

00381  
48



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA  
DE LA COLECCION DE GERMOPLASMA DEL  
GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) EXISTENTE EN  
MEXICO CON TECNICAS MOLECULARES

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA)

p r e s e n t a

ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

284290

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE GERONIMO ABRAHAM RUBLUO ISLAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO	Página
ÍNDICE DE FIGURAS-----	iv
ÍNDICE DE CUADROS-----	vi
ÍNDICE DE DIAGRAMAS-----	vii
RESUMEN-----	1
ABSTRACT-----	4
JUSTIFICACIÓN-----	6
I. INTRODUCCIÓN-----	8
1.1 Origen del cultivo y descripción taxonómica-----	8
1.2 Importancia -----	9
1.3 El cultivo de garbanzo en México-----	10
1.4 Problemas bióticos y abióticos-----	12
1.5 Enfoque de las investigaciones en el cultivo-----	14
1.5.1 Mejoramiento genético tradicional-----	14
1.5.2 El uso de marcadores en el fitomejoramiento-----	16
a) Bioquímicos-----	17
b) Marcadores de ADN-----	18
1.6 Diversidad genética medida por marcadores-----	30
1.7 Análisis de datos moleculares-----	31
II. OBJETIVOS-----	37

III. MATERIALES-----	38
3.1 Especies vegetales-----	38
3.2 Iniciadores utilizados en la técnica de PCR para el análisis molecular de los genomas-----	39
a) Iniciadores utilizados para la técnica de MP-PCR-----	39
b) Iniciadores aleatorios evaluados para el establecimiento de la técnica de RAMP modificado-----	39
c) Iniciadores utilizados para la técnica modificada de RAMP-----	40
IV. METODOLOGIA-----	41
4.1 Siembra en invernadero-----	41
4.2 Obtención de ADN-----	42
4.3 Estimación de la pureza, calidad y cantidad del ADN obtenido-----	43
4.4 Caracterización del ADN con PCR-----	45
a) MP-PCR (ISSR) y selección de iniciadores-----	45
b) Selección de iniciadores aleatorios para el establecimiento de la técnica modificada de RAMP-----	45
c) Establecimiento de la técnica modificada de RAMP-----	46
d) Estandarización de las condiciones de reacción para PCR-----	48
e) Programas de amplificación para la PCR-----	48
f) Separación de los productos amplificados-----	49

4.5 Análisis estadístico de los datos (morfológicos y moleculares) y elaboración de dendrogramas-----	50
V.    RESULTADOS Y DISCUSION-----	52
5.1 Características evaluadas en invernadero-----	52
5.2 Dendrograma del análisis morfológico de 6 caracteres monogénicos de <i>Cicer arietinum</i> L.-----	55
5.3 Obtención de ADN-----	59
5.4 Caracterización molecular del ADN con PCR-----	60
5.4.1 MP-PCR (ISSR)-----	60
5.4.2 Selección de iniciadores aleatorios (RAPDs) para el establecimiento de la técnica modificada de RAMP-----	71
5.4.3 Detección de huellas genómicas con la técnica modificada de RAMP	73
5.4.4 Relación genómica de las colectas y variedades de <i>Cicer arietinum</i> L., y dos especies silvestres mediante el análisis combinado de marcadores moleculares-----	86
VI.    PERSPECTIVAS-----	91
VII.   CONCLUSIONES-----	95
VIII.  REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	97
VI.    ANEXO-----	103

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1	Relación morfológica de los genotipos estudiados de <i>Cicer</i> .-----	58
Figura 2	ADN de alto peso molecular obtenido de folíolos de 57 genotipos de <i>Cicer arietinum</i> L.-----	60
Figura 3	Huellas genómicas del genotipo 2 de <i>Cicer arietinum</i> L. detectadas con MP-PCR.-----	61
Figura 4	Huellas de ADN de tres especies del género <i>Cicer</i> detectadas con el microsatélite (GACA) <sub>4</sub> con la técnica de MP-PCR.-----	65
Figura 5	Huellas de ADN de tres especies del género <i>Cicer</i> amplificadas con el microsatélite (GATA) <sub>4</sub> con la técnica de MP-PCR.-----	66
Figura 6	Huellas de ADN de tres especies del género <i>Cicer</i> amplificadas con el microsatélite (GGAT) <sub>4</sub> con la técnica de MP-PCR.-----	67
Figura 7	Relación genómica de tres especies del género <i>Cicer</i> establecida con huellas de DNA detectadas con MP-PCR.-----	70
Figura 8	Patrón de bandas obtenido en el ADN del genotipo 2 de <i>Cicer arietinum</i> L. con los iniciadores aleatorios de la serie ROTH G.---	72
Figura 9	Amplificación de ADN del genotipo 2 de <i>C. arietinum</i> L. con la técnica modificada de RAMP.-----	74
Figura 10	Huellas de ADN amplificadas con los iniciadores ([GATA] <sub>4</sub> + OPG 02) en tres especies del género <i>Cicer</i> con la técnica modificada de RAMP.-----	76
Figura 11	Huellas de ADN de tres especies del género <i>Cicer</i> amplificadas en los iniciadores ([GATA] <sub>4</sub> + OPG 03) con la técnica modificada de RAMP.-----	77

Figura 12	Huellas de ADN amplificadas con los iniciadores ([GATA] <sub>4</sub> + OPG 09) en tres especies del género <i>Cicer</i> con la técnica modificada de RAMP. -----	78
Figura 13	Huellas de ADN amplificadas con la técnica modificada de RAMP utilizando los iniciadores ([GATA] <sub>4</sub> + OPG 10) en tres especies del género <i>Cicer</i> .-----	79
Figura 14	Huellas de ADN amplificadas con la técnica modificada de RAMP con los iniciadores ([GACA] <sub>4</sub> + OPG 02) en tres especies del género <i>Cicer</i> .-----	80
Figura 15	Huellas de DNA amplificadas con los iniciadores ([GACA] <sub>4</sub> + OPG 03) utilizando la técnica modificada de RAMP en tres especies del género <i>Cicer</i> .-----	81
Figura 16	Huellas de ADN detectadas con los iniciadores ([GACA] <sub>4</sub> + OPG 09) de tres especies del género <i>Cicer</i> utilizando la técnica modificada de RAMP.-----	82
Figura 17	Huellas de DNA en tres especies del género <i>Cicer</i> amplificadas con la técnica modificada de RAMP utilizando los iniciadores ([GACA] <sub>4</sub> + OPG 10).-----	83
Figura 18	Relación genómica de tres especies del género <i>Cicer</i> establecida con huellas de DNA detectadas con la técnica RAMP modificado	88
Figura 19	Relación genómica de tres especies del género <i>Cicer</i> establecida con huellas de DNA detectadas con la técnica MP-PCR y RAMP modificado.-----	89
Figura 20.	Relación genómica de tres especies del género <i>Cicer</i> establecida con características morfológicas y moleculares (huellas de DNA)	20

ÍNDICE DE CUADROS		Página
Cuadro 1	Comparación de diferentes metodologías utilizadas en la PCR.-----	22
Cuadro 2	Clases de ADN repetitivo.-----	25
Cuadro 3	Relación de los genotipos, nomenclatura y origen de la colección mexicana del germoplasma de garbanzo utilizado.--	38
Cuadro 4	Especies silvestres utilizadas, indicando su numero de identificación internacional y origen (Singh et al., 1991).-----	39
Cuadro 5	Secuencia específica de bases nitrogenadas que constituyen el kit G de iniciadores aleatorios de la casa comercial ROTH.---	40
Cuadro 6	Secuencias de los iniciadores utilizados en la técnica modificada de RAMP.-----	40
Cuadro 7	Condiciones utilizadas de termociclaje para la amplificación de DNA de <i>Cicer</i> con las técnicas MP-PCR y RAMP modificada.-----	49
Cuadro 8	Características morfológicas evaluadas en condiciones de invernadero de 57 genotipos de <i>C. arietinum</i> L. y dos especies silvestres de <i>Cicer</i> .-----	52
Cuadro. 9	Número de bandas detectadas y coincidentes con los iniciadores del kit G de ROTH en el ADN de L2 de <i>Cicer arietinum</i> L., con dos diferentes temperaturas de alineamiento.-----	73
Cuadro 10	Eficiencia de los iniciadores utilizados en PCR para el análisis de diferentes genotipos de <i>Cicer arietinum</i> L.-----	85

ÍNDICE DE DIAGRAMAS		Página
Diagrama 1	Secuencia de eventos que ocurren durante la reacción de polimerización en cadena (PCR)-----	23
Diagrama 2	Técnica de RAMP-----	29
Diagrama 3	Técnica modificada de RAMP-----	47

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi más sincero agradecimiento al CONACYT por el apoyo financiero que me otorgó para desarrollar la presente Tesis Doctoral.

A la Universidad Autónoma Chapingo por todas las facilidades otorgadas durante la realización de mis estudios doctorales.

Al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por su apoyo y comprensión.

Al Dr. Günter Kahl por su constante apoyo moral y orientación continua, ya que gracias a él fue posible la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Abraham Rublúo Islas y al Dr. Roberto Arreguín de los Monteros por su orientación, apoyo y facilidades brindadas.

A la M. en C. María Elisa Alvarado Cano por su total apoyo y ayuda en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Dra. Marilyn Louise Warburton por su apoyo y orientación en el aspecto estadístico.

Al Dr. Nahúm Marbán M., al Dr. Barbarín Arreguín, al Dr. Victor Valdés y a la Dra. Guadalupe Palomino H., por sus valiosas sugerencias y revisión del presente trabajo.

A mi Alma Mater la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de desarrollar y presentar esta tesis doctoral, la cual espero sirva como apoyo científico a las generaciones venideras.

## DEDICATORIA

**Dedico esta Tesis Doctoral a todos aquellos que ven la Ciencia no como un *modus vivendi*, pero sí como un modo para mejorar la calidad de vida en todos sus aspectos.**

**Octubre de 2000**

## **ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DEL GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) EXISTENTE EN MÉXICO CON TÉCNICAS MOLECULARES**

### **RESUMEN**

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una leguminosa originaria de la India, Asia Central y la Región del Mediterráneo; se utiliza para la alimentación humana y como forraje, ocupando uno de los primeros lugares de importancia mundial. Este cultivo en México se considera secundario, debido a que la superficie que se destina para su producción es reducida comparada con la que ocupa el maíz, el frijol, el chile o el jitomate, que representan cultivos básicos. El cultivo del garbanzo en nuestro país se lleva a cabo principalmente para exportación y en pocas cantidades se utiliza para la alimentación humana y complementación de dietas para animales (Andrade, 1979; van Rheenen, 1991).

El cultivo del garbanzo aún en sus centros de origen, se caracteriza por tener una reducida variabilidad genética, lo que ha repercutido en un fitomejoramiento difícil (Robertson et al., 1995). Se presume que la diversidad del germoplasma existente en México es también mínima; sin embargo no se dispone de estudios que argumenten esta suposición. Aún así, las investigaciones realizadas en nuestro país desde el punto de vista de mejoras genéticas son pocas (Nene y Haware, 1980), pero se han logrado producir variedades cuyo producto de exportación ha mostrado ser competitivo a nivel mundial (Gómez-Garza y Paredes, 1989, Gómez-Garza, 1994; Muehlbauer, 1998 a y b); por lo que este cultivo podría representar una alternativa para la captura de divisas, dado que la calidad del garbanzo producido en México es internacionalmente reconocida como de óptima calidad.

Con la finalidad de conocer la diversidad genética y establecer la relación entre los principales cultivares que conforman la colección del germoplasma existente en México, se estudiaron desde el punto de vista morfológico y genotípico con ADN, 57 colectas y variedades de *C. arietinum* que fueron facilitados por el CEVACU (Centro de Investigación Regional del Noroeste del Valle de Culiacán. INIFAP). Se incluyeron

también en el análisis dos especies silvestres; una que mantiene una relación cercana (*Cicer reticulatum*) y otra alejada (*Cicer cuneatum*) proporcionadas por el ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Siria), con la finalidad de utilizarlas como grupos comparativos en los dendrogramas obtenidos, y para valorar la utilidad de las técnicas empleadas en la diferenciación inter e intra-específica.

Los análisis de ADN se llevaron a cabo con dos metodologías basadas en la PCR (Staub y Serquen, 1996), la primera de ellas conocida como MP-PCR o ISSR que utiliza iniciadores de microsatélites (Weising et al., 1998; Udupa et al., 1999) y la otra, referida como RAMP (reportada por Wu y col. en 1994 y citada por Weising et al., 1998), que utiliza iniciadores de secuencias aleatorias combinadas con secuencias marcadas de microsatélites anclados. Esta última técnica es capaz de detectar otra clase de marcadores de ADN totalmente diferentes a los mostrados de manera independiente con las secuencias aleatorias o de microsatélites y fue empleada en este trabajo debido a que la caracterización con RAPDs es poco eficiente para detectar polimorfismos en el ADN de garbanzo (Simon y Muehlbauer, 1997). Sin embargo, la técnica de RAMP que se utilizó fue una modificación a la original, en el sentido de que se usaron iniciadores de microsatélites no radioactivos y sin anclas. Esta modificación respondió principalmente al interés en primer lugar, de no utilizar radioisótopos, de utilizar una técnica con un potencial alto para la detección de polimorfismos en un cultivo con poca variación genética como el garbanzo y por lo tanto, disminuir los costos en la investigación realizada.

La caracterización morfológica de las 57 colectas y variedades permitieron establecer la separación de dos grupos principales de garbanzo presentes en México: el grupo "Desi" y el grupo "Kabuli"; mientras que los marcadores de ADN obtenidos con la técnica modificada de RAMP, permitieron establecer además, una relación genética más estrecha entre los genotipos y por lo tanto una discriminación inter-específica. En contraste, la técnica que menos información proporcionó fue la de MP-PCR debido a que el número de iniciadores utilizado fue poco (tres); sin embargo, los marcadores obtenidos en este último caso, fueron suficientes para establecer la discriminación intra-específica de las especies utilizadas de *Cicer*.

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten sentar las bases para el desarrollo de un proyecto a mayor escala, en donde la variación genética encontrada se utilice en primer lugar, para seleccionar genotipos diferentes que representen alternativas para su explotación a nivel comercial o para su uso al interior del país; y en segundo lugar, será posible hacer estudios de fitomejoramiento más específicos que en un futuro puedan permitir la identificación de genes que posiblemente ya no estén presentes en cultivares de otros países.



## ABSTRACT

The chickpea (*Cicer arietinum* L) is a very important grain legume originally from India, Central Asia and Mediterranean zone; it is used as human and animal food and is the third most important non-cereal crop in the world. In Mexico, the chickpea is not considered to be a basic crop, and cultivation is reduced compared to staple crops such as maize, bean, chili and tomato. The production of chickpea in Mexico is basically for export and only low quantities are used as human and animal food (Andrade, 1979; van Rheenen, 1991).

The principal characteristic of the chickpea, including their place of origin, is the reduced genetic variability, and in consequence breeding of chickpea is not easy (Robertson et al., 1995). The germplasm diversity of chickpea present in Mexico, may also be reduced; however there are no studies that support this assumption. Studies with this crop in Mexico are very few, (Nene y Haware, 1980), but breeders have obtained varieties that are competitive in the world for export (Gómez-Garza y Paredes, 1989, Gómez-Garza, 1994; Muehlbauer, 1998 a y b). Chickpea represents a good possibility for foreign investment, because the quality of Mexican-grown seed is internationally recognized.

In order to know the genetic diversity of Mexican chickpea germplasm and relationships between the major accessions of this collection, 57 accessions of *C. arietinum* L. from this collection were studied with morphological and DNA markers. The samples were obtained from CEVACU (Centro de Investigación Regional del Noroeste del Valle de Culiacán. INIFAP). Two wild species were included in the study; the first one more closely related to cultivated chickpea (*Cicer reticulatum*) and the second one less so (*Cicer cuneatum*). These samples and associated information were obtained from ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Syria). The last two species were used as comparative groups and to evaluate the use of different techniques to differentiate between and within species.

The DNA was analyzed employing two PCR strategies (Staub y Serquen, 1996): MP-PCR (or ISSR) that use microsatellite primers (Weising et al., 1998; Udupa et al., 1999),

and one modification of the RAMP technique 1994 (Weising et al., 1998), that uses random primers combined with microsatellite primers. The modification, initially reported by Wu et al., is a non-radioactive alternative to DNA analysis. This last methodology was able to reveal more DNA polymorphisms compared to RAPD, MP-PCR and morphologic analysis in our germplasm.

The results obtained in this study using morphologic characterization permitted the separation of the germplasm into two principal groups, called “desi” and “kabuly”. However, the DNA analysis with RAMP allowed a better definition of the genetic relationships between the cultivated accessions and intra and inter-specific discrimination. No useful results were obtained with MP-PCR because only three primers were used; however, the fingerprints detected were sufficient to establish intra-specific discrimination in the *Cicer* species.

## JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones enfocadas al mejoramiento genético de plantas enfrentan una serie de problemas que les impiden llegar a la meta deseada en un tiempo razonable, uno de éstos está relacionado con la selección apropiada de las plantas con las que se iniciará el programa de fitomejoramiento y el otro es la estrecha diversidad genética que pueda presentar el cultivo de interés.

En términos básicos, los programas convencionales inician con la combinación de caracteres deseables que están presentes en diferentes líneas parentales de especies silvestres o cultivadas; y después continúan con la obtención de una población  $F_2$ , en donde se espera que existan individuos estables con las características consideradas. Sin embargo, este tipo de selección proporciona datos que pueden ser erróneos y variables, ya que se ha demostrado ampliamente que las características fenotípicas no siempre están relacionadas con el genotipo de la planta en estudio, puesto que éstas son marcadamente influidas por el ambiente en el que ésta se desarrolla. Por esta razón, el investigador necesita realizar retrocruzas consecutivas y numerosas evaluaciones en ambientes diferentes, lo que resulta demasiado laborioso y costoso.

Para el caso de la estimación de la variabilidad genética, el fitomejorador se enfrenta también a otros problemas, ya que muchos cultivos son pobres en este aspecto y no presentan muchas alternativas para que el investigador pueda seleccionar la planta más adecuada e iniciar el programa de fitomejoramiento.

Considerando ambos problemas, desde mediados de la década de los 80 los investigadores han desarrollado estrategias que permiten seleccionar con cierta facilidad al organismo de interés desde etapas iniciales de su desarrollo y estimar con gran precisión la variación genética del cultivo. Estas estrategias están basadas en la detección de polimorfismos de ADN (marcadores genéticos) que pueden estar asociados a características específicas que hacen distintiva a una planta particular. La detección de dichos fragmentos de ADN se lleva a cabo con técnicas basadas en hibridación molecular o mediante el uso de la tecnología de la PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), principalmente.

Tomando en cuenta que el cultivo del garbanzo fue introducido a México en la época de la conquista, que carece de una variación genética amplia (aún en sus centros de origen), que es una planta autógama con un nivel endogámico cercano al 100% y que no ha sido lo suficientemente estudiado en México aún cuando se ha cultivando y exportando con gran éxito; se consideró importante iniciar un estudio para conocer la variación genética de los principales cultivares que conforman la base del germoplasma existente en nuestro país. Los resultados de estos primeros estudios permitirán que los fitomejoradores contemplen alternativas para la selección de genotipos diferentes y alternos a los que se han venido utilizando, lo cual puede traer como consecuencia una mejor respuesta tanto a condiciones ambientales como de estrés, así como un posible incremento en la producción.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Origen del cultivo y descripción taxonómica

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es originario del sur-oeste de Turquía y áreas adyacentes de Siria y es una especie que se ha cultivado desde hace muchos siglos (alrededor de 7000 años) con fines alimenticios y de forraje en varios países (van Rheenen, 1991). Los restos arqueológicos más antiguos datan de 5450 años A. de C. y proceden de la localidad de Hacilar en Turquía.

El garbanzo es una planta anual, de 25 a 70 cm de altura, con tallo erecto, ramificado, cilíndrico y con pubescencia glandular. La raíz principal está bien desarrollada y con numerosas raíces laterales que presentan grandes nodulaciones. Es una leguminosa autógena y diploide ( $2n=2x=16$ ), pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Cicereae* y género *Cicer* L. En el género se incluyen varias especies anuales silvestres, que son *C. bijugum* K. H. Rech., *C. chorassanicum* (Bge) M. Pop., *C. cuneatum* Hochst. ex Rich, *C. echinospermum* P. H. Davis, *C. judaicum* Boiss., *C. pinnatifidum* Jaub. & Sp., *C. reticulatum* Lad., y *C. yamashitae* Kitamura; pero *C. arietinum* L., es la única de importancia económica y agronómica. Las dos especies silvestres importantes que están cercanamente relacionadas al cultivo son *C. reticulatum* y *C. echinospermum*, y son endémicas del área comprendida en el este de Turquía y norte de Iraq. Su importancia estriba en que en ellas se encuentran fuentes de resistencia genética duradera a varios problemas fitopatológicos y es posible el mejoramiento genético con *C. arietinum* L. (van Rheenen, 1991; Robertson et al., 1995).

En el género *Cicer* se han realizado varios estudios enfocados a conocer la variabilidad en cuanto al tamaño del genoma, ya que se cuenta con una gran cantidad de colectas de *C. arietinum* L., y de especies silvestres (Robertson et al., 1995). Estos estudios han indicado que *C. arietinum* L. Es muy diverso en este aspecto, ya que se han reportado valores haploides desde 772 Mpb hasta 2509 Mbp dependiendo de la colecta analizada; mientras que las especies silvestres (*C. reticulatum* y *C. cuneatum*) presentan un genoma muy estable, ambas con valores de 1254 Mpb, independientemente de la distancia

genética que existe entre ellas (Ohri y Pal, 1990; Arumuganathan y Earle, 1991; Bennett y Leitch, 1997).

Dos clases de garbanzo han sido ampliamente utilizadas en todos los países en donde se cultiva; el tipo Desi nativo de la India, Afganistán y Asia Menor, que se caracteriza por tener semillas pequeñas de color café y corresponde a la variedad *fuscum*, también referido como *vulgare*; y el tipo Kabuli que presenta semillas grandes de color blanco, se cultiva principalmente en el Mediterráneo y pertenece a la variedad *macrocarpum* (Andrade, 1979; van Rheenen, 1991).

## 1.2 Importancia

El garbanzo ocupa el quinto lugar más importante a nivel mundial de las leguminosas después de la soya (*Glicine max* L.) cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el chícharo (*Pisum sativum* L.); tiene una marcada adaptación a ambientes variados y a sistemas de cultivo (Ohri y Pal, 1990; Singh, et al. 1991). Su importancia estriba en ser una fuente económica de alta calidad proteica en las dietas de millones de personas de países en desarrollo que no pueden consumir proteínas de origen animal para alcanzar una nutrición balanceada. En zonas áridas del oeste de Asia y norte de Africa (WANA: West Asia and North Africa) es un cultivo alimenticio muy preciado; en otras partes del mundo como en México, además de utilizarse como alimento se utiliza como forraje, principalmente (Singh, et al. 1991, van Rheenen, 1991).

