-85.
- Xin,Z., and Browse,J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and Environment* 23: 893-902.