La composición química de las semillas varía entre las muestras y métodos de análisis, pero generalmente contienen aceites, carbohidratos totales, proteínas, fibra, ceniza, humedad, Ca, P, Fe,  $\beta$ -caroteno, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico. La composición principal de aminoácidos que constituyen las proteínas de esta leguminosa, está dada por: Ácido aspártico, Ácido glutámico, Alanina, Arginina, Fenilalanina, Glicina, Hístidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Tirosina, Prolina, Serina y Valina; pero también se ha reportado la presencia de varios químicos específicos y no específicos tipo colinas, saponinas, biocaninas y flavonoides; así como inhibidores de la tripsina y quimiotripsina en las semillas (Duke, 1981).

Esta leguminosa contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales para la nutrición; Arginina, Fenilalanina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina y Valina, pero carece de la Treonina y Triptofano; además no presenta los aminoácidos Cisteína, Glutamina y Asparagina para completar los 20 aminoácidos comunes. De aquí, precisamente el interés de mezclar legumbres con cereales (particularmente al garbanzo y el maíz) para elaborar tortilla con un contenido nutricional equivalente al consumo de proteínas de origen animal (Barrón y Espinoza, 1993).

### **1.3 El cultivo de garbanzo en México**

En el siglo XVI los españoles y portugueses introdujeron el garbanzo a América. Se reporta que primero fue llevado a las Antillas, pero las condiciones ambientales no le fueron favorables; después fue traído a México donde fue posible su establecimiento y cultivo (Andrade, 1979).

En México se produce principalmente para exportación y para alimento de animales, donde varias partes de la planta son utilizadas. El consumo humano en este país es bajo, debido a que no es un cultivo básico; sin embargo, en algunas localidades la gente lo consume de diferentes formas para complementar su alimentación (Barrón y Espinoza, 1993).

En el territorio existen dos áreas principalmente definidas para su cultivo; la zona noroeste que abarca los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur; donde se siembra principalmente el tipo Kabuli. La superficie destinada a la siembra es alrededor del 30% del total, el rendimiento promedio que se registra en esta parte de México es aproximadamente de 1.6 a 1.9 ton/ha, que comparado con el de otros países representa un incremento de dos a tres veces (van Rheenen, 1991). Esta zona se caracteriza por tener un clima caluroso que va desde seco hasta sub-húmedo, con suelos normalmente arenosos y puede ser considerada como una región agroecológica con producción irrigada a nivel del suelo y con un invierno no drástico al final del ciclo del cultivo (Andrade, 1979).

La segunda zona definida es la del Bajío, en donde el garbanzo que se cultiva es el Desi principalmente, la superficie que se destina abarca el 70% del total a nivel nacional y el rendimiento por hectárea registrado es variable, desde 600 kg/ha con baja humedad residual, hasta 3.0 ton/ha con irrigación y fertilización adecuada; los estados involucrados son San Luis Potosí, Nayarit, Guanajuato, Michoacán, Jalisco y Querétaro (Andrade, 1979; Gómez-Garza, 1994). El Bajío se caracteriza por tener un clima húmedo templado, con suelos de composición arcillosa y algunos componentes arenosos. Guanajuato es el estado más seco y con menos lluvias al final del año, mientras que en los estados de Jalisco y Michoacán se registra más humedad y consecuentemente tienen menos problemas de sequía para su producción. Sin embargo el cultivo en esta zona se lleva a cabo bajo condiciones de temporal, aprovechando la humedad residual al final de la época de lluvias (Andrade, 1979). Cabe hacer notar que la producción/superficie sembrada en México es superior en dos o tres veces respecto a lo reportado en el resto de los países productores, que en promedio obtienen un rendimiento de 600 a 700 kg/ha (van Rheenen, 1991).

El cultivo de garbanzo, principalmente el tipo Desi, es ampliamente cultivado en el subcontinente Indio, en Etiopía y México. El tipo Kabuli se cultiva en el oeste de Asia, Turquía, Cuenca del Mediterráneo, norte de África, Europa, Australia y México.

En el ámbito mundial, México ocupa el tercer lugar en cuanto a producción, el cuarto en superficie cultivada y el segundo en rendimiento; siendo los países del medio oriente como la India, Pakistán y Etiopía los que ocupan los primeros lugares en superficie cultivada y Turquía el primer lugar en rendimiento (Andrade, 1979; van Rheenen, 1991).

La producción de garbanzo blanco que se obtiene en México se exporta al extranjero, principalmente a Cuba, Francia, España, norte de África y América del Sur, alcanzando hasta 1100 dólares por tonelada. Este precio se debe principalmente a dos razones: la primera es que la producción mexicana entra al mercado mundial con un mes de anticipación respecto al de la India y Medio Oriente y en segundo lugar por su calidad, que es reconocida internacionalmente. Esta calidad está basada en la baja presencia de patógenos y a otras características importantes desde el punto de vista agronómico, como por ejemplo el tamaño, color y rugosidad del grano; considerando que las normas

de calidad en el mercado de exportación son: color blanco a crema, testa rugosa con costillas bien formadas, calibre de grano y tiempo de cocción de 50 a 60 minutos. Los precios que logra esta leguminosa en el comercio internacional, están básicamente en función de los indicadores antes señalados (Gómez-Garza, 1994).

#### 1.4 Problemas bióticos y abióticos

En todos los países donde se cultiva el garbanzo se ocasionan considerables pérdidas económicas en su producción, debidas a factores bióticos como enfermedades, plagas de insectos y nematodos. Además, el cultivo frecuentemente carece de la capacidad de aprovechar el riego y fertilización suplementada, lo que trae como consecuencia una producción del grano baja e inestable en muchos países en donde se cultiva (Nene y Haware, 1980; Robertson et al., 1995; Halila y Strange, 1997).

Las enfermedades constituyen una de las principales limitaciones para su producción, se han reportado más de 50 que lo afectan en diferentes áreas del mundo, siendo algunas devastadoras. Entre las más importantes y que se presentan particularmente en el subcontinente Indio y la cuenca de Mediterráneo son la “rabia” causada por el hongo *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse [teleomorfo *Dydimella rabiei* (Kovachevski) V. Arx.] y la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato (Jiménez, 1994).

En México, la principal enfermedad que lo afecta es conocida también como la “rabia” pero a diferencia de la causada por *A. rabiei* en nuestro territorio, es ocasionada por un complejo de hongos del suelo, entre los que *A. rabiei* no tiene importancia. También en nuestro país se han reportado a la roya o “chahuixtle” causado por *Uromyces ciceris-arietini* (Gragnon) Jaesz, el moho blanco ocasionado por *Sclerotinia esclerotiorum* (Lib) y el moho gris causado por *Botritis cinerea* Pers. exFr., que atacan la parte aérea de la planta, además de algunos gusanos que se alimentan del follaje y de la vaina, principalmente (Andrade, 1979; Gómez-Garza, 1994).

Los hongos presentes en el suelo que ocasionan la rabia en México, penetran a la planta por la raíz ocasionando marchitez generalizada y amarillamiento. Esta enfermedad se

encuentra presente en las dos áreas productoras de garbanzo. Los patógenos involucrados reportados son *Fusarium solani* (Mart Apple end Wr., *F. oxysporum* Schlechtend f sp. *ciceri* (FOC), *Rhizoctonia solani* Kuehn, *Macrophomina phaseolina* (Maubl) Ashley y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Todos ellos importantes ya que de manera independiente pueden causar daños a la planta, pero su agresividad se ve incrementada cuando se encuentran en forma de complejo; sin embargo, FOC es un patógeno altamente destructivo del cultivo por sí solo y ha sido reportado en 23 países (Andrade, 1979 y Gómez-Garza, 1994; Halila y Strange, 1997; Mayer et al., 1997).

La rabia se puede presentar en cualquier etapa del desarrollo del cultivo; pero la severidad máxima de los patógenos que la ocasionan puede manifestarse en algunas etapas preferenciales; por ejemplo, *R. solani* puede atacar en estado de plántula, *M. phaseolina* se presenta durante la madurez fisiológica y *Fusarium* y *Sclerotium* pueden estar presentes en cualquier etapa (Gómez-Garza, 1994).

Las principales plagas que afectan a este cultivo en México son el gusano de la cápsula *Heliothis virescens* Fabricius que en sus primeras etapas se alimenta de hojas y posteriormente de granos en formación, el gusano soldado *Spodoptera exigua* Hubner que se alimenta de hojas, el gusano trozador *Agrotis ipsilon* Hufnagel que por su habito de desarrollo se puede encontrar en la base del tallo y lo trozan al nivel del suelo y la mosquita minadora *Liriomyza* sp. que puede causar defoliaciones cuando las infestaciones son fuertes (Gómez-Garza y Paredes, 1989).

La resistencia intrínseca (genética) de la planta es el medio más importante para el control de las enfermedades y es el objetivo primario de los programas de fitomejoramiento. Su uso es una de las propuestas más atractivas para la supresión de éstas ya que se manifiesta durante la etapa más importante de la planta que es el crecimiento; generalmente esta alternativa es compatible con otras técnicas de manejo de enfermedades y es heredable, lo que representa bajos costos en la producción.

Una de las aplicaciones que las técnicas moleculares ofrecen en este sentido, es la capacidad de detectar marcadores de ADN (principalmente) asociados a la resistencia o susceptibilidad de un cultivo en particular a algún fitopatógeno que lo afecte. Con estos

marcadores es posible la selección rápida de una planta que presente las características deseadas e iniciar con ella los cruzamientos necesarios para incorporar dichas características (Mayer et al., 1997).

## **1.5 Enfoques de las investigaciones en el cultivo**

### **1.5.1 Mejoramiento genético tradicional**

Con base a las fuertes pérdidas económicas que causan los factores bióticos y abióticos ha sido necesario identificar fuentes de resistencia en los cultivares de garbanzo; sin embargo, este cultivo se caracteriza porque presenta pocas alternativas para dichos aspectos.

El ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) y el ICRISAT (International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics) son los centros más importantes en donde se mantienen y renuevan germoplasmas de diferentes leguminosas, entre ellas al garbanzo. Estos centros tienen programas de fitomejoramiento enfocados a la búsqueda de fuentes genéticas de resistencia a los diferentes factores de estrés que se presentan en los países en donde se cultivan las leguminosas de mayor importancia. Respecto al cultivo del garbanzo, en el ICARDA se llevaron a cabo estudios de evaluación genética hasta 1991, en donde se consideraron 6467 cultivares incluyendo 5163 líneas locales, 1167 líneas mejoradas y 137 especies silvestres con la finalidad de evaluar características de importancia agronómica y encontrar fuentes de resistencia a plagas, enfermedades, frío, herbicidas y a deficiencia de hierro. Estos estudios indicaron que solamente las especies silvestres presentan altos niveles de resistencia genética duradera para el escarabajo de la semilla *Callosobruchus chinensis* L., para el nematodo *Heterodera ciceri*, para “fusarium wilt”, para “ascochyta blight”, para el minador de la hoja *Liriomyza cicerina* y para el frío (Robertson et al., 1995). *C. bijugum* y *C. yamashitae* en particular, fueron dos especies muy importantes en este aspecto ya que mostraron tener múltiples fuentes de resistencia genética; pero tienen el inconveniente hasta el presente, de que no es posible la hibridación con *C. arietinum* debido a la distancia genética que los separa; por lo tanto, las especies más

relacionadas al cultivo que pueden ser utilizadas en programas de fitomejoramiento son *C. reticulatum* y *C. echinospermum* (van Rheenen, 1991; Robertson et al., 1995).

Quizá para México, el cultivo de garbanzo no tuvo mucha importancia antes de 1958 cuando comenzó su explotación comercial. Desde 1961, ha sido seleccionado y genéticamente manipulado para obtener variedades que presenten características agronómicas importantes como adaptación, alta producción, buena calidad de semilla y resistencia a enfermedades de la raíz; de hecho se reportó que en nuestro país la búsqueda de cultivares resistentes a la fusariosis no había sido explotada lo suficiente (Nene y Haware, 1980). Tomando en cuenta lo anterior y llevando a cabo cruza genéticas específicas con algunas líneas de la colección de germoplasma que existe en México, se han obtenido nuevas variedades, como: Unión, Angostura, Culiacán 860, Sinaloa, Surutato 77, Sonora 80, Santo Domingo, Tubatama 88, Mocerito 88, Blanco Sinaloa 92, Hermosillo 93, Pictic 93 que superan algunas características agronómicas y algunos problemas de pudriciones radicales (Gómez-Garza y Paredes, 1989; Gómez-Garza 1994).

Recientemente en los Estados Unidos, la variedad Surutato-77 ha sido utilizada como progenitor para obtener dos variedades registradas con resistencia a *ascochyta blight* y *fusarium wilt* utilizando la línea FLIP 85-58 y originar las variedades "Sanford" y "Dwelley", esta última producto de la cruce de una selección F7 de la cruce FLIP 85-58 y Surutato 77 (Muehlbauer, 1998 a y b).

Sin duda, en la colección de garbanzo que existe en México y que ha sido recopilada y mantenida por el Campo Experimental del Valle de Culiacán (CEVACU) del Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Sinaloa, existen líneas con buen potencial genético (Gómez-Garza y Paredes, 1989; Muehlbauer, 1998 a y b). Sin embargo, la investigación dedicada a este cultivo en nuestro país aún es poca, debido a que se tiene preferencia por cultivar e investigar especies que son básicas para la cultura mexicana; por tal razón no se cuenta con alguna descripción morfológica y/o genética de dicho germoplasma y solo se tienen reportes parciales de aquellas líneas que se han utilizado como progenitoras para generar variedades mejoradas; razón por la cual no se conoce el potencial genético real de la colección.

### **1.5.2 El uso de marcadores en el fitomejoramiento**

Todas las diferencias genéticas (polimorfismos) que se pueden apreciar entre los individuos son ocasionadas por cambios en su ADN. Dichas diferencias pudieron haberse debido a inserciones, deleciones, translocaciones o inversiones de las bases nitrogenadas en regiones de los cromosomas; estas alteraciones pueden demostrarse en dos maneras: analizando directamente a esta macromolécula para identificarlas en las regiones no codificadoras de proteínas, o bien, analizando los productos genéticos de la célula; es decir, cambios en las proteínas, enzimas o características fenotípicas. Las diferencias detectadas tanto en el ADN como en sus productos se les denomina **marcadores** que permiten etiquetar al individuo.

Para poder describir e identificar a un individuo o especie en particular, se han utilizado desde épocas remotas a los caracteres morfológicos distintivos del organismo. La variación genética de la especie normalmente se estima con base a las formas alternativas de esos caracteres morfológicos, codificados por los alelos. Esta última ha sido una estrategia de mucha utilidad para los fitomejoradores, ya que dependiendo de las dimensiones de esa diversidad, se diseñan los esquemas de mejoramiento genético más apropiados (Staub y Serquen, 1996); por ejemplo, con base en la diversidad genética que muestre una población, es posible seleccionar grupos de individuos que respondan favorablemente a condiciones de estrés o que expresen características deseables. Una vez que se identifican dichos grupo, se trata de buscar algún marcador morfológico o molecular asociado a dichas características y los individuos que lo presenten, podrán utilizarse como progenitores para la obtención de nuevos individuos mejorados.

Aún cuando a la fecha se dispone de diferentes tecnologías que permiten describir con precisión a un individuo (planta); es recomendable complementar la descripción fenotípica (marcadores fenotípicos) con marcadores de ADN; esta combinación enriquece la caracterización del individuo y le facilita al fitomejorador seleccionar en menor tiempo aquella planta o plantas con las que iniciará su esquema de trabajo. Lo anterior es altamente recomendable cuando la variación genética es reducida (Simon y Muehlbauer, 1997).

### **a) Marcadores Bioquímicos**

Una de las primeras estrategias para buscar diversidad genética en las plantas (obviamente además del análisis morfológico) ha sido el uso de isoenzimas. Este tipo de moléculas son formas múltiples de una enzima particular que cataliza la misma reacción, porque reconocen al mismo sustrato; difieren en su estructura primaria, en sus propiedades fisicoquímicas, en su regulación genética y pueden consistir de varias cadenas polipeptídicas en combinaciones aleatorias; por ejemplo la isoenzima lactato deshidrogenasa, presenta tetrámeros de la cadena polipeptídica A y B en cinco diferentes combinaciones: AAAA, AAAB, AABB, ABBB y BBBB. Se ha observado que la concentración relativa de las isoenzimas en las células, tejidos u órganos está determinada por las proporciones relativas de los polipéptidos sintetizados A y B; que a su vez, dependen de las proporciones relativas de la expresión de los genes estructurales A y B (Kahl, 1995; Sharma et al., 1997).

Las isoenzimas pueden detectarse después de separarlas unas de otras con métodos bioquímicos convencionales; por ejemplo con cromatografía de intercambio iónico, punto isoeléctrico o electroforesis con geles de poliacrilamida o almidón. Muchos trabajos se han reportado al respecto en los cuales los investigadores utilizan extractos totales de proteínas obtenidos de células o tejidos del organismo en estudio. Después de la electroforesis respectiva el gel se pone en contacto con un substrato cromogénico (específico para la enzima a detectar) y posteriormente, se podrá observar una banda coloreada que indica la actividad de la enzima y la localización de ésta en el gel. En algunas ocasiones se pueden observar diferentes bandas en un mismo carril, lo que hace referencia a la presencia de más de una forma de la isoenzima en el organismo analizado (Hoelzel, 1992). La posición en el gel depende del tamaño y la carga de la enzima. Las diferentes formas son los polimorfismos que se pueden usar para identificar y distinguir los individuos (las plantas).

Esta metodología es confiable y fácil de llevar a cabo, por lo que se ha utilizado para hacer caracterizaciones, e incluso, hasta inferencias genéticas de plantas; sin embargo, su uso se ha limitado en primer lugar, porque sus resultados no siempre se reproducen ya que dependen del estado de desarrollo y de las condiciones de los tejidos utilizados para

el análisis; y en segundo lugar, porque sólo es posible detectar una cantidad reducida de polimorfismos, lo que encarece el uso de la técnica (Winter y Kahl, 1995).

En el caso particular del cultivo de garbanzo, esta tecnología se ha utilizado para estudios de herencia y ligamiento genético entre loci de isoenzimas y genes de resistencia para ascochyta blight; y entre isoenzimas y caracteres morfológicos. En estos estudios, los autores encontraron que las isoenzimas reveladas muestran un patrón de expresión **codominante**; pero, algunos de sus resultados no fueron constantes ni claros (Kusmenoglu, et al., 1992; Kazan et al., 1993).

### **b) Marcadores de ADN**

Los análisis de ADN para la detección de polimorfismos representan otra alternativa para la búsqueda de diferencias entre los organismos. En este sentido, se han realizado bastantes estudios debido principalmente a las numerosas ventajas que ésta molécula ofrece. A diferencia de las isoenzimas, los polimorfismos de ADN son mucho más abundantes, prácticamente se podrían considerar como ilimitados; su expresión no es necesaria para su detección, no están influenciados por el ambiente y muchos marcadores pueden ser observados con un solo experimento. Actualmente muchas y variadas técnicas se han desarrollado con este propósito y a su vez nuevas estrategias de mejoramiento genético; el resultado de esos esfuerzos ha repercutido en el incremento disponible de marcadores para características agronómicas de interés en muchos cultivos (Phillips y Vasil, 1994; Winter y Kahl, 1995).

Las tecnologías para analizar genomas se han agrupado convencionalmente en tres categorías, cada una de ellas con diferentes características y niveles de sensibilidad para detectar marcadores de ADN: la primera de ellas está basada en hibridación molecular en donde se requiere de sondas específicas marcadas, como es el caso de los **RFLP** y los **VNTR** (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism y **V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats, por sus siglas en inglés respectivamente), como por ejemplo, los minisatélites y microsátélites; la segunda se basa en la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN con la tecnología de la **PCR** (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) que cuenta con una variedad amplia de metodologías; y la tercera corresponde a huellas obtenidas por la combinación en

diferente medida de las dos primeras, como podría ser el caso de las técnicas **RAMPO** (**R**andom **A**mplified **M**icrosatellite **P**olymorphisms), que requiere de amplificación con PCR e hibridación con secuencias que reconocen a microsatélites y la técnica de **AFLP** (**A**mplification **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms), que requiere de restricción previa del ADN y posterior amplificación con PCR (Phillips y Vasil, 1994; Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Ramser, et al., 1997).

Esta variedad de técnicas tiene ventajas y desventajas que pueden estar representadas por el grado de sensibilidad y la dificultad para su establecimiento (uso de radiactividad, tiempo y costos, principalmente); sin embargo, todas ellas han mostrado ser de gran utilidad en diferentes áreas del conocimiento; por ejemplo, en taxonomía para la ubicación adecuada de organismos de dudosa identidad; en medicina para la detección de enfermedades congénitas y diagnóstico de otras (como por ejemplo, el SIDA); en problemas jurídicos (pruebas de paternidad y medicina forense) y en agronomía (Maughan et al., 1995; Winter y Kahl, 1995; Pérez de la Vega, 1997; Hegstad et al., 1998; Berger y Minor, 1999). En el presente trabajo solamente se describirá la segunda estrategia utilizando algunos ejemplos.

Las diferentes metodologías citadas anteriormente, se han utilizado también para llevar a cabo algunos estudios con patógenos, principalmente para hongos; por ejemplo, en el garbanzo se han identificado marcadores útiles para su mejoramiento en el aspecto de resistencia genética a *ascochyta blight*, *fusarium wilt* y otros (Bierwerth et al., 1992; Udupa y Weigand, 1997; Udupa et al., 1998; Winter, 1997). De manera específica, Mayer y col. (1997), identificaron con PCR un marcador de ADN asociado a la resistencia para *fusarium wilt*, en una población de plantas resistentes y susceptibles a *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*. El marcador fue detectado después de utilizar 370 iniciadores aleatorios y comparar las bandas amplificadas entre las dos poblaciones; el resultado fue un fragmento de ADN presente solo en las plantas resistentes. Morjane y col. (1994), identificaron genes de virulencia y la amplia variación genética en poblaciones del hongo *A. rabiei* y estimaron la rapidez de cambios evolutivos drásticos que suceden en estos microorganismos con el uso de sondas de oligonucleótidos. Además, identificaron 12 haplotipos (juego de alelos involucrado en patogénesis) del patógeno en un solo

campo en Tunisia y han aportado datos que tratan de explicar el porqué de la resistencia que ofrece este hongo a diferentes sustancias químicas que se han utilizado para su control. Sus estudios indicaron que debido a la presión de selección y a la velocidad de respuesta del organismo, la tasa de mutación se ve incrementada en poco tiempo, por lo que la estrategia química no es del todo funcional para este caso.

Respecto a los estudios realizados con la finalidad de estimar la diversidad genética, se han utilizados tanto metodologías basadas en la PCR como técnicas basadas en hibridación. Por ejemplo, Udupa y col. (1998), demostraron que los marcadores de ADN fueron capaces de distinguir, la variabilidad dentro y entre los patotipos (variantes en patogenicidad dentro de un aislamiento) de *A. rabiei*, agente causante de la rabia en garbanzo; y además, fue posible ubicar los diferentes patotipos en varios genotipos.

Para el caso de plantas, Al-Zahim y col. (1997), utilizando RAPDs fueron capaces de estimar la variación genética en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) y de establecer su relación entre las variedades cultivadas y el progenitor silvestre *Allium longicuspis*. Los análisis respectivos permitieron separar a las especies en comparación con base a su morfología y conformar grupos de afinidad taxonómica.

## **PCR**

La PCR es una tecnología desarrollada en 1983 por Kary B. Mullis de la compañía Cetus en California y surge en la misma época que la de RFLP; mérito por el cual éste científico compartió en 1993 el premio Nobel de química (Rabinow, 1996).

Esta tecnología se ha utilizado ampliamente para tipificar genomas de diferentes especies, para realizar análisis filogenéticos (Delgado, 1999), para aislar genes específicos, para detectar alelos (Hoelzel, 1992; Innis et al., 1995), e incluso, se ha venido utilizando con gran éxito para el estudio de relaciones genéticas de especies extintas a partir del análisis del ADN de tejidos momificados o fosilizados (Pääbo, 1989).

La técnica de la PCR es muy sensible y para que se lleve a cabo con éxito, es conveniente considerar pocas moléculas del molde de ADN (en el orden de nanogramos); pero debido a esta propiedad, es fácil también amplificar secuencias de ADN exógeno (contaminantes) si no se toman las precauciones necesarias durante el establecimiento de la reacción (Rabinow, 1996).

El término PCR se aplica al mecanismo bioquímico usado para multiplicar *in vitro* fragmentos pequeños de ADN (no mayores de 5 kb en promedio). Para esto se requiere de ADN que sirva de molde, de moléculas de cadena sencilla conocidas como iniciadores o “primers”, de los cuatro desoxirribonucleótidos, dNTPs, (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), de la enzima ADN polimerasa, de cloruro de magnesio y del amortiguador apropiado. Para que la multiplicación ocurra, se requieren tres pasos esenciales: el primero consiste de una **desnaturalización**, en donde las cadenas complementarias del ADN se separan por calentamiento a 94°C para utilizarse posteriormente como moldes durante la síntesis; el segundo, en donde la temperatura se baja para permitir el **alineamiento** o pareamiento de los iniciadores a la secuencia reconocida; es decir, un complemento químico donde la temperatura utilizada dependerá del tipo de bases químicas que conformen el iniciador, lo que va en función de su longitud y del contenido de GC; y el tercero, una **extensión** o alargamiento de la molécula iniciadora mediante la adición de nucleótidos por parte de la enzima ADN polimerasa. Estos tres pasos se repiten varias veces en el termociclador automatizado (de 30 a 40 ciclos en promedio), de manera que en pocas horas se logran reproducir de manera exponencial millones de copias del fragmento de ADN delimitado por los iniciadores (ver Diagrama 1). Posteriormente, estos fragmentos amplificados se visualizan en un gel de agarosa o de poliacrilamida con técnicas comunes de tinción (Barrera et al., 1993; Rabinow, 1996).

Se han desarrollado variadas metodologías basadas en la PCR, tales como los **DAF** (ADN Amplification Fingerprinting), los **RAPD** (Random Amplified Polymorphic ADN), **MP-PCR** (Microsatellite-Primed PCR), **AMP-PCR** (Anchored Microsatellite-Primed PCR), **RAMP** (Random Amplified Polymorphic Microsatellite) entre otras; y la diferencia de cada una de ellas estriba en el tipo de iniciador que se utilice, ya que

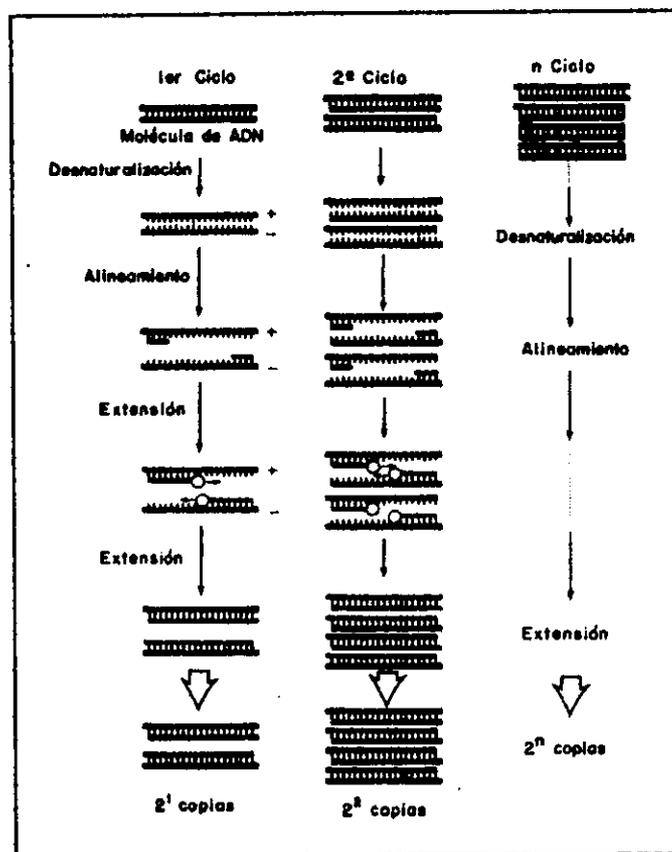
pueden ser aleatorias, semi-aleatorias o específicas y de diferentes longitudes. Cada una de éstas metodologías tienen convenientes e inconvenientes, que se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación de diferentes metodologías utilizadas en la PCR. En este cuadro se muestran las ventajas que representa la técnica de RAMP respecto al resto de las metodologías; sin embargo, también el uso de microsatélites como iniciadores de la PCR ofrecen una sensibilidad alta.

Propiedades de las metodologías	DAF (ADN Amplification Fingerprinting)	RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN)	MP-PCR/AMP-PCR (Microsatellite-Primed PCR)	RAMP-PCR (Random Amplified Polymorphic Microsatellite)
Tipo de polimorfismo	cambios a nivel de secuencia para el reconocimiento de los iniciadores	cambios a nivel de secuencia para el reconocimiento de los iniciadores	cambios en la longitud de la secuencia interna reconocida por un par de iniciadores (ISSR)	cambios en la longitud y en la secuencia de ADN reconocida por los iniciadores
Nivel de polimorfismo	alto	medio	alto	muy alto
Herencia (tipo de marcador)	dominante	dominante	codominante	dominante y codominante
Abundancia en el genoma	muy alta	baja	muy alta	muy alta
Calidad del ADN	relativamente puro	relativamente puro	relativamente puro	relativamente puro
Cantidad de ADN	20-100 ng	20-100 ng	20 a 100 ng	20 a 100 ng
Número de loci detectados	>10	1-10	>10	10-30
Tipo de iniciador	aleatorio	aleatorio	semi-aleatorio	Semie-específico + aleatorio
Longitud del iniciador (nucleótidos)	5-10	9-10	16-30	16-30 + 10
Concentración del iniciador ( $\mu\text{M}$ )	3-30	0.30	0.40	0.40 (microsatélite) 0.30 (aleatorio)
Temperatura de alineamiento	baja o alta	baja	alta	alta y baja
Dificultad técnica	media	baja	media	Alta
Radioactividad	si/no	no	si/no	si
Confiabilidad	media	media	alta	alta
Eficiencia	media	media	alta	alta
Costos de desarrollo	alto	medio	alto	alto

Para el caso de los DAF y RAPDs (plural de RAPD), los iniciadores son aleatorios; para MP-PCR éstos están basados en secuencias complementarias a microsatélites y para AMP-PCR los iniciadores son microsatélites con bases nitrogenadas adicionales en el extremo 5' llamadas anclas, que permiten una discriminación más específica de los fragmentos amplificados respecto a los obtenidos con MP-PCR. Con las dos últimas metodologías es factible hacer análisis de genomas bastante confiables; sin embargo, para identificar un gen o alguna secuencia específica, es necesario utilizar iniciadores diseñados a partir de las secuencias de bases nitrogenadas que definan a esta región en particular (Staub y Serquen, 1996; Kirby, 1992; Valadez y Kahl, 2000).

Diagrama 1. Secuencia de eventos que ocurren durante la reacción de polimerización en cadena (PCR).



La PCR consiste de la síntesis *in vitro* de fragmentos cortos de ADN sintetizados por una enzima ADN polimerasa termoestable a partir del extremo 3' de los iniciadores. En el diagrama se representan los 3 pasos que definen a esta tecnología: desnaturalización del ADN, alineamiento y extensión de los iniciadores. Tomado de Valadez E. y G. Kahl, 2000.

## RAPD

La técnica de **RAPD** ha sido una herramienta utilizada con más frecuencia para diferentes fines, entre los más comunes se encuentra la caracterización de genomas de plantas y para realizar diagnósticos fitosanitarios y médicos y el tipo de marcadores que detecta son **dominantes**. Esta metodología consiste en la síntesis *in vitro* de secuencias discretas de ADN, ubicadas entre dos moléculas iniciadoras **aleatorias** y complementarias a ciertas regiones de la cadena de ADN molde. El término aleatorio se refiere a que los iniciadores pueden reconocer cualquier parte del genoma; es decir, no van dirigidos hacia una secuencia particular como podría ser un gen o un microsatélite, sino que en función del orden de las bases nitrogenadas que lo conforman puede reconocer cualquier lugar, siempre y cuando encuentre su complementariedad química. La síntesis correspondiente produce fragmentos que pueden ser polimórficos entre los individuos que se comparen y la cantidad depende de dos eventos; de las veces que el iniciador haya encontrado su complemento químico en el genoma y de la distancia que exista entre ellos; en general se han reportado como máximo 10 fragmentos discretos por iniciador/genoma menores de 5 kb (Welsh et al., 1992; Winter y Kahl, 1995).

Los análisis con RAPD pueden ser de mucha utilidad cuando se requiere de establecer diferencias inter-específicas, e incluso intra-específicas, en diferentes cultivos; por ejemplo en *Dioscorea bulbifera* se lograron detectar polimorfismos entre los aislamientos de diferentes regiones únicamente con tres iniciadores (Ramser et al., 1996); se han utilizado para establecer relaciones genéticas en especies forestales, como los pinos (Furman et al., 1997), también se han utilizado para buscar genes de resistencia a *Pseudomonas* en jitomate para su posterior clonación (Staub y Serquen 1996), para tipificar el genoma de *A. rabiei* (Udupa et al., 1998) entre otras muchas aplicaciones.

Una de las supuestas desventajas que ofrecen la metodología para RAPD, ha sido la mínima o nula reproducibilidad de los resultados en diferentes laboratorios al comparar los mismos organismos; sin embargo, se ha demostrado que estos problemas son consecuencia principalmente de las impurezas que contiene el ADN y en segundo lugar, del tipo de termociclador y enzima ADN polimerasa que se utilice, por lo que la desventaja puede ser resuelta (Micheli et al., 1994, citado por Winter y Kahl, 1995).

Para el caso del cultivo de garbanzo, el uso de este método así como el de RFLP e isoenzimas, han mostrado una marcada ineficiencia para revelar polimorfismos, razón por la cual se ha recurrido a utilizar y/o diseñar otras estrategias para el análisis con ADN (Simon y Muehlbauer, 1997).

### MP-PCR

No siempre es factible encontrar polimorfismos y establecer diferencias entre los individuos utilizando iniciadores aleatorios. De hecho, en ocasiones para poder encontrar diferencias significativas, se requiere de ensayar con decenas o cientos de iniciadores para RAPD o utilizar otras alternativas que tengan la capacidad de detectar una mayor cantidad de fragmentos polimórficos. La dificultad de detectar un buen número de polimorfismos en el ADN ocurre principalmente con genomas que tienden a una homocigosis alta.

El análisis de secuencias repetitivas en el ADN, conocidas también como ADN satélite ha permitido detectar diferencias únicas propias del individuo; estas secuencias denominadas satélites, minisatélites y microsatélites, se encuentran seriadas en tandem dispersas por todo el genoma de organismos eucariontes. Las características de cada una de ellas se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clases del ADN repetitivo (Tomado de Krawczak y Schmidtke, 1998).

Clase	Grado de repetición por locus	Número de loci	Longitud de la unidad repetitiva
Satélite	$10^3$ a $10^7$	1-2 por cromosoma	De uno a varios miles
Minisatélite	10 a $10^3$	Muchos miles por genoma	9 a 100
Microsatélites	10 a $10^2$	Superior a $10^5$ por genoma dependiendo de la secuencia específica repetitiva (motif)	1 a 6

El término ADN satélite aplicado a las secuencias repetitivas, se debe a la separación de una banda de diferente densidad respecto a otra que contiene al resto del genoma durante el proceso de centrifugación en gradientes de densidad (por ejemplo, con CsCl). La diferencia de densidad de esta banda está dada por el contenido de GC/AT. Es conveniente aclarar que al ADN satélite al que aquí se refiere no es el mismo que se encuentra ubicado en los extremos de los cromosomas, conocidos como telómeros (Kahl, 1995).

El uso de secuencias complementarias a microsatélites, es una técnica que ha permitido detectar una mayor cantidad de polimorfismos en eucariontes. Los microsatélites se identificaron por vez primera en el genoma de humanos (Jeffreys et al., 1985 a y b), y posteriormente en los genomas de plantas y hongos patogénicos. Estudios en bases de datos revelan que la frecuencia y distribución de los microsatélites en plantas y en animales difiere considerablemente; por ejemplo se ha determinado que las plantas presentan en promedio 10 veces menos de estas secuencias comparada con humanos. El término microsatélite describe la organización repetida en serie de pequeños motivos de di, tri y tetranucleótidos, compartidos también con el ADN satélite y de minisatélites. Sin embargo, los diferentes tipos de secuencias repetidas difieren en muchos aspectos; por ejemplo, el ADN satélite está localizado normalmente en la heterocromatina, en las partes centroméricas de los cromosomas y se presume que intervienen en el apareamiento de los cromosomas o en la recombinación genética durante la meiosis. Los minisatélites son agrupamientos que se encuentran principalmente alrededor de los telómeros y por último, los microsatélites que no se encuentran agrupados en el genoma, sino dentro y adyacentes a regiones codificantes, es decir, de genes (Powell et al., 1996; Hüttel et al., 1997). La función que puedan tener los mini y microsatélites se desconoce a la fecha, aunque se les ha otorgado un papel importante en los procesos de evolución y se especula que la mayor parte de estas secuencias puede ser de tipo reguladora; pero la gran mayoría carecen de una función determinada (Moxon y Wills, 1999).

La principal ventaja que los microsatélites ofrecen para el análisis de genomas es su abundancia y dispersión en el ADN (Sharma et al., 1995), lo que permite detectar una mayor variación en regiones específicas para un *locus* particular y obtener huellas de

diferente longitud; es decir, "DNA fingerprints". Su utilidad práctica ha sido la identificación de variedades, cultivares y de líneas mejoradas; estimación de la relación genética entre organismos, caracterización de híbridos, introgresión de características de mejoramiento con retrocruzas, análisis de ligamiento y aislamiento de genes, determinación de relación familiar y variación genética, análisis de poblaciones y de pedigree e identificación forense (Senior y Heun, 1993; Weising et al., 1998).

En 1989, varios grupos de investigadores introdujeron la amplificación de secuencias de ADN utilizando a la PCR (Weising et al. 1998). La **MP-PCR** (**M**icrosatellite **P**rimed-**P**CR por sus siglas en inglés), también referida como **ISSR** (**I**nter-**S**imple **S**equences **R**epeats por sus siglas en inglés) fue utilizada por vez primera por Meyer y col. (1993) citado por Weising et al., 1998; quienes mostraron las diferencias en aislamientos y serotipos del hongo *Cryptococcus neoformans* patógeno de humanos. La MP-PCR utiliza como iniciadores de la PCR a oligonucleótidos sintéticos que complementen una parte de la región del genoma en donde se encuentre ubicado el microsatélite correspondiente; algunos ejemplos de esos iniciadores son (GATA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (TCC)<sub>5</sub>, (GTG)<sub>5</sub>, (GGAT)<sub>4</sub>, (CT)<sub>8</sub>, (CA)<sub>8</sub>, por citar algunos de ellos (Caetano-Anollés et al., 1991; Nybom et al., 1992; Kaemmer, et al., 1992; Poulsen et al., 1993).

Si los iniciadores de microsatélites se encuentran en el genoma colocados de manera inversa uno de otro dentro de la distancia amplificable, las secuencias inter-repetidas se amplifican (ISSR). La separación y detección de los productos y el análisis respectivo se lleva a cabo de la misma manera que para RAPDs. Esta estrategia produce patrones de bandeo multilocus que supera aquéllos producidos por las secuencias aleatorias y los marcadores que se obtienen son generalmente **codominantes** (Staub y Serquen, 1996; Weising et al., 1998). Los términos dominante o codominante, se utilizan para diferentes marcadores en función de su herencia a la descendencia. Cuando un progenitor presenta un marcador particular y el otro progenitor carece de él, la manifestación de dicho marcador se podrá apreciar en la descendencia F<sub>1</sub> o F<sub>2</sub> cuando se analiza el ADN de estos individuos con las mismas estrategias con las que se haya detectado dicho marcador en los progenitores (Staub y Serquen, 1996).

La diferencia entre utilizar microsatélites como iniciadores de la PCR en lugar de utilizarlos como sondas marcadas (**SSR**; *Simple Sequence Repeats*, por sus siglas en inglés), influye en el número de bandas detectadas. Lo anterior se debe a que en el primer caso, el número de fragmentos está dado por la cantidad de amplicones capaces de sintetizarse con el programa de termociclaje utilizado (un amplicón se define como cualquier secuencia de ADN capaz de sintetizarse mediante la PCR). En el segundo caso, el número depende de la cantidad de microsatélites complementarios a la sonda que se encuentren presentes en los fragmentos de ADN (Weising y Kaemmer, 1992; Wu y Tanksley, 1993; Udupa et al., 1999).

Los diferentes patrones de bandeo que se obtienen de los organismos, pueden traducirse a gráficas de árboles filogenéticos o dendrogramas con el uso de métodos estadísticos y programas de computación apropiados, lo que permite definir de manera más clara la relación que existe entre los individuos de una determinada población (Weising et al., 1995).

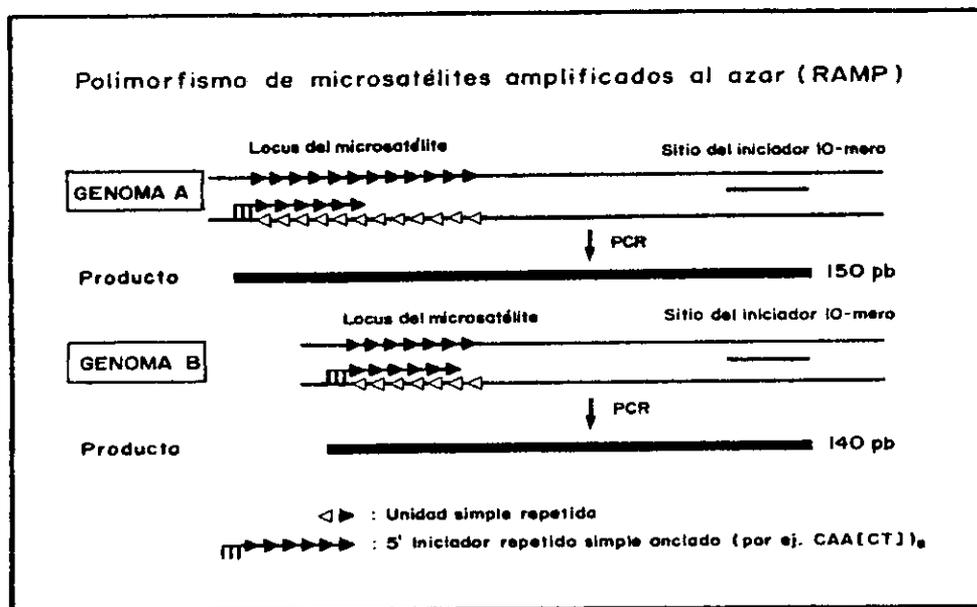
## **RAMP**

La técnica **RAMP** (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **M**icrosatellite por sus siglas en inglés) fue primeramente reportada por Wu y col. en 1994, y se utilizó para detectar polimorfismos en *Arabidopsis thaliana*. Esta variante utiliza dos tipos de secuencias iniciadoras, iniciadores de microsatélites anclados en el extremo 5' marcados con P<sup>33</sup>-dATP e iniciadores aleatorios de 10 bases (por ejemplo los iniciadores para RAPD, ver Diagrama 2. El programa de PCR utilizado por estos investigadores fue diseñado para que funcionara a altas y bajas temperaturas durante el alineamiento, por lo que se vieron favorecidos los microsatélites. Los productos amplificados se separaron en geles de poliacrilamida y los autorradiogramas revelados solo mostraron las bandas derivadas del microsatélite. Esta técnica fue capaz de detectar entre 10 y 20 bandas polimórficas por iniciador y de 2 a 7 alelos en 11 diferentes ecotipos de *Arabidopsis*. Estos fragmentos de ADN presentaron un comportamiento **codominante** cuando fueron probados en una segregación mendeliana. La metodología ha sido utilizada con éxito en cebada por Becker y Heun (1995) y por Sánchez de la Hoz y col. (1996), quienes incluso la usaron

pero sin radioactividad; y por Hüttel. (1996) en cultivares de garbanzo diferentes a los utilizados en la presente investigación (Weising et al., 1998).

Las huellas detectadas con oligonucleótidos como las descritas arriba, ofrecen varias ventajas sobre otras técnicas diseñadas para identificar marcadores, principalmente porque son muy sensibles, su repetibilidad es excelente y permiten analizar el genoma con una habilidad y rapidez considerables utilizando pocas sondas multilocus. La estabilidad mitótica de esta clase de huellas hace de la técnica una herramienta altamente exitosa para la discriminación e identificación inequívoca de cultivares de plantas y plantas propagadas, como es el caso de plantas de vid (Vignani et al., 1996). Sin embargo, también presentan algunas desventajas, incluyendo un protocolo de laboratorio relativamente complejo y la insuficiente información alélica que proveen los patrones multilocus de bandeo (Weising et al., 1998).

Diagrama 2. Técnica de RAMP



Esta técnica permite la síntesis de cualquier región genómica flanqueada por un microsatélite anclado y radioactivo en un extremo y un iniciador aleatorio en el otro. Las diferencias entre el genoma A y B (polimorfismos), son causadas por la reducción del número de las unidades del microsatélite (en este ejemplo se seleccionó el microsatélite [CT]<sub>n</sub>, la diferencia en este locus entre el genoma A y B es de 10 nucleótidos). Otras causas del polimorfismo pueden ser mutaciones en el sitio de unión del iniciador y/o en la región genómica ubicada entre los dos iniciadores. Tomado de Valadez y Kahl, 2000.

## 1.6 Diversidad genética medida por marcadores

Desde la década de los 80, países como Estados Unidos, Europa o la India por citar algunos, evalúan y analizan en detalle el germoplasma de cultivos importantes con el uso de métodos tradicionales (descripción morfológica) o con marcadores bioquímicos y/o de ADN con la finalidad de encontrar fuentes de resistencia a factores bióticos o abióticos; o para identificar alguna planta que contenga la información necesaria para mejorar alguna característica agronómica de interés (Udupa, et al., 1999; Moussa et al., 1996). Pero otra de las aplicaciones no menos importante que tienen los marcadores, ha sido la estimación de la diversidad genética del germoplasma y su relación con los materiales élite, sobre todo de aquellos a los que pertenecen cultivos sujetos a mejoramiento genético. La diversidad genética es un término que hace referencia a la variación del ADN entre y dentro de las especies y es causada por la selección, migración, deriva génica, mutación y recombinación; así como de varios eventos sexuales, por lo que las especies pueden presentar una amplia o estrecha variación en la secuencia química en sus cromosomas (Winter y Kahl, 1995).

Debido a las formas de selección antropocéntricas, las especies cultivadas normalmente presentan una variación genética muy restringida en comparación a la de especies naturales. En las especies cultivadas, el mejoramiento genético y la diversidad genética están muy relacionados, ya que la última es una determinante para el rendimiento y vulnerabilidad a presiones bióticas y abióticas.

Los análisis de la diversidad genética de una especie cultivada permite conocer y conservar la base genética de la especie, introducir fuentes nuevas de variación y estudiar factores que controlen características agronómicas de interés. El conocimiento de dicha variación favorece la acumulación de alelos deseables durante el proceso de fitomejoramiento. Esto es particularmente importante cuando se sabe que la variación genética del cultivo es reducida (Plaschke et al., 1995). Este conocimiento se utiliza para planear cruza para el desarrollo de líneas o híbridos que contengan características agronómicas importantes, en asignar líneas a grupos heteróticos y en la protección de variedades de plantas. La información anterior puede ser obtenida mediante el pedigree y datos de heterosis, a partir de características morfológicas o usando marcadores

moleculares con detección directa de la variación a nivel de secuencias de ADN. En particular los polimorfismos basados en ADN son una herramienta poderosa en la valoración de la similaridad genética entre los stocks de plantas utilizados para el mejoramiento (Chen et al., 1994; Pejic et al., 1998).

Las tecnologías basadas en el análisis de ADN han sido bastante utilizadas para estos estudios. Los RFLP han sido los más explotados en plantas; pero el desarrollo de las técnicas basadas en PCR y otras más finas como AFLP están jugando un papel muy importante en la búsqueda de polimorfismos (Pejic et al., 1998).

Algunos ejemplos de cultivares que se han analizados con el propósito de estudiar su variación genética utilizando marcadores de ADN, son el trigo (Plaschke et al., 1995); el trigo silvestre (Castagna et al., 1997); el maíz (Pejic et al., 1998); el ajo que es un cultivo estéril y propagado solo de manera vegetativa (Bradley et al., 1996; Al-Zahim et al., 1997); el sorgo (Yang et al., 1996); el garbanzo (Moussa et al., 1996); el frijol (Beebe et al., 1995), entre otros.

Estudios similares se han llevado a cabo para patógenos incluyendo *Sclerotinia scleroticum*, *Septoria tritici* y *Cryphonectria parasitica* y otros (Bierwerth et al., 1992; Udupa et al., 1998). Los estudios de diversidad genética de los patógenos junto con las pruebas de agresividad, proveen las bases para la detección anual de cambios en la distribución de patovares (término aplicado a poblaciones bacteriales que presentan mecanismos distintos de patogenicidad en condiciones naturales con referencia a su rango de hospedantes), que pueden ser utilizados en el pronóstico y prevención de futuras epidemias (Kaemer et al., 1992; Young et al, 1992; Winter y Kahl, 1995).

### **1.7 Análisis de datos moleculares**

Un patrón de huellas genéticas obtenido de una muestra de ADN particular, es raramente informativo por sí mismo, sobre todo si éstas huellas se han realizado para conocer la relación genética entre los individuos o la diversidad genética en una especie determinada. Para analizar esta información, es necesario comparar entre sí los patrones de bandas originados de las diferentes muestras. Estos patrones pueden ser evaluados a

simple vista y manualmente por el investigador o mediante métodos automatizados, por ejemplo, análisis de imágenes en computadora (Weising et al., 1995).

El análisis a simple vista de la longitud de los fragmentos y la determinación de su similitud, se hace frecuentemente mediante autorradiogramas o fotografías del gel con la ayuda de una regla transparente. Usualmente se nota la presencia o ausencia de un fragmento que migra en una posición particular, aunque también se puede obtener información adicional respecto a la intensidad de la banda. Para hacer esto, a las bandas individuales dentro de una línea en el gel, se les asigna una posición (esto es frecuentemente hecho por fragmentos indicadores del peso molecular) y diferentes líneas son simultáneamente analizadas por comigración de bandas del mismo tamaño (bandas iguales); sin embargo, esta técnica tiene algunos problemas y consideraciones generales asociadas con el tamaño del fragmento y el análisis simultáneo y se pueden cometer muchos errores, sobre todo si la cantidad de bandas en una línea son muchas, como es el caso de los AFLPs o de las huellas detectadas con microsatélites (Weising et al., 1995; Valadez y Kahl, 2000).

La otra alternativa es el análisis con métodos automatizados; se dispone de una cantidad considerable de ellos y su selección depende del objetivo de la investigación. Los sistemas automatizados pueden realizar análisis de tipo fenético y filogenético; los patrones fenéticos o también conocidos como taxonomía numérica, describen las diferencias y parecidos entre los organismos basándose en muchas características hereditarias (Karp et al., 1997).

La taxonomía numérica se puede definir como la evaluación numérica de la afinidad o similaridad entre unidades taxonómicas y el ordenamiento de éstas unidades dentro de taxa. Las unidades taxonómicas se refieren como OTU's (*Operational Taxonomic Units*, por sus siglas en inglés) que pueden representar a individuos, líneas, poblaciones, etc. Los métodos utilizados pueden casi siempre involucrar la conversión de información acerca de entidades taxonómicas a cantidades numéricas (Sokal y Sneath, 1963).

Para calcular la similaridad o distancia genética entre dos muestras (OTUs), se han descrito dos formas: la primera es con el uso de **PCO** (*Principal Coordinate Analysis*), **PCA** (*Principal Components Analysis*) o **MDS** (*Multi Dimensional Scaling*) que permiten producir un gráfico con muestras dispersas de dos o tres dimensiones. En este caso, la distancia geométrica entre las muestras de los grupos reflejan la distancia genética entre ellas con un mínimo de distorsión. La otra aproximación es la elaboración de un dendrograma (o diagrama de árbol) que liga a todos los grupos de muestras genéticamente más similares respecto a las muestras de los otros agrupamientos. Los agrupamientos son ligados uno a otro progresivamente hasta que todas las muestras quedan incluidas en un grupo único.

Todos los métodos anteriores son llamados métodos “fenéticos” y ellos están basados en las medidas de la distancia total de similaridad entre las muestras y las gráficas que producen se conocen como “fenogramas” (Karp et al., 1997).

Las matrices de similaridad están representadas en los dendrogramas; en donde el eje de la abscisa sirve solamente para separar los OTU's, mientras que la ordenada representa la escala del coeficiente de similaridad que usualmente va de cero a uno y, frecuentemente multiplicado por 100 o por 1000 para evitar los puntos decimales; los puntos de unión entre los tallos a lo largo de la escala significa el parecido entre los dos tallos que abarcan los individuos más relacionados. El dendrograma permite inferir relaciones filogenéticas a partir de los datos estadísticos u obtenidos con métodos matemáticos. La interpretación de los datos después del agrupamiento respectivo se deduce directamente de la gráfica o dendrograma resultado del análisis multivariado. Los agrupamientos de individuos pueden representar similitudes genéticas, biológicas, etc., dependiendo del objetivo que se pretenda resolver (Sokal y Sneath, 1963).

El índice de similaridad es calculado a partir del dato que muestra la banda de cada par de individuos de acuerdo a la fórmula:

$$S = 2 \times n_{ab} / (n_a + n_b)$$

Donde  $n_a$  y  $n_b$  representan el número total de bandas presentes en las líneas a y b respectivamente, y  $n_{ab}$  es el número de bandas que son mostradas por ambas líneas.  $S$  puede adquirir cualquier valor entre 0 y 1, donde “0” significa que “no existen bandas comunes” y el “1” significa “que los patrones son idénticos” (Weising et al., 1995).

La similaridad o distancia genética puede estimarse utilizando diferentes alternativas referidas como **coeficientes**. Por ejemplo el coeficiente de “Jacard”, el de “Simple Matching” o apareamiento simple, “Dice”, etc. Por ejemplo, el coeficiente de Jacard mide la similaridad tomando en cuenta solamente datos positivos, es decir, pares de bandas presentes en los organismos considerados en el estudio;

$$J_{ij} = C_{ij} / (n_i + n_j - C_{ij})$$

Donde  $C_{ij}$  es el número de datos positivos entre dos individuos, mientras que  $n_i$  y  $n_j$  es el número total de bandas en los individuos i e j respectivamente.

El coeficiente de apareamiento simple (Simple Matching), es equivalente al de Jacard, pero incluye datos negativos; es decir ausencia de bandas en el patrón de bandeo que se está comparando y se calcula con la fórmula siguiente:

$$S_{sm} = m / n = m / (m + u)$$

Donde  $m$  es el número de datos positivos (total de bandas),  $u$  es el número de datos negativos (número de no bandas) y  $n$  es el número total de individuos o muestras (Sokal y Sneath, 1963).

Los agrupamientos pueden conformarse con diferentes algoritmos (un procedimiento bien definido y rutinariamente aplicado, que permite dar solución a una clase particular de problemas matemáticos); algunos de los más ampliamente utilizados para medir la diversidad genética son el método del promedio o UPGMA (*Unweighted Pair Group Methods with Arithmetic Averages*), el método del vecino más cercano (*Neighbour-Joining Method*) y el método de Ward (*Ward's Method*). Estos métodos difieren en que

ellos no agrupan taxa relacionados por encima de un cierto criterio fijado (nivel del coeficiente de similaridad). Diferentes combinaciones de distancia genética/índice de similaridad y algoritmo de agrupamiento, pueden dar lugar a diferentes dendrogramas.

Los análisis estadísticos de huellas de ADN, tienen limitantes, por lo que los resultados son solamente aproximaciones, y las razones de estas limitaciones se basan principalmente en:

1. En ausencia de análisis de los progenitores, la identidad de las bandas de la descendencia se desconoce y puede haber error al asignar marcadores a un *loci* específico.
2. La presencia de una banda de peso molecular aparentemente idéntico en diferentes individuos no es evidencia de que éstos muestren el mismo fragmento homólogo, y
3. Las bandas únicas algunas veces pueden estar compuestas de varios productos de amplificación comigrantes.

Estas limitaciones pueden disminuirse si la calidad de los datos obtenidos en los análisis de ADN es satisfactoria; y para tener una mayor certeza de los resultados obtenidos, se recomienda utilizar un número mayor de muestras, como es el caso de cualquier otro sistema de análisis estadístico (Karp et al., 1997).

Por las razones mencionadas, el objetivo principal de esta investigación fue hacer un estudio para estimar la diversidad morfológica y de ADN de las colectas y variedades más importantes del germoplasma de garbanzo existente en México (de acuerdo a las sugerencias del CEVACU), con la finalidad de sentar las bases para que los fitomejoradores interesados en el cultivo, puedan utilizar líneas de garbanzo alternas a las que se han venido utilizando en las zonas garbanceras del país. De esta forma en un futuro a corto o mediando plazo, se podrán diseñar estrategias de mejoramiento que atiendan de manera dirigida y específica a problemas tales como los causados por los hongos *Fusarium* y *Rizoctonia*, principalmente.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo General

Estimar la variabilidad morfológica y genotípica mediante el análisis del ADN de 57 genotipos de la colección mexicana de germoplasma de garbanzo (*Cicer arietinum* L), con la finalidad de conocer nuevas alternativas que puedan utilizarse en las regiones garbanceras de nuestro país.

### Objetivos Particulares

1. Caracterizar morfológicamente a 57 genotipos de *C. arietinum* L. que constituyen parte de la colección de germoplasma existente en México.
2. Establecer la relación morfológica de los genotipos en estudio mediante un dendrograma.
3. Caracterizar genotípicamente el ADN de los 57 genotipos que conforman parte de la colección de germoplasma de garbanzo presente en México utilizando dos técnicas basadas en PCR (MP-PCR y RAMP).
4. Estimar la variabilidad genética de los genotipos en estudio mediante los polimorfismos morfológicos y de ADN detectados.
5. Establecer la relación morfológica y de ADN de las especies silvestres *C. reticulatum* y *C. cuneatum* con *C. arietinum* L.
6. Evaluar la capacidad de la caracterización morfológica y de ADN para la discriminación intra e inter-específica de los genotipos de *Cicer* considerados.

### III. MATERIALES

#### 3. 1 Especies vegetales

##### Genotipos de *C. arietinum* L.

Para llevar a cabo el presente estudio se consideraron 57 diferentes genotipos de garbanzo cultivado (*C. arietinum* L), que constituyen la colección principal del germoplasma existente en México. Las semillas fueron proporcionadas por el Campo Experimental del Valle de Culiacán (CEVACU) del Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Sinaloa, México. La relación de los genotipos, nomenclatura y origen se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Relación de genotipos, nomenclatura y origen de la colección mexicana del germoplasma de garbanzo utilizado (*Cicer arietinum* L.).

Colecta	Origen	Colecta	Origen
1. CUGA 95/96 - 3489	(VC-15) California	30. CUGA 95/96 3439	(ICC-12241) ICRISAT
2. CUGA 95/96 - 3469	(Misión) California	31. CUGA 95/96 3465	(ICC-12257) ICRISAT
3. CUGA 95/96 - 3408	(Lyons) California	32. CUGA 95/96 - 3511	(ICC-12437) ICRISAT
4. CUGA 95/96 - 3316	(ILC-136) ICARDA	33. CUGA 95/96 - 3453	(ICC-9001) ICRISAT
5. CUGA 95/96 - 3324	(ILC-35) ICARDA	34. CUGA 95/96 - 3416	(ICCV-5) ICRISAT
6. CUGA 95/96 - 3338	(ILC-98) ICARDA	35. CUGA 95/96 - 3375	(ICCV-3) ICRISAT
7. CUGA 95/96 - 3440	(ILC-3500) ICARDA	36. CUGA 95/96 - 3368	(ICC-11322) ICRISAT
8. CUGA 95/96 - 3592	(WR-315) ICARDA	37. CUGA 95/96 - 3604	(ICC-6366) ICRISAT
9. CUGA 95/96 - 3593	(BG-212) ICARDA	38. CUGA 95/96 - 3395	(ICC-12435) ICRISAT
10. CUGA 95/96 - 3594	(JG-62) ICARDA	39. CUGA 95/96 - 3426	(Unión) CEVACU
11. CUGA 95/96 - 3595	(Annigieri) ICARDA	40. CUGA 95/96 - 3434	(Dorado) CEVACU
12. CUGA 95/96 - 3596	(Chaffa) ICARDA	41. CUGA 95/96 - 3441	(1123Ga-62-2-3-M-M) CEVACU
13. CUGA 95/96 - 3597	(L-550) ICARDA	42. CUGA 95/96 - 3484	(1126Ga-L2V) CEVACU
14. CUGA 95/96 - 3598	(K-850) ICARDA	43. CUGA 95/96 - 3501	(Breve blanco) CEVACU
15. CUGA 95/96 - 3599	(C-104) ICARDA	44. CUGA 95/96 - 3312	(1131-CGa-1-1-M-1-M) CEVACU
16. CUGA 95/96 - 6000	(JG-74) ICARDA	45. CUGA 95/96 - 3319	(Macarena) CEVACU
17. CUGA 95/96 - 3315	(CPS-1) ICARDA	46. CUGA 95/96 - 3325	(Gordo Lechoso) CEVACU
18. CUGA 95/96 - 3340	(FLIP-83-100C) ICARDA	47. CUGA 95/96 - 3348	(Sonora-80) CEVACU
19. CUGA 95/96 - 3372	(FLIP-83-24C) ICARDA	48. CUGA 95/96 - 3356	(11GaC83-4-85-M-1-M) CEVACU
20. CUGA 95/96 - 3387	(FLIP-82-21C) ICARDA	49. CUGA 95/96 - 3357	(Kino) CEVACU
21. CUGA 95/96 - 3388	(FLIP-83-60C) ICARDA	50. CUGA 95/96 - 3360	(CUGA-134) CEVACU
22. CUGA 95/96 - 3426	(ILC-72) ICARDA	51. CUGA 95/96 - 3378	(Apolo) CEVACU 13
23. CUGA 95/96 - 3509	(ILC-202) ICARDA	52. CUGA 95/96 - Surutato-77	(Mutante) CEVACU
24. CUGA 95/96 - 3331	(7573-14-IP-14-BP-2C-M) ICRISAT	53. CUGA 95/96 - Mocorito-88	(S-77) CEVACU
25. CUGA 95/96 - 3418	(ICC-6304) ICRISAT	54. CUGA 95/96 - Blanco Sinaloa	(M-88) CEVACU
26. CUGA 95/96 - 3610	(K-1184-IC-M) ICRISAT	55. CUGA 95/96 - Progreso-95	(Blanco Sinaloa 92) CEVACU
27. CUGA 95/96 - 3310	(7573-74-IP-IP-BP-2CM) ICRISAT	56. CUGA 95/96 - Santo Domingo-82	(Progreso-95) CEVACU
28. CUGA 95/96 - 3443	(ICCV-93308) ICRISAT	57. CUGA 95/96 - WR-315	(Santo Domingo-82) CEVACU
29. CUGA 95/96 - 3487	(ICC-12435) ICRISAT		

CUGA 95/96: clave asignada por el CEVACU, México.

ILC: International Legume Chickpea accession number;

ICC: FLIP: Nombre o número asignado a la colección por parte de la organización donadora

**Nota:** del genotipo 1 al genotipo 38 corresponden a colectas provenientes de los bancos de germoplasma ICARDA e ICRISAT; del genotipo 39 al 57 son variedades obtenidas por el CEVACU mediante fitomejoramiento.

### **Especies de *Cicer* silvestres incluidas en el análisis.**

Dos especies de *Cicer* silvestres se incluyeron en la presente investigación: *Cicer reticulatum* y *Cicer cuneatum* que fueron suministradas por el ICARDA (International Center for Agricultural Research in Dry Areas) en Aleppo, Syria. La finalidad de incluirlas en el análisis respondió a la necesidad de utilizar grupos de comparación (mayor relación y menor relación genética respecto al cultivo en estudio), que serían necesarios posteriormente en la elaboración de los dendrogramas respectivos. La clave de identificación y el origen se indican a continuación:

**Cuadro 4.** Especies silvestres utilizadas, indicando su número de identificación internacional y origen (Singh et al., 1991).

<b>Especie</b>	<b>Colecta</b>	<b>Origen</b>
<i>Cicer reticulatum</i>	ILWC 129	Turquía
<i>Cicer cuneatum</i>	ILWC 37	Etiopía

**ILWC:** International Legume Wild Cicer accession number

### **3.2 Iniciadores utilizados en la técnica de PCR para el análisis molecular de los genomas.**

#### **a) Iniciadores utilizados para la técnica de MP-PCR (ISSR)**

Para establecer la técnica de MP-PCR se evaluaron los iniciadores de microsatélites: (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, (GGAT)<sub>4</sub>, (CA)<sub>8</sub> y (CT)<sub>8</sub> de Gibco-BRL. Todos ellos de orientación 5'-3'. Pero, solamente se utilizaron para la caracterización de ADN los iniciadores: (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub>.

#### **b) Iniciadores aleatorios evaluados para el establecimiento de la técnica modificada de RAMP**

En el Cuadro 5 se muestra la secuencia de bases que distingue al kit G de iniciadores aleatorios evaluados para establecer la técnica de RAMP modificado.

**Cuadro 5. Secuencia específica de bases nitrogenadas que constituyen el kit G de iniciadores aleatorios de la casa comercial ROTH.**

G-01 5'-CTACGGAGGA-3'	G-02 5'-GGCACTGAGG-3'	G-03 5'-GAGCCCTCCA-3'	G-04 5'-AGCGTGTCTG-3'
G-05 5'-CTGAGACGGA-3'	G-06 5'-GTGCCTAACC-3'	G-07 5'-GAACCTGCGG-3'	G-08 5'-TCACGTCCAC-3'
G-09 5'-CTGACGTCAC-3'	G-10 5'-AGGGCCGTCT-3'	G-11 5'-TGCCCGTCGT-3'	G-12 5'-CAGCTCACGA-3'
G-13 5'-CTCTCCGCCA-3'	G-14 5'-GGATGAGACC-3'	G-15 5'-ACTGGGACTC-3'	G-16 5'-AGCGTCCTCC-3'
G-17 5'-CGACCGACA-3'	G-18 5'-GGCTCATGTG-3'	G-19 5'-GTCAGGGCAA-3'	G-20 5'-TCTCCCTCAG-3'

**c) Iniciadores utilizados para la técnica modificada de RAMP (modificada por Valadez, M. E. para la presente investigación).**

Para la técnica de RAMP se utilizaron las siguientes combinaciones de iniciadores:

**Cuadro 6. Secuencia de iniciadores utilizados en la técnica modificada de RAMP.**

Pares de iniciadores	Secuencia de los pares de iniciadores
(GACA) <sub>4</sub> + ROTH G-02	(GACA) <sub>4</sub> + 5'-GGCACTGAGG-3'
(GACA) <sub>4</sub> + ROTH G-03	(GACA) <sub>4</sub> + 5'-GAGCCCTCCA-3'
(GACA) <sub>4</sub> + ROTH G-09	(GACA) <sub>4</sub> + 5'-CTGACGTCAC-3'
(GACA) <sub>4</sub> + ROTH G-10	(GACA) <sub>4</sub> + 5'-AGGGCCGTCT-3'
(GATA) <sub>4</sub> + ROTH G-02	(GATA) <sub>4</sub> + 5'-GGCACTGAGG-3'
(GATA) <sub>4</sub> + ROTH G-03	(GATA) <sub>4</sub> + 5'-GAGCCCTCCA-3'
(GATA) <sub>4</sub> + ROTH G-09	(GATA) <sub>4</sub> + 5'-CTGACGTCAC-3'
(GATA) <sub>4</sub> + ROTH G-10	(GATA) <sub>4</sub> + 5'-AGGGCCGTCT-3'

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Siembra en Invernadero

Con la finalidad de conocer la variación fenotípica de las diferentes líneas de garbanzo consideradas, se sembraron 5 semillas de cada uno de los genotipos en bolsas de plástico con capacidad de 3 kg cada una. El suelo utilizado fue húmico (suelo rico en materia orgánica) y previo a la siembra, se esterilizó con bromuro de metilo a la dosis de una libra/m<sup>3</sup>, con un tiempo de exposición al producto de 48 h y posterior ventilación por 48 h más, antes de utilizarlo. El riego se hizo 2 veces por semana, excepto durante la etapa de maduración del grano en donde se disminuyeron a una vez por semana. Los materiales se mantuvieron en las macetas hasta la producción de semilla; la evaluación de las características se realizó durante 3 ciclos consecutivos considerando el total de las plantas.

De las dos especies silvestres consideradas en el estudio, fue necesario sembrar una muestra de 10 semillas de cada una en las mismas condiciones en las que se sembraron las semillas de *C. arietinum*, con la diferencia de que las silvestres fueron escarificadas manualmente cuidando de que el embrión no se dañara; enseguida, las semillas se colocaron en una toalla de papel estéril humedecido con agua destilada y estéril durante 12 horas para estimular la germinación. Después, las semillas se transfirieron a macetas con suelo estéril manteniéndolas en el invernadero. Durante el desarrollo de las plantas se seleccionaron y evaluaron 6 características morfológicas de tipo monogénico que exhiben dos o más variantes (IBPGR, ICRISAT e ICARDA, 1993), y tienen la particularidad de mantenerse constantes independientemente de que se desarrollen en condiciones de invernadero o de campo (Duke, 1981); estas características fueron las siguientes: **hábito de crecimiento**: erecto, semi-erecto, arbustivo; **tipo de hoja**: simple o compuesta; **color de la corola**: azul, rosa, lila, blanca; **color de la semilla**: crema, café, café oscuro, negro; **forma de semilla**: angular (cabeza de carnero) chica, mediana o grande; redonda suave (con forma de chícharo) chica, mediana, grande; redonda irregular (cabeza de búho) chica, mediana, grande y **textura de semilla**: lisa, rugosa, tuberculada.

## 4.2 Obtención de ADN

Para la extracción de ADN de alto peso molecular se utilizaron folíolos verdes y sanos de cada genotipo. El protocolo que se utilizó fue el propuesto por Dellaporta et al., (1983) y consistió en los siguientes pasos:

1. Los folíolos obtenidos de una sola planta de cada uno de los genotipos considerados en el estudio, se lavaron con etanol a 70% durante 2 minutos.
2. Se pesaron 2.5 g del tejido vegetal, se congeló con nitrógeno líquido y se molió en un mortero limpio y estéril; posteriormente el tejido molido se transfirió a un tubo Corex limpio y estéril.
3. El tejido se mezcló con 20 mL del amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 50 mM; NaCl<sub>2</sub> 500 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM y SDS a 1.3 %) y el tubo Corex se incubó a 65 °C durante 10 minutos.
4. Posteriormente se adicionaron 6.6 mL de acetato de potasio 5M y el tubo se incubó en hielo durante 60 minutos.
5. Se centrifugó la suspensión durante 20 minutos a 4000 rpm (1431 g) a temperatura baja (4 a 10 °C).
6. Después de la centrifugación se retiró el sobrenadante y se transfirió lentamente a otro Corex que contenía 20 mL de isopropanol frío, el tubo se incubó nuevamente a -20 °C durante 60 minutos.
7. El ADN precipitado se colectó con un gancho de vidrio limpio y estéril y fue transferido a un tubo Eppendorf que contenía 700 µL de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM).
8. Se agregaron 4 µL de ARNasa (10 mg/mL) al tubo Eppendorf con la finalidad de eliminar las moléculas de ARN purificadas simultáneamente con el ADN y se incubó a 37 °C durante 1 a 2 h. La reacción se detuvo adicionando 75 µL de acetato de sodio 3M y 500 µL de isopropanol frío y se dejó precipitando nuevamente el ADN a 20 °C durante 2 h.

9. Se colectó nuevamente el ADN con un gancho de vidrio y la madeja se lavó con etanol a 80% (v/v).
10. El ADN se disolvió en 500  $\mu$ L de solución TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM).
11. El tubo Eppendorf con el ADN disuelto se mantuvo a 4 °C.

#### **4.3 Estimación de la pureza, calidad y cantidad del ADN obtenido**

Antes de utilizar el ADN para los análisis de PCR, fue necesario estimar su pureza, calidad y cantidad utilizando geles de agarosa y espectrofotometría. Los protocolos se describen a continuación:

##### **Pureza**

Una vez que el ADN estuvo disuelto, se estimó su pureza con un espectrofotómetro PERKIN-ELMER modelo Lambda BIO; para lo cual se hizo una dilución de 1:10 de ADN en agua destilada estéril y se leyó la absorbencia (DO) a 260 y 280 nm respectivamente, el valor obtenido en esta relación debe ser de 1.8 a 2.0, lo que indica que el ADN purificado está libre de proteínas (Sambrook et al., 1989).

##### **Calidad**

La estimación del grado de degradación que el ADN sufre durante la extracción no puede ser apreciado con espectrofotometría, por lo que normalmente se determina en geles de agarosa mediante la electroforesis de una alícuota de la muestra. Cuando la calidad del ADN es satisfactoria, en el gel se podrá apreciar una banda definida en la parte superior a poca distancia de los pozos; sin embargo, esta molécula puede fragmentarse y su apreciación en el gel corresponde a un barrido a lo largo del carril (parecido a una mancha), haciendo que la definición de la banda de alto peso molecular pierda su nitidez o no se aprecie, lo que indica que la calidad no es la adecuada. Para la estimación de la calidad del ADN de cada una de las muestras, se recurrió al siguiente protocolo:

## Protocolo

1. Para la electroforesis correspondiente se utilizó una cámara horizontal mediana (13 X 14 cm)
2. Se preparó gel con una solución de agarosa a 0.8 % en amortiguador TAE 1X (40 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM de acetato de sodio; 2 mM de EDTA).
3. El gel se cubrió con amortiguador TAE 1X, que sería también el amortiguador para la corrida.
4. A cada muestra de ADN se le adicionó 1/10 del vol. del amortiguador de carga 10X [0.1 % de azul de bromofenol (p/v); 0.1 % de xileno cianol (p/v); 40 % de glicerol y 60 mM de EDTA pH 8.0. El amortiguador de carga ayuda de dos maneras: contiene glicerol que hace a la muestra más densa que el amortiguador TAE, permitiendo que el ADN se quede en el fondo del gel; y debido a su color, es posible seguir el movimiento de las muestras durante la electroforesis.
5. Posteriormente las muestras de ADN se colocaron en los pozos respectivos en el gel, y en los extremos del mismo se colocaron 300 ng de marcador de peso molecular de 100 pb (PERKIN-ELMER), solamente para evidenciar la posición del ADN de alto peso molecular.
6. Se llevó a cabo la electroforesis a 80 volts y se suspendió cuando el colorante xileno cianol (colorante que migra junto con fragmentos de 4 a 5 kb) se encontraba aproximadamente a 2 cm del extremo inferior del gel.
7. Una vez que la electroforesis concluyó, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en amortiguador TAE 1X) durante 30 minutos en agitación suave, para que el ADN se tiñera.
8. El ADN se observó con luz UV y se documentó con el sistema Kodak Digital Science 1D 2.0.

## Cuantificación del ADN

La concentración del ADN obtenido se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración del ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = [\text{DO}_{260} \times 10 \text{ (factor de dilución)} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}] / 1000$$

Esta fórmula es general para la cuantificación de ácidos nucleicos, en donde una DO =1 corresponde aproximadamente a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN de doble cadena, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del ADN de cadena sencilla y de ARN y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de oligonucleótidos de cadena sencilla (Sambrook et al., 1989).

### 4.4 Caracterización del ADN con PCR

#### a) MP-PCR (ISSR) y selección de iniciadores

Los iniciadores de microsatélite inicialmente evaluados fueron (GGAT)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, (CA)<sub>8</sub>, y (CT)<sub>8</sub>, utilizando el ADN del genotipo 2 (ver Cuadro 1). La temperatura de alineamiento ( $T_M$ ) considerada en el programa de termociclaje fue de 48 °C, excepto para (GATA)<sub>4</sub> que fue de 40 °C. El cálculo de la  $T_M$  se estimó en base a la regla de Thein y Wallace para la hibridación de oligonucleótidos, donde se consideran 2 °C por cada par A-T y 4 °C por cada par G-C (Weising et al., 1995). Después de la evaluación respectiva, sólo se consideraron los iniciadores (GGAT)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, ya que dieron lugar a un patrón de fragmentos de ADN bien definido, respecto a los detectados con (CA)<sub>8</sub> y (CT)<sub>8</sub> que amplificaron una multitud de bandas de ADN no definidas, razón por la cual se excluyeron del análisis.

#### b) Selección de iniciadores aleatorios para el establecimiento de la técnica modificada de RAMP (modificada por Valadez, M. E. para la presente investigación)

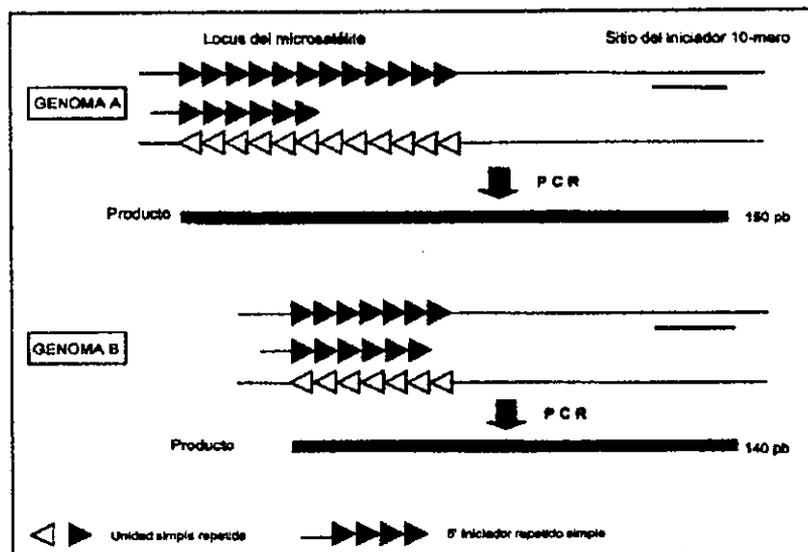
Varios trabajos indican que aún cuando en *C. arietinum* se aprecia variación morfológica, ésta no se refleja de forma marcada en polimorfismos bioquímicos o de ADN, por lo que se han considerado diferentes estrategias de análisis para estudiar su variabilidad genética. En pruebas preliminares realizadas en el laboratorio se evaluaron varios kits de 20 iniciadores de 10 bases de longitud de ROTH Company,

con la finalidad de detectar RAPDs en garbanzo, pero los polimorfismos encontrados fueron insignificantes, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (Simon y Muehlbauer, 1997). Sin embargo, cuatro secuencias pertenecientes al kit G (G-02, G-03, G-09 y G-10) se seleccionaron con base a su capacidad de amplificación para adaptar una metodología alternativa a la de RAMP reportada por Wu y col. en 1994.

### **c) Establecimiento de la técnica modificada de RAMP**

La modificación realizada en la presente investigación a la técnica original de RAMP (ver Diagrama 3), consistió en utilizar iniciadores de microsátélites sin ancla y sin marcaje radioactivo combinados con iniciadores para RAPDs y una temperatura de alineamiento intermedia entre las temperaturas óptimas requeridas por cada uno de los dos iniciadores por separado. La técnica original de RAMP (Diagrama 2) utiliza iniciadores de microsátélites marcados y con extensiones de bases nitrogenadas (anclas) y la temperatura de alineamiento favorece principalmente la amplificación de los microsátélites, por lo que los patrones de bandas que se obtienen corresponden solamente a fragmentos bordeados por el microsátélite en cuestión; además, para la separación y detección de sus productos de amplificación se utilizan geles de acrilamida y autorradiografías. La modificación realizada, al igual que la técnica original, permitió también la síntesis de diferentes regiones del genoma; pero sin peligro a la irradiación por radioisótopos, además, la separación de los productos amplificados se llevó a cabo en geles de agarosa normales que fueron teñidos con bromuro de etidio para la visualización de los fragmentos de ADN. El patrón de bandas obtenido para este caso, en principio debe contener a cuatro clases diferentes de fragmentos de ADN: microsátélite-microsátélite; microsátélite-RAPD; RAPD microsátélite y RAPD-RAPD, ya que el programa de termociclaje se desarrolló con una temperatura de alineamiento que favoreció la síntesis de todos ellos.

Diagrama 3. Técnica modificada de RAMP (modificada por Valadez, M. E. para el presente trabajo)



Representación esquemática de la técnica modificada de RAMP. Esta técnica también permite la síntesis de cualquier región de ADN. Los diferentes fragmentos que se sintetizan pueden ser polimórficos entre los genomas que se comparan y son causados por la pérdida o ganancia de bases nitrogenadas en la secuencia delimitada por los iniciadores.

Para establecer la técnica modificada de RAMP, se utilizaron los iniciadores G-01, G-02, G-09 y G-10 de la serie G de ROTH Company. Estos iniciadores normalmente amplifican a 35 °C produciendo marcadores RAPD; pero también fueron capaces de detectar polimorfismos a dos temperaturas diferentes de alineamiento (40 °C y 48 °C). Esta respuesta de los cuatro iniciadores aleatorios era crucial para poder ser combinados con los iniciadores seleccionados de microsatélites para el establecimiento de la técnica.

Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y documentados para su análisis posterior.

Los pares de iniciadores utilizados para la técnica de RAMP modificado conformados después de la selección fueron los siguientes: (GACA)<sub>4</sub> + ROTH G-02, (GACA)<sub>4</sub> + ROTH G-03, (GACA)<sub>4</sub> + ROTH G-09, (GACA)<sub>4</sub> + ROTH G-10, (GATA)<sub>4</sub> + ROTH G-02, (GATA)<sub>4</sub> + ROTH G-03, (GATA)<sub>4</sub> + ROTH G-09 y (GATA)<sub>4</sub> + ROTH G-10.

#### **d) Estandarización de las condiciones de reacción para PCR**

Con la finalidad de optimizar las concentraciones de algunos componentes en la reacción de amplificación para MP-PCR, se llevaron a cabo diferentes experimentos, donde se utilizaron distintas concentraciones de ADN molde (proveniente del genotipo 2), de la enzima ADN polimerasa (Gibco-BRL) y del  $MgCl_2$  (Gibco-BRL). El resto de los integrantes (dNTPs y concentración de iniciadores de microsátélites y aleatorios) se utilizaron de acuerdo a las indicaciones de la compañía (Gibco-BRL). Para determinar la concentración óptima de ADN se evaluaron inicialmente 20, 40, 60, 80 y 100 ng/reacción; para la enzima ADN polimerasa de *Taq* se consideraron 0.5, 1.0 y 1.5 U/reacción y para el  $MgCl_2$  se utilizaron desde 1 hasta 5 mM por reacción.

Después de la estandarización de las condiciones óptimas para la técnica de MP-PCR, el protocolo de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu$ L. La mezcla de reacción contenía 200  $\mu$ M de cada desoxirribonucleótido (dATP, dGTP, dADP y dCTP), 1 U de ADN polimerasa de *Taq*, amortiguador para la enzima [750 mM de Tris-HCl, pH 9.0; 200 mM  $(NH_4)_2SO_4$ ; 1% de TWEEN 20], 2 mM de  $MgCl_2$ , 50 ng de ADN y 20 ng del iniciador de microsátélite correspondiente. El volumen total de la mezcla de reacción se cubrió con 25  $\mu$ L de aceite mineral para evitar la evaporación durante el termociclaje.

La mezcla de reacción para la técnica de RAMP fue similar a la anterior excepto que se utilizaron 1.5 U de la enzima ADN polimerasa de *Taq*, 20 ng de los iniciadores  $(GACA)_4$  y  $(GATA)_4$ , combinados con 20 pmoles de cada iniciador aleatorio de ROTH. En todas las amplificaciones con PCR, fue incluido un control negativo, que contenía todos los componentes a excepción del ADN.

#### **e) Programas de amplificación para la PCR**

El ciclaje de las reacciones se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer modelo 480; el programa de amplificación utilizado tanto para MP-PCR como para la técnica modificada de RAMP está indicado en el Cuadro 7:

Cuadro 7. Condiciones utilizadas de termociclaje para la amplificación de ADN de Cicer con las técnicas MP-PCR y RAMP modificada. Las diferentes temperaturas de alineamiento fueron determinadas con base a la regla de Thein y Wallace (citado por Weising et al., 1995)

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	1	93 °C	1 minuto
Desnaturalización	40	93 °C	20 segundos
Alineamiento		40 °C* y 48 °C**	1 minuto
Extensión		72 °C	20 segundos
Extensión final		72 °C	6 minutos

\*temperatura de alineamiento para el microsatélite (GATA)<sub>4</sub>.

\*\*temperatura de alineamiento para los microsatélites (GACA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub>.

#### **f) Separación de los productos amplificados**

Una vez que el ciclaje concluyó (2.5 h aproximadamente), se retiró cuidadosamente el aceite mineral de cada uno de los tubos. Se utilizaron 13 µL de los 25 µL totales de la reacción para separar los productos amplificados por electroforesis, los 13 µL fueron mezclados previamente con 2 µL del amortiguador de carga.

La separación de los productos amplificados se llevó a cabo en una cámara horizontal de 12 X 24 cm modelo SONRISE™ 96 de Life Technologies y geles de agarosa SEPARIDE™ de Gibco-BRL al 2.2 % (este tipo de agarosa tiene la capacidad de resolver productos de amplificación de pesos moleculares de alrededor de 50 a 100 pb) preparada con TAE 1X; este mismo amortiguador también se utilizó durante el corrimiento. Para incluir todos los genotipos en el mismo sistema, el gel fue dividido en tres partes iguales. La colocación de las muestras en el gel estuvo de acuerdo al orden citado en el Cuadro 3. En los extremos del gel se incluyeron 2 marcadores de peso molecular, el de 100 pb que consta de 15 fragmentos cuyos pesos moleculares son 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 y 2072 pb; y otro más de 1000 pb que despliega 22 fragmentos con pesos moleculares de 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198 y 12216 pb, ambos de Gibco-BRL. Una vez concluida la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 30 minutos y se enjuagaron con agua destilada

durante 30 minutos más, manteniéndolos en agitación lenta, después se documentaron con el equipo Kodak Digital Science 1D 2.0.

#### **4.5 Análisis estadístico de los datos (morfológicos y moleculares) y elaboración de dendrogramas**

La estimación de la diversidad genética de los 59 genotipos (57 de *C. arietinum* y dos de especies silvestres) y el establecimiento de la relación genómica entre ellos, se llevó a cabo con los análisis estadísticos y dendrogramas respectivos, resultado de cada una de las estrategias utilizadas durante el análisis, para lo cual se llevó a cabo lo siguiente:

- a) Colección y codificación de datos del análisis morfológico y de los diferentes patrones de bandeo detectados con MP-PCR y RAMP modificado.
- b) Análisis de los datos usando una técnica estadística multivariada con el coeficiente de apareamiento simple (Simple Matching) y con el sistema de agrupamiento del método del promedio (UPGMA).
- c) Elaboración de una gráfica (dendrograma).

Solamente para ejemplificar la codificación binaria de los datos obtenidos en el análisis morfológico, se describe a continuación la caracterización de los genotipos 10 y 11; los descriptores correspondientes se codifican con los dígitos 0 y 1 para elaborar la matriz respectiva que servirá para la construcción del dendrograma correspondiente.

Ejemplo:

##### **Diferenciación fenotípica**

Genotipo	Hábito de crecimiento	Tipo de hoja	Color de la corola	Color de la semilla	Forma de la semilla	Textura de la semilla
10	Arbustivo	Compuesta	Lila	Café oscuro	Angular mediana	Tuberculada
11	Semi-erecto	Compuesta	Lila	Café oscuro	Angular chica	Rugosa

## Codificación de datos

Genotipo	Hábito de crecimiento			Tipo de hoja		Color de la corola				Color de la semilla				Forma de la semilla			Textura de la semilla		
	Erecto	Semi-erecto	Arbustivo	Simple	Compuesta	Azul	Rosa	Lila	Blanca	Cremá	Café	Café Oscuro	Blanca	Angular	Redonda Suave	Redonda Irregular	Lisa	Rugosa	Tuberculada
10	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
11	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0

Lo anterior significa que si una planta tiene el hábito de crecimiento arbustivo, entonces no tiene el hábito erecto o semi-erecto y el código sería el dígito "1" para la modalidad presente y el "0" para las otras dos alternativas, y así sucesivamente. La codificación de datos para el caso de las bandas de ADN obtenidas con los análisis moleculares, se lleva a cabo de la misma manera, considerando el dígito 1 cuando la banda está presente y el dígito 0 cuando está ausente.

Para elaborar los dendrogramas que permitirían estimar la diversidad genética, la relación entre los genotipos considerados y la capacidad de diferenciación inter e intra-específica, se realizaron cuatro matrices binarias de datos: una para la caracterización morfológica, otra para las huellas de MP-PCR, la siguiente para las huellas de ADN detectadas con la técnica modificada de RAMP y la última con los datos en conjunto de todas las técnicas.

El análisis multivariado se realizó utilizando el coeficiente de apareamiento simple o Simple Matching (Sokal y Sneath, 1963), puesto que se consideró importante tomar en cuenta los valores negativos; es decir, la ausencia de bandas o de características en los individuos que se estaban comparando; ya que además de estimar la relación entre las líneas de garbanzo cultivado, se pretendía conocer la diversidad genética de la población, por esta razón se consideró dicho coeficiente. Para el ordenamiento o agrupamiento de los datos, se utilizó el método del promedio UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), ya que permite establecer grupos o familias en estudios de diversidad genética.

Para la ejecución de los tres pasos anteriores se utilizó el programa NTSYSpc 2.0 que contiene todas las herramientas necesarias (Rohlf, 1997).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Características evaluadas en invernadero

El Cuadro 8 muestra la descripción morfológica de los 57 genotipos de *C. arietinum* y las dos especies silvestres, *C. reticulatum* y *C. cuneatum*. Las descripciones mostradas, corresponden a las diferentes variantes (características) de los 6 caracteres que se utilizaron como descriptores en este estudio. No se cuenta con una descripción morfológica previa de estos genotipos para establecer una comparación, a excepción del genotipo 52 (Surutato-77), 53 (Mocorito), 54 (Blanco Sinaloa) y 56 (Santo Domingo) reportados por Gómez-Garza y Paredes (1989) y Gómez-Garza (1994) y que coinciden en la mayoría de las características evaluadas.

Cuadro 8. Características morfológicas evaluadas en condiciones de invernadero de 57 genotipos de *Cicer arietinum* L. y dos especies silvestres de *Cicer*.

Genotipo/ característica	Hábito de crecimiento	Tipo de hoja	Color de corola	Color de semilla	Forma de semilla	Textura de semilla
1 K	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
2 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
3 K	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
4 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
5 K	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Lisa
6 K	Erecto	Simple	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
7 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
8 D	Arbustivo	Compuesta	Rosa	Café oscuro	Angular chica	Tuberculada
9 D	Arbustivo	Compuesta	Rosa	Café oscuro	Angular mediana	Rugosa
10 D	Arbustivo	Compuesta	Lila	Café oscuro	Angular mediana	Tuberculada
11 D	Semi-erecto	Compuesta	Lila	Café oscuro	Angular chica	Rugosa
12 K	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
13 D	Erecto	Compuesta	Lila	Café oscuro	Redonda suave	Lisa

					mediana	
14 K	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
15 D	Erecto	Compuesta	Lila	Café oscuro	Angular mediana	Rugosa
16 D	Erecto	Compuesta	Azul	Café oscuro	Angular mediana	Rugosa
17 D	Erecto	Compuesta	Blanca	Café	Angular chica	Rugosa
18 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Redonda suave mediana	Lisa
19 D	Erecto	Compuesta	Rosa	Negro	Angular mediana	Tuberculada
20 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Redonda suave chica	Lisa
21 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular chica	Tuberculada
22 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
23 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
24 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
25 K	Semi-erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
26 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Redonda suave mediana	Lisa
27 D	Erecto	Compuesta	Blanca	Café	Angular grande	Rugosa
28 K	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Crema	Angular chica	Tuberculada
29 D	Arbustivo	Compuesta	Lila	Café oscuro	Angular chica	Tuberculada
30 D	Arbustivo	Compuesta	Rosa	Café oscuro	Angular chica	Tuberculada
31 D	Arbustivo	Compuesta	Rosa	Café oscuro	Angular chica	Tuberculada
32 D	Arbustivo	Compuesta	Rosa	Café oscuro	Angular chica	Tuberculada
33 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Lisa
34 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular mediana	Rugosa
35 D	Erecto	Compuesta	Azul	Café	Redonda suave chica	Lisa
36 D	Erecto	Compuesta	Rosa	Café oscuro	Angular mediana	Tuberculada
37 K	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Crema	Angular chica	Rugosa
38 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
39 K	Erecto	Simple	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
40 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa

41 D	Arbustivo	Compuesta	Blanca	Café	Angular mediana	Rugosa
42 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
43 D	Arbustivo	Compuesta	Azul	Café	Angular mediana	Tuberculado
44 K	Erecto	Simple	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
45 K	Semi-erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
46 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
47 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Redonda suave grande	Lisa
48 K	Semi-erecto	Simple	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
49 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
50 D	Erecto	Simple	Blanca	Café	Angular grande	Rugosa
51 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Lisa
52 K	Erecto	Simple	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
53 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
54 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
55 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
56 K	Erecto	Compuesta	Blanca	Crema	Angular grande	Rugosa
57 D	Erecto	Compuesta	Rosa	Café obscuro	Redonda irregular mediana	Rugosa
<i>C. reticulatum</i>	Semi-erecto?	Compuesta	Rosa	Café obscuro	Angular mediana	Rugosa
<i>C. cuneatum</i>	Semi-erecto?	Compuesta	Lila	Café obscuro	Angular chica	Rugosa

**K: semillas tipo Kabuli**

**D: semillas tipo Desi**

## 5.2 Dendrograma del análisis morfológico de 6 caracteres monogénicos de *C. arietinum* L.

El dendrograma generado con el análisis del método del promedio (UPGMA) se muestra en la Figura 1. Esta gráfica se elaboró considerando 6 caracteres que en total generaron 25 diferentes variantes, que fueron: hábito de crecimiento (erecto, semi-erecto y arbustivo); tipo de hoja (simple o compuesta), color de corola (azul, rosa, lila y blanca); color de semilla (crema, café, café oscuro y negro); forma de la semilla (angular chica, angular mediana, angular grande, redonda suave chica, redonda suave mediana, redonda suave grande, redonda irregular chica, redonda irregular mediana, redonda irregular grande) y textura de la semilla (lisa, rugosa o tuberculada).

Los 59 genotipos caracterizados formaron 36 grupos totales con un coeficiente de 0.00. A este nivel el análisis morfológico no detectó diferencias entre los genotipos 2, 4, 7, 38, 56, 54, 53, 55, 49, 46, 40 y 42; 6, 39, 44 y 52 que se caracterizan por presentar el tallo erecto, hojas compuestas, flores blancas, semillas color crema de forma angular grande y de textura rugosa, y que son caracteres altamente deseables desde el punto de vista agronómico.

Los genotipos 3, 12 y 14 se diferencian de los anteriores en dos características, que son plantas de tallo arbustivo y el tamaño de la semilla que es angular mediano; mientras que los genotipos 22, 23, 24 y 34 tienen tallos erectos y semillas angulares medianas. Otro grupo lo representan los genotipos 18 y 26 que se diferencian de los anteriores por tener semillas redondas suaves de tamaño mediano y con textura lisa; el grupo siguiente lo conforman los genotipos 8, 30 y 32 que presentan tallo arbustivo, flores rosas, semillas de color café oscuro de tamaño angular chica y de textura tuberculada; y finalmente, los genotipos 11 y *C. cuneatum* que se agrupan por tener tallos semi-erectos, flores lilas, semillas café oscuro, de forma angular chica y rugosas, lo que probablemente indique una relación genética muy estrecha.

Con un coeficiente de alrededor de 0.30, se pueden apreciar también 20 grupos principales; y con un nivel de 0.42, 10 grupos diferentes. De manera bastante clara se definen con valores de 0.61 dos grupos principales; el mayor de ellos abarca todas las

muestras tipo Kabuli y el otro contiene a las muestras tipo Desi incluyendo las dos especies silvestres (ver Cuadro 8).

Quizá las características morfológicas que tienen los genotipos que conforman el grupo Kabuli en la Figura 1, son las adecuadas para las condiciones de cultivo que existen en México, puesto que se han considerado principalmente en los programas de fitomejoramiento. Por ejemplo, las variedades Mocerito (genotipo 53) y Blanco Sinaloa (genotipo 54), que están incluidas en el grupo mayor presentan dichas características morfológicas; así como la variedad Surutato-77 (genotipo 52), que es muy parecido a las dos variedades mencionadas a excepción de que presenta hoja simple. Estos tres genotipos, además, se han seleccionado por estar asociados a otras características, como es su calidad y aspecto de la semilla, productividad, tiempo de cocción y resistencia o tolerancia a enfermedades como la rabia (Gómez-Garza y Paredes 1989 y Gómez-Garza, 1994).

Cabe resaltar que los genotipos 50, 17, 27 y 41 que se caracterizan por ser Desi, se mantienen dentro del grupo principal Kabuli; ésto puede responder a la posibilidad de que los fitomejoradores o de manera natural se hayan realizado cruzamientos entre ambas clases de garbanzo, y posterior selección de líneas o cultivares con características de Kabuli, pero con semillas de color oscuro. La ubicación de las especies silvestres dentro del grupo de los genotipos Desi, se debe principalmente a que comparten características morfológicas tales como el color y la forma de la semilla con ese grupo de garbanzo cultivado. La especie *C. reticulatum*, que es la especie de mayor relación genética con *C. arietinum* (Ahmad y Slinkard, 1992; Robertson et al., 1995), no logra separarse del grupo; pero *C. cuneatum*, aún cuando está dentro del grupo Desi, sí se mantiene alejado del resto con una interacción cercana a 0.50, lo que significa que tiene un menor parentesco con las dos especies anteriores.

Con base al tipo de agrupamientos en este dendrograma de la Figura 1, se puede considerar que la caracterización morfológica realizada, definió de manera clara los dos grupos de garbanzo presentes en México, el grupo Desi y el grupo Kabuli; pero no fue capaz de establecer una diferenciación inter-específica más fina. El hecho de que algunos genotipos Desi (50, 17, 27 y 41) no logran separarse del grupo de Kabuli,

seguramente se debió a que la cantidad de caracteres morfológicos considerados en el análisis fue mínimo (25 alternativas de 6 caracteres codificados posiblemente por 6 pares de genes); sobre todo si se considera el gran número de descriptores que la literatura cita para este cultivo (más de 100), que toman en cuenta desde datos sobre el lugar de origen e información agronómica, hasta el comportamiento fisiológico de la semilla en condiciones de almacenamiento (IBPGR, ICRISAT e ICARDA, 1993).

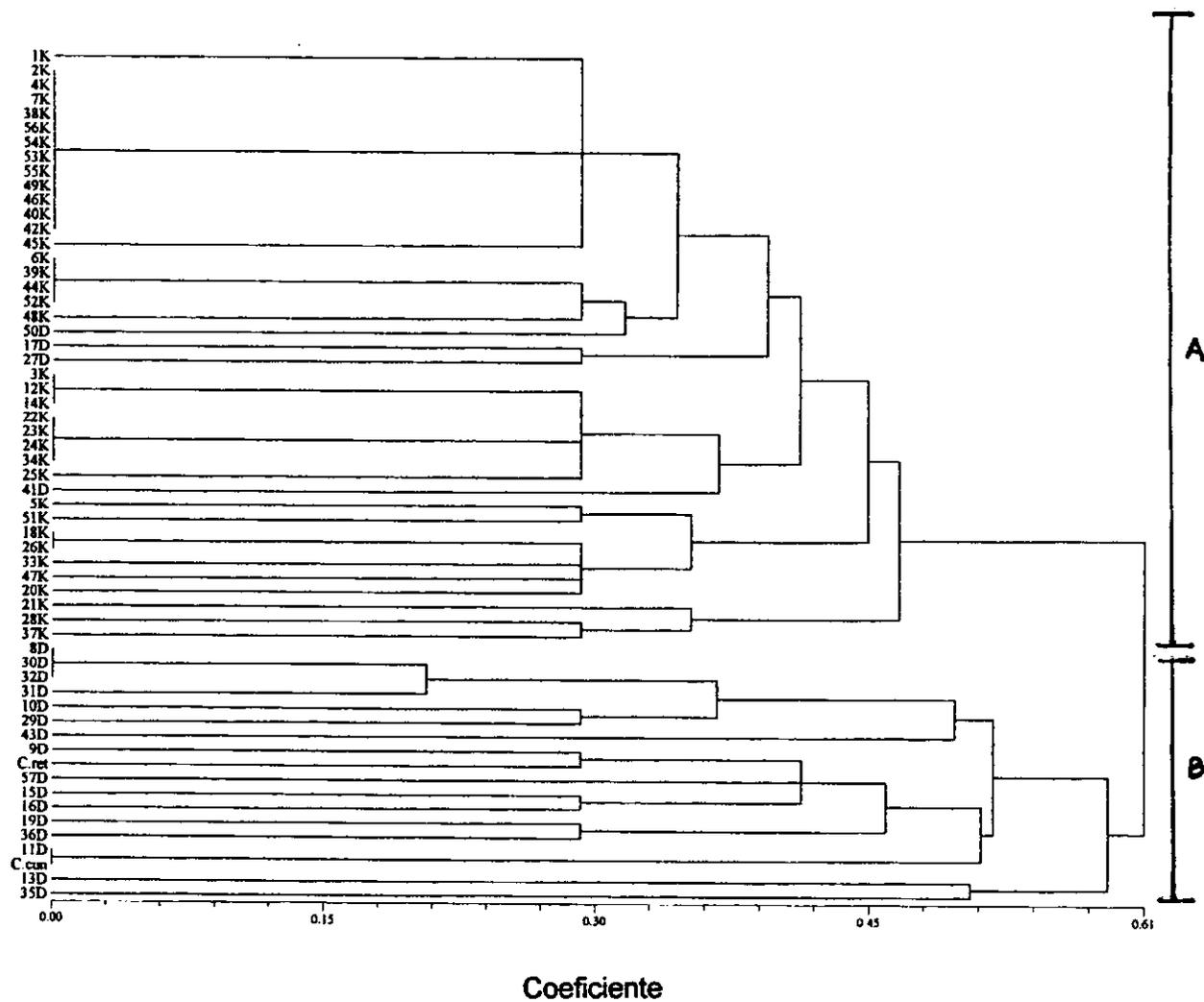


Figura 1. Relación morfológica de los genotipos estudiados de *Cicer*.

En esta gráfica se pueden apreciar 2 grupos definidos con un coeficiente de 0.61; el grupo A que representa al garbanzo tipo Kabuli (K) y el grupo B que contiene al grupo Desi (D), respectivamente; ambos presentes en la colección mexicana de germoplasma. Notar que las especies silvestres *C. reticulatum* (C. ret) y *C. cuneatum* (C. cun) se mantienen agrupadas con los genotipos Desi.

### 5.3 Obtención de ADN

El ADN purificado de los 57 genotipos de *C. arietinum* L. presentó valores que fluctuaron entre 1.7 y 1.8 obtenidos de la relación 260/280 cuando se estimó la pureza del mismo, lo que indicó que ésta era aceptable. El rendimiento obtenido a partir de 2.5 g de tejido procesado fue de 3 µg a 5 µg /µL, indicando que el protocolo empleado es eficiente. Para el caso de las dos especies silvestres, la cantidad fue proporcional a la obtenida con los genotipos de *C. arietinum*, pero el rendimiento fue mucho menor debido a que el tejido que se procesó fue poco (0.5 gr); sin embargo, la cantidad fue suficiente para la investigación; por esta razón se decidió no incluirlas en el gel para la evaluación respectiva.

En la Figura 2 se muestra la fotografía del gel que contenía muestras de ADN de los 57 genotipos de *C. arietinum*; la electroforesis se llevó a cabo para estimar la degradación que pudo haber sufrido la molécula durante el proceso de extracción. Se puede notar en el gel la presencia de dos bandas por carril; una ubicada dentro de los pozos y que hace referencia a proteínas purificadas también durante el procedimiento de extracción de ADN; y la otra que corresponde al ADN de alto peso molecular, que tiene la capacidad de migrar al interior del gel. Cabe hacer notar que la presencia de proteínas se debió a que no se aplicó ningún tratamiento para eliminarlas, ya que para los protocolos de análisis, no era necesario.

El barrido que se aprecia en algunos carriles es ADN fragmentado, que como se puede notar, es mínimo; esta calidad de la molécula es aceptable para el establecimiento de las dos técnicas que se tenían contempladas para la PCR (Valadez y Kahl, 2000). El marcador de peso molecular utilizado en este caso en particular, no fue el más apropiado, ya que su escala es muy reducida; además el total de los fragmentos que lo conforman no se aprecian por que el tiempo de corrimiento de las muestras fue mínimo, pero su función en el gel fue solamente para evidenciar la posición del ADN de alto peso molecular.

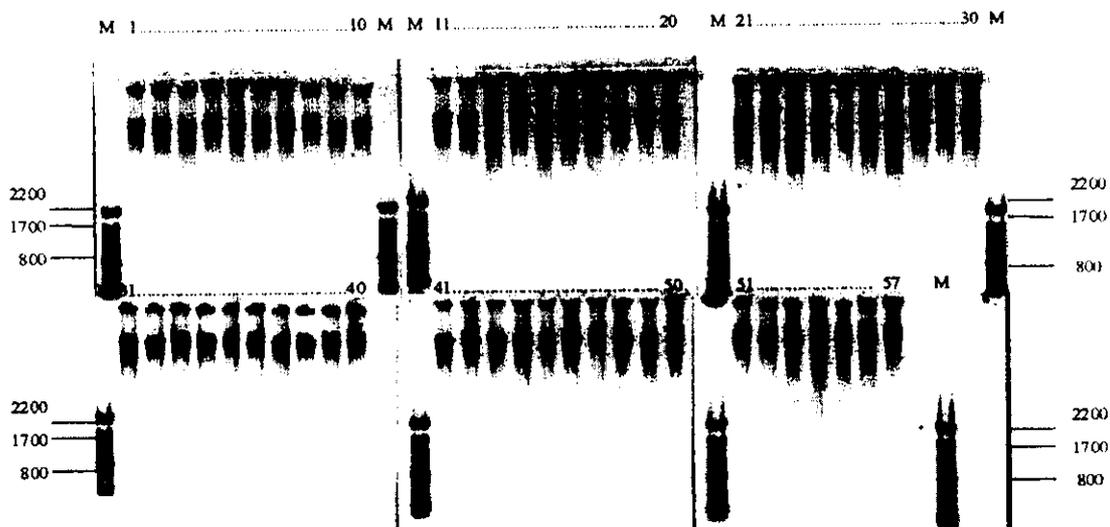


Figura 2. ADN de alto peso molecular obtenido de folíolos de 57 genotipos de *Cicer arietinum* L.

Muestras de ADN de alto peso molecular de los genotipos de *C. arietinum* L. Cada carril contiene 3  $\mu$ g de la molécula. En el panel superior están colocados los 30 primeros genotipos de la colección y el panel inferior contiene los genotipos restantes (ver Cuadro 3). El marcador de peso molecular (M) está ubicado en los extremos de los geles y está expresado en pares de bases (pb).

## 5.4 Caracterización molecular del ADN con PCR

### 5.4.1 MP-PCR (ISSR)

Para el establecimiento de la técnica de MP-PCR, inicialmente se evaluaron cinco iniciadores de microsatélites utilizando el DNA del genotipo 2 (CUGA 95/96 – 3469) de *C. arietinum*. Los iniciadores fueron (CA)<sub>8</sub>, (CT)<sub>8</sub>, (GGAT)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub> y (GATA)<sub>4</sub>, todos ellos con dirección 5'-3'. Los resultados de esta primer estimación se muestran en la Figura 3, en donde se puede apreciar que (CA)<sub>8</sub> y (CT)<sub>8</sub> exhiben un bandeo abundante y difuso; mientras que los iniciadores (GGAT)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub> y (GATA)<sub>4</sub> fueron capaces de detectar productos de amplificación definidos con 0.5 y 1.0 U de DNA polimerasa, razón por la cual se seleccionaron para realizar los análisis de MP-PCR. Cabe hacer notar que aún cuando el microsatélite (GGAT)<sub>4</sub> detectó tres bandas

definidas, también mostró una gran cantidad de bandas inespecíficas, dada la cantidad de barrido apreciado en la fotografía.

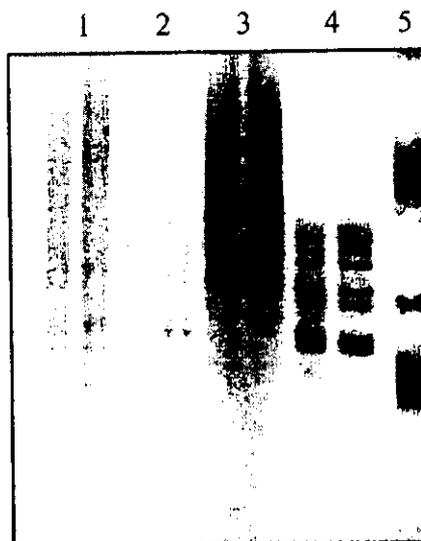


Figura 3. Huellas genómicas del genotipo 2 de *Cicer arietinum* L. detectadas con MP-PCR

Carril 1: (CA)<sub>8</sub>; carril 2: (CT)<sub>8</sub>; carril 3: (GGAT)<sub>4</sub>; carril 4: (GACA)<sub>4</sub> y carril 5: (GATA)<sub>4</sub>. Notar el intenso barrido en los carriles 1, 2 y 3 principalmente, lo que hace referencia posiblemente a la abundancia de fragmentos sintetizados con esos iniciadores y que difieren en su longitud en pocas bases nitrogenadas. Sin embargo, el carril 4 presenta bandas de ADN perfectamente definidas, seguido del carril 5 y del carril 3.

Se ha reportado que el uso de microsatélites compuestos por dinucleótidos marcados para sonda o como iniciadores de la PCR tienen la desventaja de producir agrupamientos de bandas cuya diferencia está dada por pocas bases (Weising et al., 1995), de allí posiblemente el barrido observado con los microsatélites (CA)<sub>8</sub> y (CT)<sub>8</sub>; este efecto también se presentó con el iniciador (GGAT)<sub>4</sub> aunque en menor proporción (ver Fig. 3). Lo anterior se puede explicar si se considera que los organismos superiores contienen una cantidad bastante considerable de microsatélites diferentes a lo largo de su genoma (Weising et al., 1995; Hüttel et al., 1999); y la técnica de PCR permite detectar abundantes fragmentos delimitados por el iniciador de microsatélite en cuestión, los cuales no logran separarse lo suficiente en geles de agarosa, dada la diferencia mínima

de peso molecular entre ellos, lo que ocasiona el barrido observado en esta misma figura.

### **Detección de huellas genómicas con MP-PCR utilizando los iniciadores (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub>**

La amplificación de microsatélites con PCR ha sido aplicada con éxito en el análisis de genomas de plantas. Su utilidad se ha demostrado en la caracterización de individuos, e incluso se ha utilizado para demostrar la individualidad en los organismos. Los resultados de esos estudios han originado una extensa base de datos que demuestra la relativa abundancia de diferentes “motifs” (unidades de secuencias específicas de bases nitrogenadas en un orden definido) de microsatélites y la relativa facilidad con la que este tipo de estrategia revela diferencias a nivel intra e inter-específico; además porque su manipulación y establecimiento en el laboratorio es fácil de realizar, ya que no se requiere de radioactividad (Yang et al., 1996; Weising et al., 1998; Hüttel et al., 1999).

Uno de los factores críticos que pueden afectar los resultados cuando se utilizan microsatélites como iniciadores, es la temperatura de alineamiento ( $T_M$ ) que se utilice durante el termociclaje; por lo que es indispensable el cálculo particular para cada iniciador. En este sentido, lo anterior ha sido corroborado por Weising et al. (1995), quienes detectaron una gran cantidad de bandas en *C. arietinum* al utilizar iniciadores con alto contenido de GC y  $T_M$  de 36 °C, pero al utilizar temperaturas de 40 o 42 °C con los mismos iniciadores, los patrones de bandeo obtenidos fueron reproducibles y más precisos.

Con base a lo anterior, las temperaturas de alineamiento ( $T_M$ ) utilizadas en la presente investigación fueron de 48 °C para los iniciadores (GACA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub> y de 40 °C para (GATA)<sub>4</sub>.

En la Fig. 4, 5 y 6 se muestran las huellas de ADN obtenidas con los iniciadores (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub>, respectivamente.

El microsatélite (GACA)<sub>4</sub>, Figura 4, fue capaz de detectar 11 fragmentos en *C. arietinum* que están distribuidas desde 2085 pb hasta 863 pb, de los cuales cuatro fueron polimórficos con pesos moleculares de 1331, 1290, 1224 y 1123 pb.

*C. reticulatum* aún cuando comparte prácticamente todas los fragmentos del garbanzo cultivado, presentó cuatro de menor peso molecular, mientras que *C. cuneatum* comparte cuatro bandas de ADN con el garbanzo cultivado y difiere en una de aproximadamente 500 pb con *C. reticulatum*. El patrón de huellas de ADN mostrado en esta figura, permite ver claramente la relación cercana que mantiene *C. reticulatum* con *C. arietinum*, haciéndose evidente también, que *C. cuneatum* es una especie con menos relación genómica (Ahmad y Slinkard, 1992; Robertson et al., 1995).

**Nota:** Cabe hacer notar que en algunas figuras no es posible apreciar todos los fragmentos y polimorfismos referidos, debido a que el análisis de las imágenes se hicieron de manera directa en la computadora con el programa Kodak Digital Science 1D 2.0, y muchas de las veces la diferencia no es posible apreciarla en la figura correspondiente; sin embargo, en estos casos los polimorfismos más contrastantes están señalados con una flecha.

Las huellas detectadas por el microsatélite (GATA)<sub>4</sub>, Figura 5, no muestran aparentemente polimorfismo alguno en la única banda de ADN amplificada con peso molecular aproximado de 1250; por lo que se podrían considerar como bandas monomórficas. *C. reticulatum* mostró cuatro bandas de ADN, de las cuales solamente la tercera correspondió de manera clara a la detectada en el garbanzo cultivado; sin embargo, existen otras pero no tan definidas en el cultivo ubicadas entre 2035 y 1500 pb, que podrían corresponder a las presentes en *C. reticulatum*.

Los aparentes barridos en las zonas mencionadas, sugieren que el o los iniciadores utilizados (no solo para ésta técnica en particular, sino de manera generalizada para la PCR) no complementan en un 100% las secuencias blanco del ADN (secuencias complementarias a los iniciadores), por lo que el apareamiento del iniciador podría presentar “huecos” y dependiendo del porcentaje de bases no apareadas, los cambios drásticos de temperatura que ocurren durante el programa de amplificación pueden

causar amplificaciones inespecíficas (Weising et al., 1992). El hecho de que los iniciadores no complementen de manera total, sugiere cambios de las bases en la cadena molde de ADN reconocida por los iniciadores, causadas seguramente al paso de la evolución; de ahí el hecho de que estén presentes en la especie silvestre y no en la cultivada. Por otro lado, la ausencia de bandas de *C. cuneatum*, indica la nula relación al menos con este microsatélite, con las dos especies relacionadas.

El microsatélite (GGAT)<sub>4</sub> detectó en el garbanzo cultivado cinco fragmentos de diferentes pesos moleculares, desde 2100 hasta 1300 aproximadamente (Figura 6). Los polimorfismos mostrados por este iniciador corresponden a bandas de pesos moleculares de 1700, 1600 y 1500 de algunos genotipos. Las dos especies silvestres analizadas con este mismo iniciador muestran un total de 13 fragmentos; la mayoría de ellos no son nítidos, pero fueron detectados por el sistema analizador de geles. Algunas de esas bandas tuvieron pesos moleculares inferiores y no mantienen mucha similitud con *C. arietinum*.

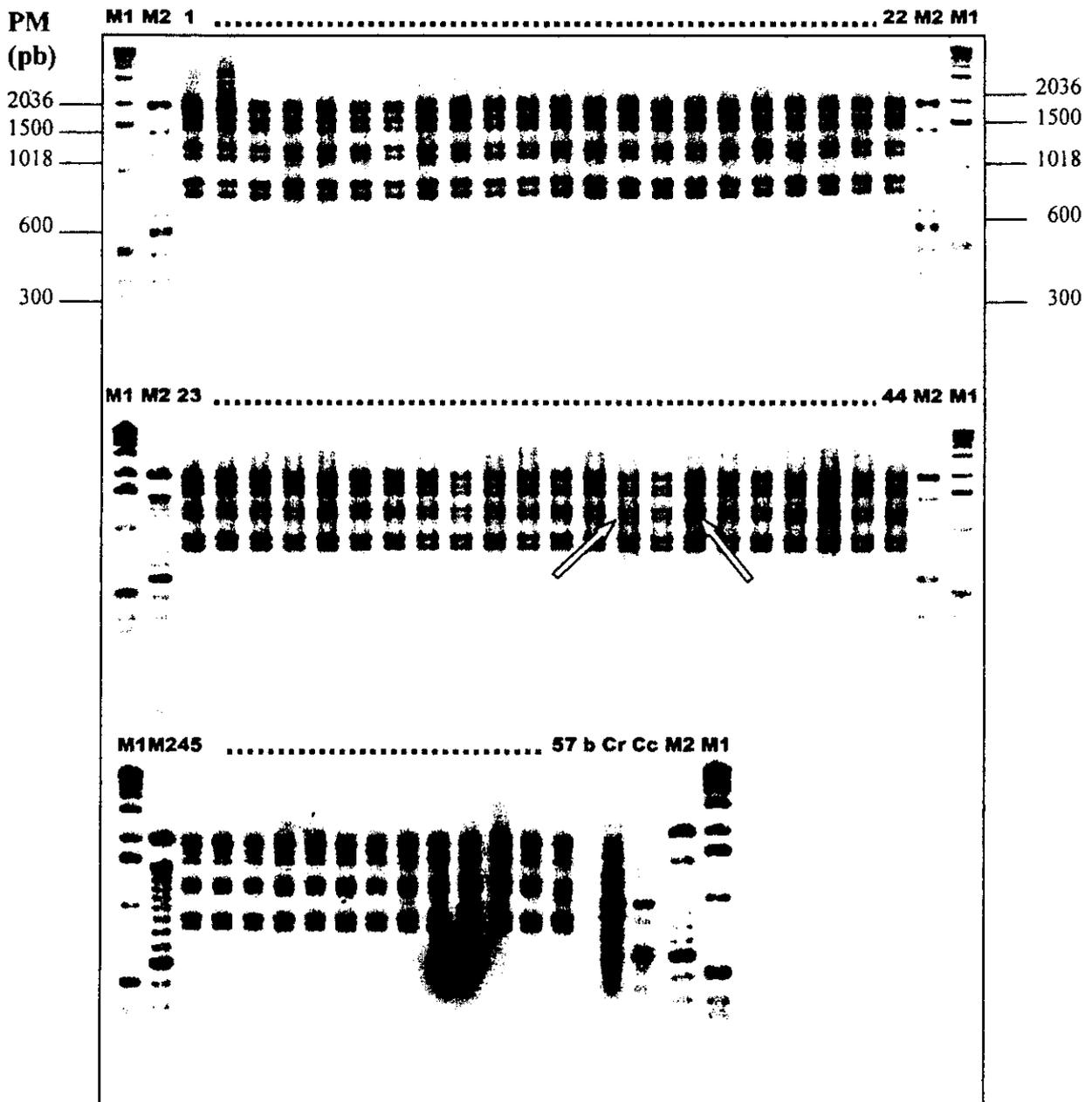


Figura 4. Huellas de ADN de tres especies del género *Cicer* detectadas con el microsatélite  $(GACA)_4$  con la técnica MP-PCR.

Esta figura muestra los diferentes fragmentos y polimorfismos de ADN obtenidos en los 57 genotipos de *C. arietinum* L., además de las dos especies silvestres *C. reticulatum* (Cr) y *C. cuneatum* (Cc). Las flechas señalan dos de los polimorfismos perfectamente distinguibles. Se incluyeron en el gel dos marcadores de diferente peso molecular colocados en los extremos, M1 de 1 kb y M2 de 100 pb.

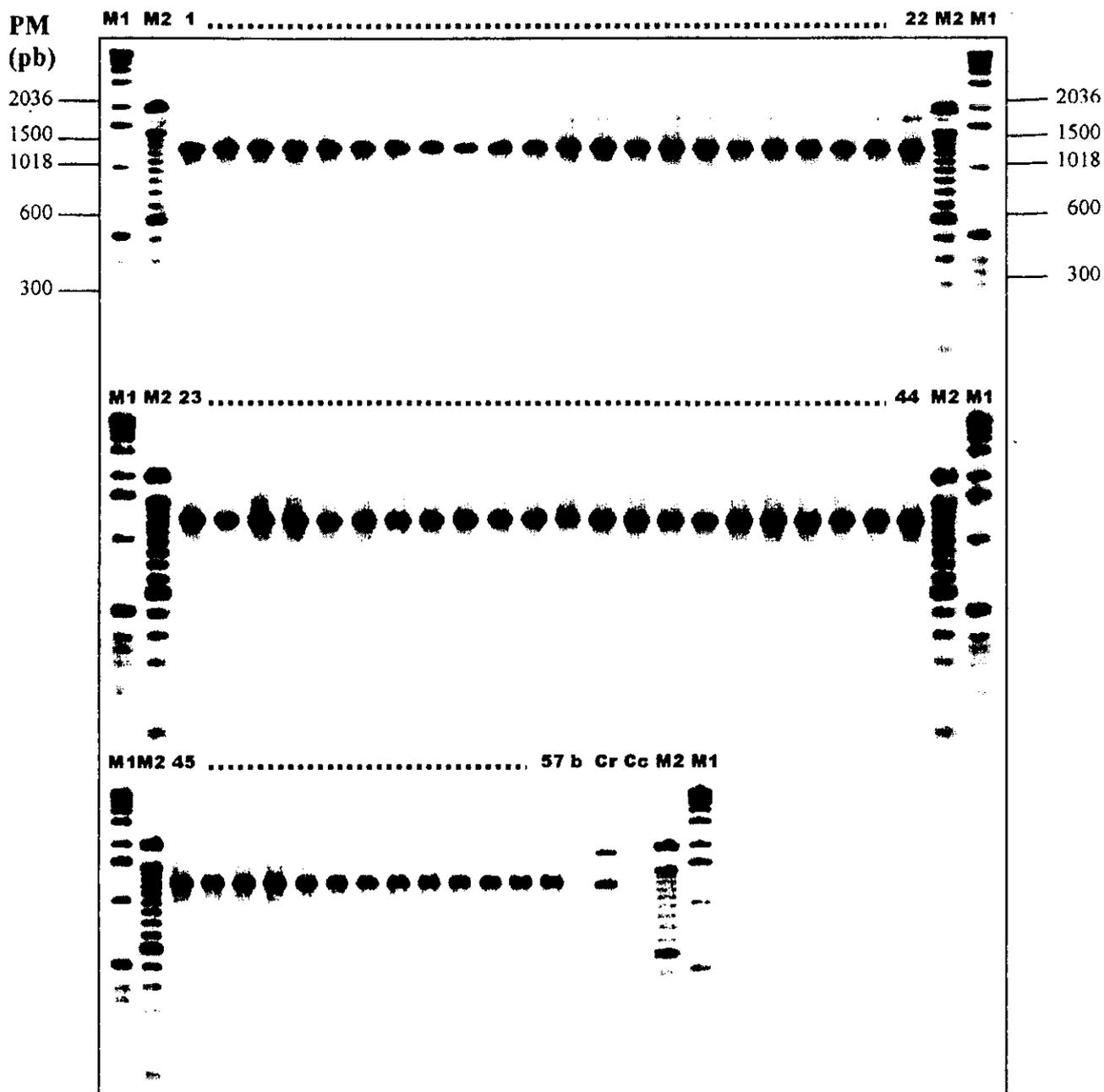


Figura 5. Huellas de ADN de tres especies del género *Cicer* amplificadas con el microsatélite (GATA)<sub>4</sub> con la técnica MP-PCR.

En los 57 genotipos de *C. anetinum* L., se observan huellas aparentemente monomórficas detectadas con el microsatélite (GATA)<sub>4</sub>. Notar que *C. reticulatum*, presenta cuatro fragmentos de ADN, dos muy claros y dos tenues; el tercer fragmento de aproximadamente 1300 pb en esta especie pudiera corresponder al fragmento amplificado en los genotipos cultivados; mientras que *C. cuneatum* no muestra ninguno. M1 y M2 son marcadores de peso molecular de 100 pb y 1 kb, respectivamente.

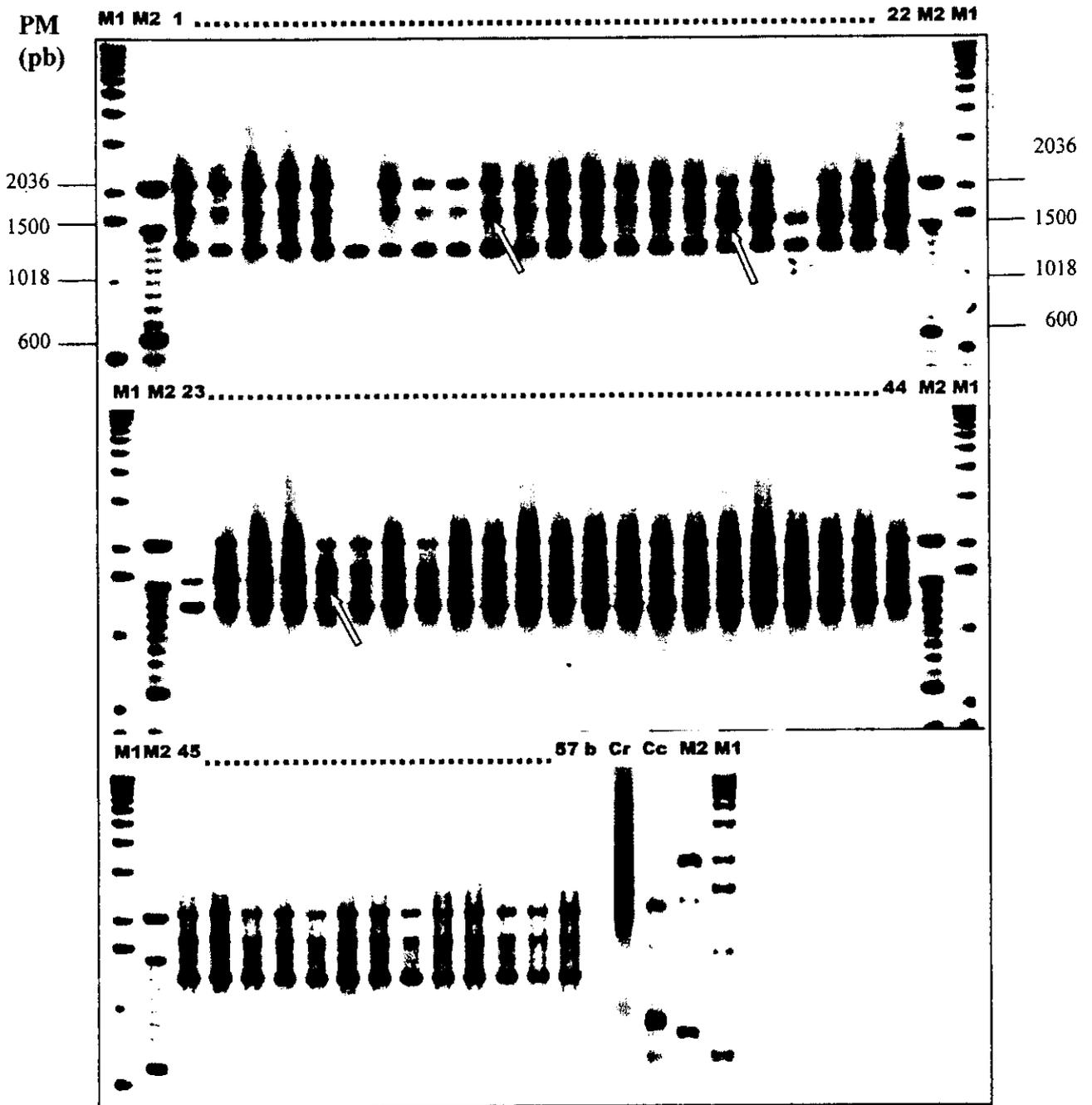


Figura 6. Huellas de ADN de tres especies del género *Cicor* amplificadas con el microsatélite (GGAT)<sub>4</sub> con la técnica de MP-PCR.

En esta figura se muestra el patrón de fragmentos de ADN detectados con el iniciador (GGAT)<sub>4</sub> con la técnica MP-PCR y se señalan con las flechas tres polimorfismos distinguibles. En *C. reticulatum* (Cr) y *C. cuneatum* (Cc), el microsatélite amplificó bandas que no corresponden a las detectadas en el cultivo, a excepción de un fragmento de aproximadamente 1250 pb presente en *C. cuneatum* que posiblemente corresponda al amplificado en *C. arietinum* L., de peso molecular parecido. Los dos marcadores de peso molecular M1 de 1 kb y M2 de 100 pb están colocados en los extremos,

Al efectuar el dendrograma con las huellas de MP-PCR detectadas con los iniciadores (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub> en las tres especies de *Cicer* consideradas (Figura 7), se puede apreciar que este análisis no permitió diferenciar de manera inter-específica las colectas y variedades de *C. arietinum* L.; lo que hace referencia al limitado polimorfismo del ADN detectado con la técnica. Otro dato importante que refleja la ineficiencia del análisis, es la similitud genómica en las huellas del garbanzo cultivado mostrada en los seis agrupamientos definidos por la línea continua en el eje de las abscisas de la gráfica con un coeficiente de 1.0. Estos agrupamientos señalan que la técnica consideró como idénticos a todos los genotipos que los conforman; sin embargo las diferencias son obvias, puesto que se encuentran mezclados garbanzos tipo Kabuli con Desi en el mismo grupo. La capacidad de diferenciación continúa siendo menor a medida que los valores del coeficiente disminuyen; si se observa la escala en 0.87, se podrá notar la formación de un solo grupo con todos los genotipos.

Respecto a las dos especies silvestres incluidas en el análisis (*C. reticulatum* y *C. cuneatum*), las huellas de MP-PCR lograron separarlas de *C. arietinum* con una distancia bastante considerable, lo que indica que para este caso, se requieren pocas características (datos obtenidos del análisis) para establecer una discriminación intra-específica.

El hecho de que los análisis con MP-PCR en esta investigación particular no hayan permitido establecer la relación inter-específica esperada, ni estimar la variación entre las colectas y variedades de *C. arietinum* L., se puede deber a dos razones posiblemente:

- ◆ La cantidad de iniciadores de microsatélites utilizados no fueron suficientes.
- ◆ La ausencia de diferenciación inter-específica pudo deberse al grado de homocigosis que caracteriza al garbanzo, la cual puede responder a la intensa selección que ha tenido el cultivo, a su baja diversidad genética y al alto nivel de endogamia que es superior al 98% (Sing et al., 1991). Esto ha sido evidenciado por otro tipo de estudios en este cultivo; por ejemplo, Kazan et al. (1993); Kusmenoglu et al. (1992) y Simon y Muehlbauer (1997), mencionan que *C. arietinum* presenta una suficiente variación morfológica, pero los estudios con isoenzimas y huellas de ADN con RFLPs y RAPDs revelan polimorfismos muy reducidos. Obviamente estas

conclusiones en un momento dado se pueden considerar como relativas, ya que al parecer, si se utilizan más marcadores moleculares o técnicas capaces de detectar cambios en el ADN, es posible diferenciar un organismo de otro (Hajj Moussa et al., 1996; Winter et al., 1999; Hüttel et al., 1999).

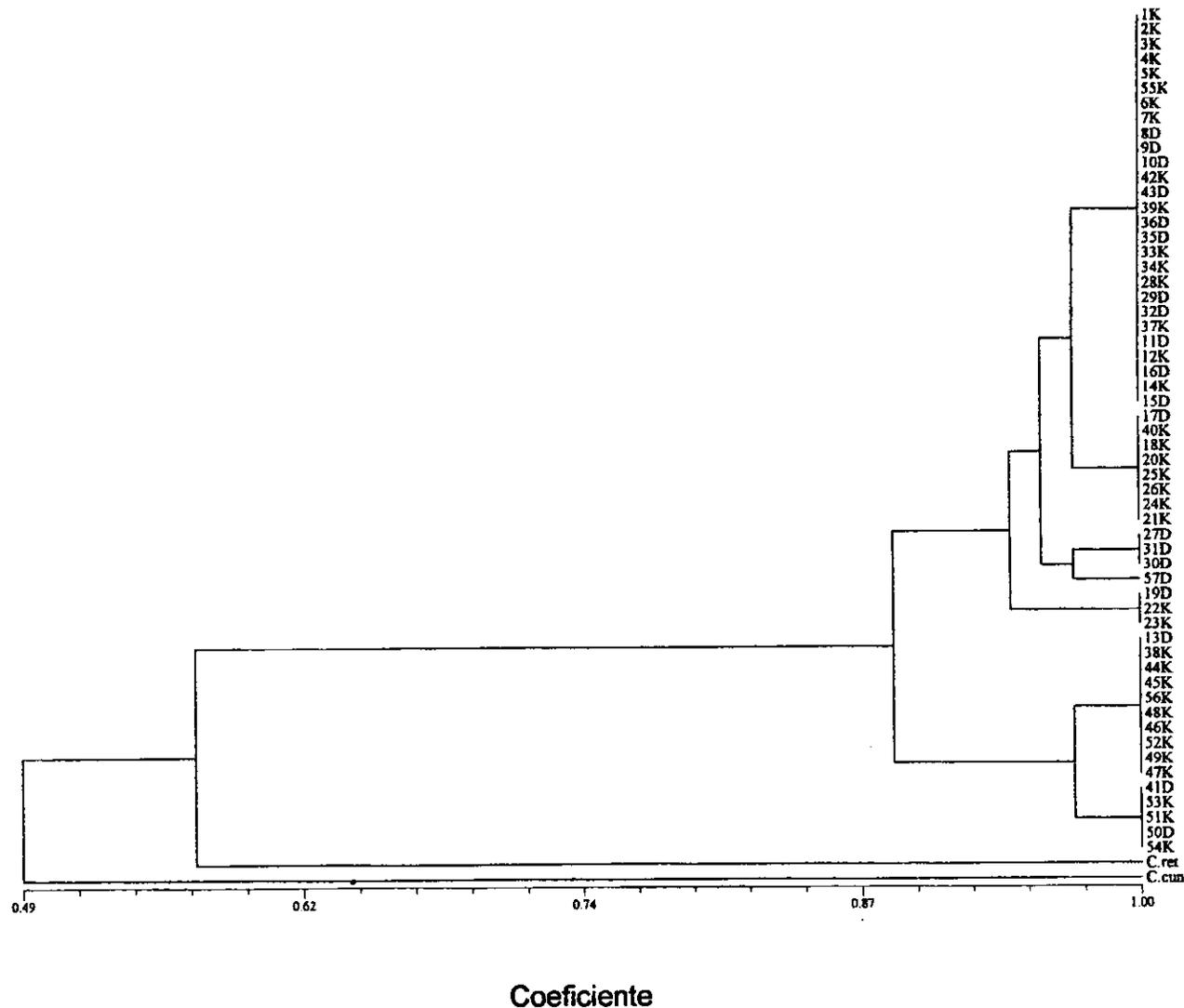


Figura 7. Relación genómica de tres especies del género *Cicer* establecida con huellas de ADN detectadas con MP-PCR.

El dendrograma muestra 8 grupos conformados con el análisis del promedio (UPGMA) utilizando 35 huellas de ADN detectadas con los microsatélites (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub>. En el eje de la abscisa se definen con una línea paralela 6 agrupamientos de genotipos; lo que significa que la técnica logró establecer diferenciación entre ellos. *C. reticulatum* (*C. ret*) y *C. cuneatum* (*C. cun*) fueron separados en el análisis y se ubicaron en un extremo de la gráfica; se puede observar que *C. reticulatum* mantiene mayor relación con *C. arietinum* L., a una distancia de 0.55 aproximadamente, mientras que *C. cuneatum* se mantiene alejada a una distancia de 0.49.

#### **5.4.2 Selección de iniciadores aleatorios (RAPDs) para el establecimiento de la técnica modificada de RAMP**

Para la selección de los iniciadores aleatorios que se combinarían con los de microsatélites en el establecimiento de la técnica modificada de RAMP, se consideró nuevamente el ADN del genotipo 2 que fue amplificado con los 20 iniciadores aleatorios del kit G de ROTH (Cuadro 5) a dos diferentes temperaturas; la óptima para RAPDs (35 °C) y la óptima para los microsatélites utilizados en esta investigación (40 °C y 48 °C). En pruebas preliminares de laboratorio se realizaron amplificaciones a 35 °C, 40 °C y 48 °C con estos mismos iniciadores, al igual que con los iniciadores (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub>. Para el caso de los RAPDs solamente hubo diferencia en la repetibilidad de los productos de amplificación entre 35 °C y 48 °C; pero no entre 35 °C y 40 °C; mientras que para el caso de los MP-PCR la hubo a 40 °C y 48 °C, pero no a 35 °C (datos no mostrados). Por esa razón se decidió utilizar en la técnica modificada de RAMP aquellos iniciadores que tanto de RAPDs como de MP-PCR fueron capaces de amplificar y reproducir los resultados para las T<sub>M</sub> de 40 °C y 48 °C.

Los RAPDs obtenidos a 35 °C y 48 °C se muestran en la figura 8. En los carriles nones del gel están los productos obtenidos con T<sub>M</sub> de 48 °C, y en los carriles pares del gel se muestran los productos amplificados con el mismo iniciador pero a 35 °C. Nótese que todas las secuencias, excepto la 1 y la 20 amplificaron fragmentos de ADN; sin embargo, en algunos casos los productos de amplificación no fueron reproducidos con alguna de las dos T<sub>M</sub> utilizadas, como fue el caso de los iniciadores G-04, G-05, G-06, G-11, G-14, G-15, G-16, G-17 y G-18.

Finalmente, los iniciadores seleccionados para la técnica modificada de RAMP fueron el G-02, G-03, G-09 y G-10 y la selección se hizo con base a la repetibilidad, la definición (nitidez) y el máximo número de fragmentos detectados con ambas temperaturas. Como se puede apreciar también en esta figura, se pudieron haber seleccionado los iniciadores G-07, G-08, G-12, G-13, G-17 y G-19; sin embargo, tanto la cantidad como la definición de algunos fragmentos fue variable.

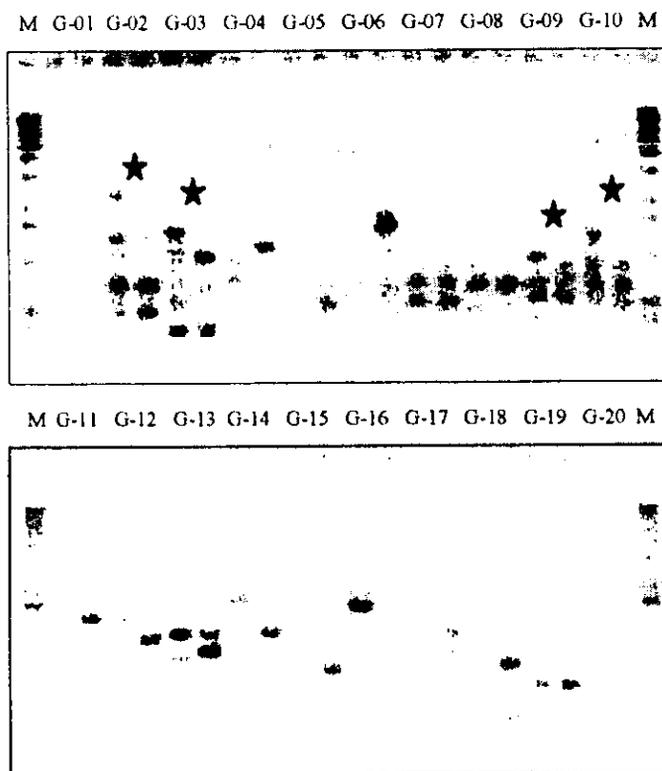


Figura. 8. Patrón de bandas obtenido en el ADN del genotipo 2 de *Cicer arietinum* L. con los iniciadores aleatorios de la serie ROTH G.

En el panel superior se muestran los productos obtenidos con G-01 a G-10 amplificados a 48 °C y 35 °C respectivamente. El panel inferior muestra los resultados obtenidos con los iniciadores G-11 a G-20 colocados en el mismo orden de temperaturas de alineamiento. El marcador de peso molecular (M) fue de 1 kb. La (\*) indica los iniciadores seleccionados.

La interpretación del gel de la Figura 8, se muestra en el Cuadro 9. Este cuadro contiene el número de bandas detectadas por cada uno de los iniciadores alineados a 48 °C y 35 °C respectivamente. También se indica el número de bandas coincidentes en ambas temperaturas de alineamiento. Los iniciadores seleccionados (\*) mostraron 2 bandas coincidentes con G-02, G-03 y G-09 y 4 bandas con G-10.

Cuadro 9. Número de bandas detectadas y coincidentes con los iniciadores del kit G de ROTH en el ADN de L2 de *Cicer arietinum* L. con dos diferentes temperaturas de alineamiento. Las bandas coincidentes (★) sirvieron para seleccionar los iniciadores.

No. de bandas/ $T_M$	01	02 (★)	03 (★)	04	05	06	07	08	09 (★)	10 (★)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
48° C	0	4	5	2	0	0	2	1	3	5	0	2	2	1	0	1	2	0	1	0
35 °C	0	2	2	1	2	1	2	1	3	4	2	1	2	1	2	0	3	2	2	0
Ambas $T_M$ (s)	0	2	2	0	0	0	2	1	2	4	0	1	1	0	0	0	2	0	1	0

#### 5.4.3 Detección de huellas genómicas con la técnica modificada de RAMP (combinación de iniciadores para RAPDs [G-02, G-03, G-09 y G-10] e iniciadores de MP-PCR [(GACA)<sub>4</sub> y (GATA)<sub>4</sub>]

La técnica modificada de RAMP permitió la detección de fragmentos de ADN mediante la combinación de los iniciadores aleatorios indicados en la Figura 8 y dos de los iniciadores de microsatélites [(GACA)<sub>4</sub> y (GATA)<sub>4</sub>] mostrados en la Figura 3.

Previo a la aplicación de la técnica se realizaron amplificaciones con los iniciadores seleccionados de MP-PCR; parte de estos resultados se muestran en la Figura 9, en donde se pueden apreciar los diferentes fragmentos de ADN detectados en el genotipo 2 con el microsatélite (GATA)<sub>4</sub> combinado con los cuatro iniciadores aleatorios. A diferencia de la cantidad de productos obtenidos de manera independiente con este microsatélite, en la Figura 3 (carril 5 con una banda) y con los iniciadores aleatorios de la Figura 8 (4, 5, 3 y 5 fragmentos respectivamente a 40 °C); el nuevo patrón de bandeo fue totalmente diferente y más abundante. Estos resultados muestran de manera muy clara el potencial que ofrece la técnica, cuyas huellas genómicas están representadas posiblemente por cuatro tipos de bandas de ADN: RAPD-RAPD; RAPD-MP; MP-RAPD y MP-MP.

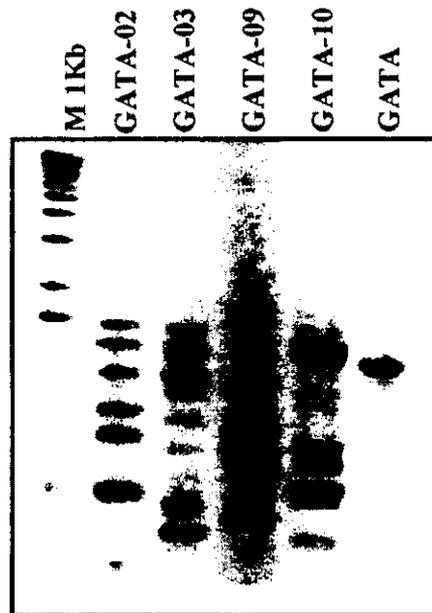


Figura 9. Amplificación de ADN del genotipo 2 de *Cicer arietinum* L. con la técnica modificada de RAMP.

Nótese en esta fotografía la capacidad de detección de fragmentos de ADN utilizando el microsatélite  $(GATA)_4$  combinado con cuatro iniciadores aleatorios. El carril 6 del gel muestra el único producto de amplificación detectado con el iniciador de microsatélite. Los carriles 2 al 4 contienen los fragmentos de ADN amplificados con la técnica modificada de RAMP. El marcador de ADN (M) es de 1kb.

Una vez que fue corroborada la funcionalidad la técnica RAMP, se procedió a aplicarla con el resto de los iniciadores en todos los genotipos considerados en el estudio.

Las Figuras 10 a 13 muestran los patrones de bandeo detectados con el iniciador  $(GATA)_4$  combinado con los cuatro iniciadores aleatorios seleccionados; en las Figuras 14 a 17 se muestran las huellas detectadas con los mismos iniciadores aleatorios pero combinados con el microsatélite  $(GACA)_4$ .

El análisis RAMP para las Figuras 10 a 13 mostró lo siguiente:  $(GATA)_4$  + G-02 detectó 12 fragmentos, de los cuales 5 son polimórficos;  $(GATA)_4$  + G-03 mostró 13 fragmentos también con 4 polimorfismos;  $(GATA)_4$  + G-09 amplificó 17 fragmentos con 6 polimorfismos y en  $(GATA)_4$  + G-10 se detectaron 15 fragmentos con 4 polimorfismos

(la cantidad de fragmentos y polimorfismos referidos citados están referidos en el Cuadro 10).

A diferencia de las 11 huellas obtenidas cuando se llevó a cabo el análisis MP-PCR con el microsatélite  $GACA_4$  (Figura 4), los resultados obtenidos en las Figuras 14 a 17, mostraron un patrón de bandas más abundante y complejo. Para  $(GACA)_4 + G-02$  el número de fragmentos fue 18 con 5 polimorfismos, para  $(GACA)_4 + G-03$  los fragmentos fueron 16 con 2 polimorfismos, para  $(GACA)_4 + G-09$  fueron 17 fragmentos con 9 polimorfismos, pero en  $(GACA)_4 + G-10$  el efecto fue inverso; ya que solamente se identificaron 8 fragmentos en RAMP y además monomórficos.

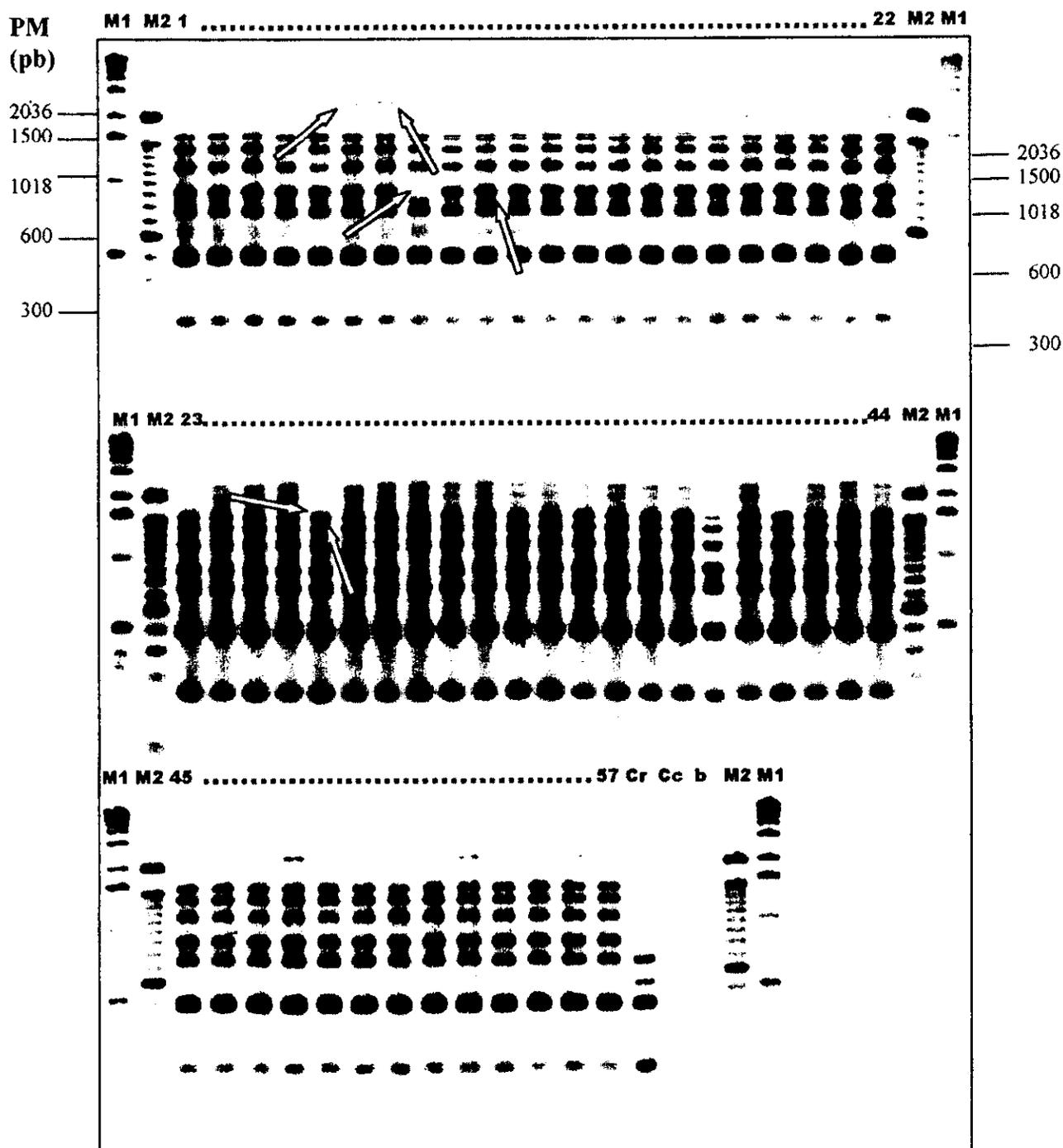


Figura 10. Huellas de ADN amplificadas con los iniciadores  $[(GATA)_4 + OPG\ 02]$  en tres especies del género *Cicer* con la técnica modificada de RAMP.

Esta figura muestra las huellas y polimorfismos obtenidos con la técnica modificada de RAMP en *C. aristinum* L. (carriles 1 al 57) y *C. reticulatum* (Cr), notar que *C. cuneatum* (Cc) no presenta ningún fragmento. Las flechas señalan seis polimorfismos. Los marcadores de peso molecular están colocados en los extremos de cada gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2).

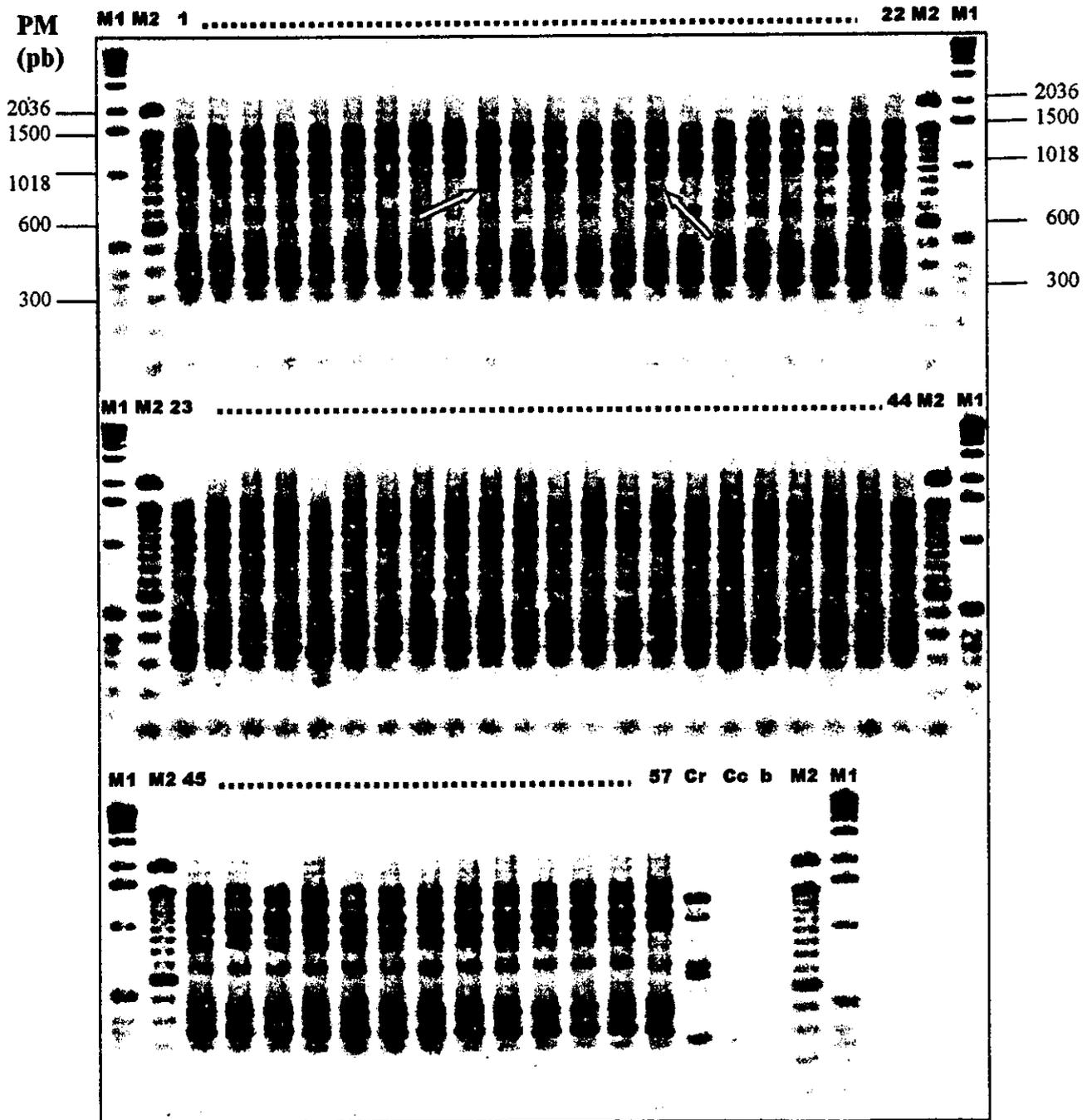


Figura 11. Huellas de ADN de tres especies del género *Cicer* amplificadas con los iniciadores  $([GATA]_4 + OPG\ 03)$  con la técnica modificada de RAMP.

Esta figura muestra las huellas y polimorfismos obtenidos con la técnica modificada de RAMP en *C. arietinum* L. (carriles 1 al 57); *C. Reticulatum* (Cr) y *C. cuneatum* (Cc). Las flechas señalan dos polimorfismos evidentes. Los marcadores de peso molecular están colocados en los extremos de cada gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2).

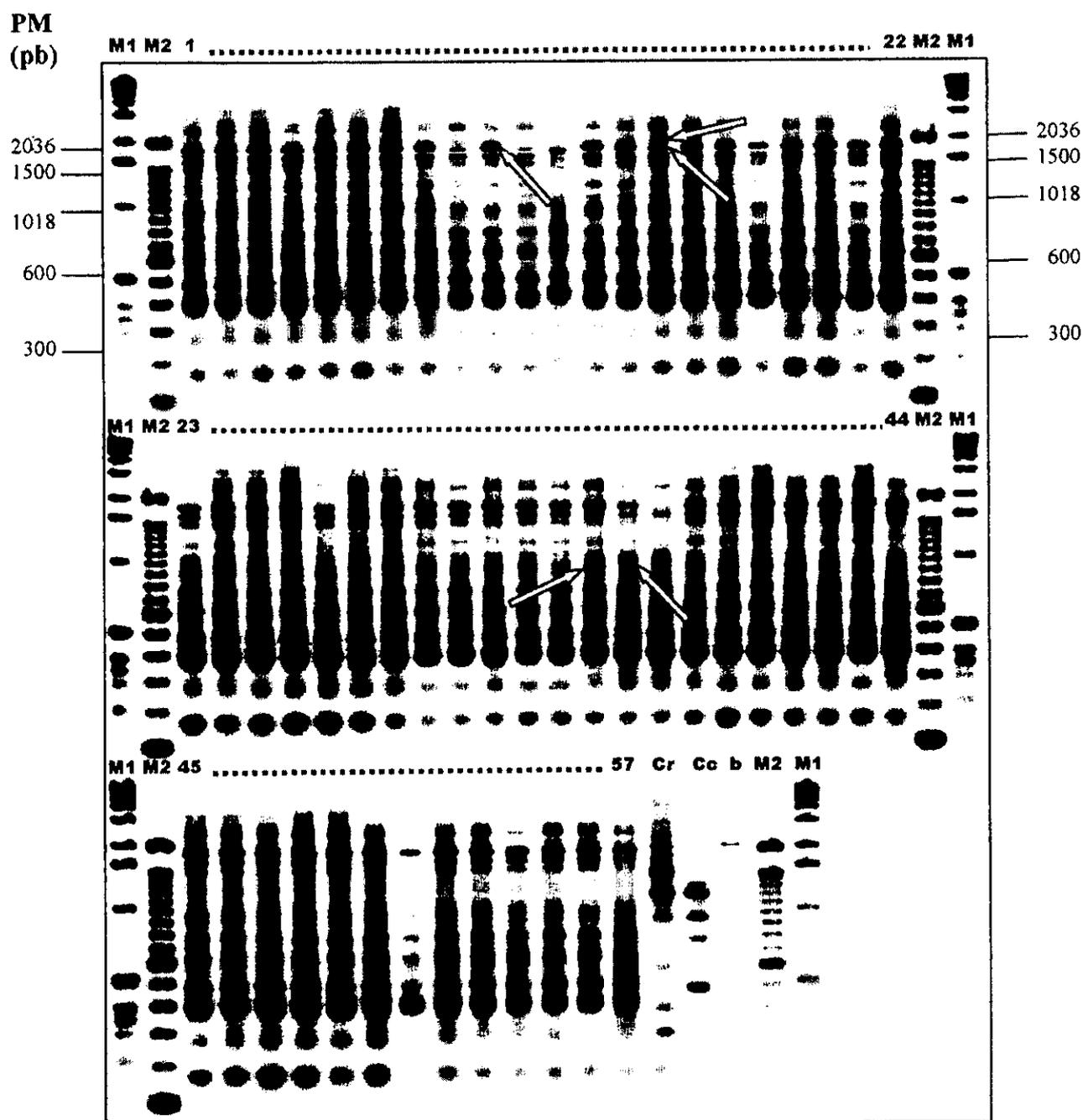


Figura 12. Huellas de ADN amplificadas con los iniciadores  $[(GATA)_4 + OPG\ 09]$  en tres especies del género *Cicer* con la técnica modificada de RAMP.

Esta figura muestra las huellas y polimorfismos en tres especies de *Cicer*. Los carriles del 1 al 57 corresponden a *C. arietinum* L., después se encuentra *C. reticulatum* (Cr) y en seguida *C. cuneatum* (Cc). Las flechas señalan cinco polimorfismos detectados con este par de iniciadores. Los marcadores de peso molecular están en los extremos de cada gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2). Nótese la abundancia de fragmentos respecto a los detectados en las Figuras 10, 11 y 13.

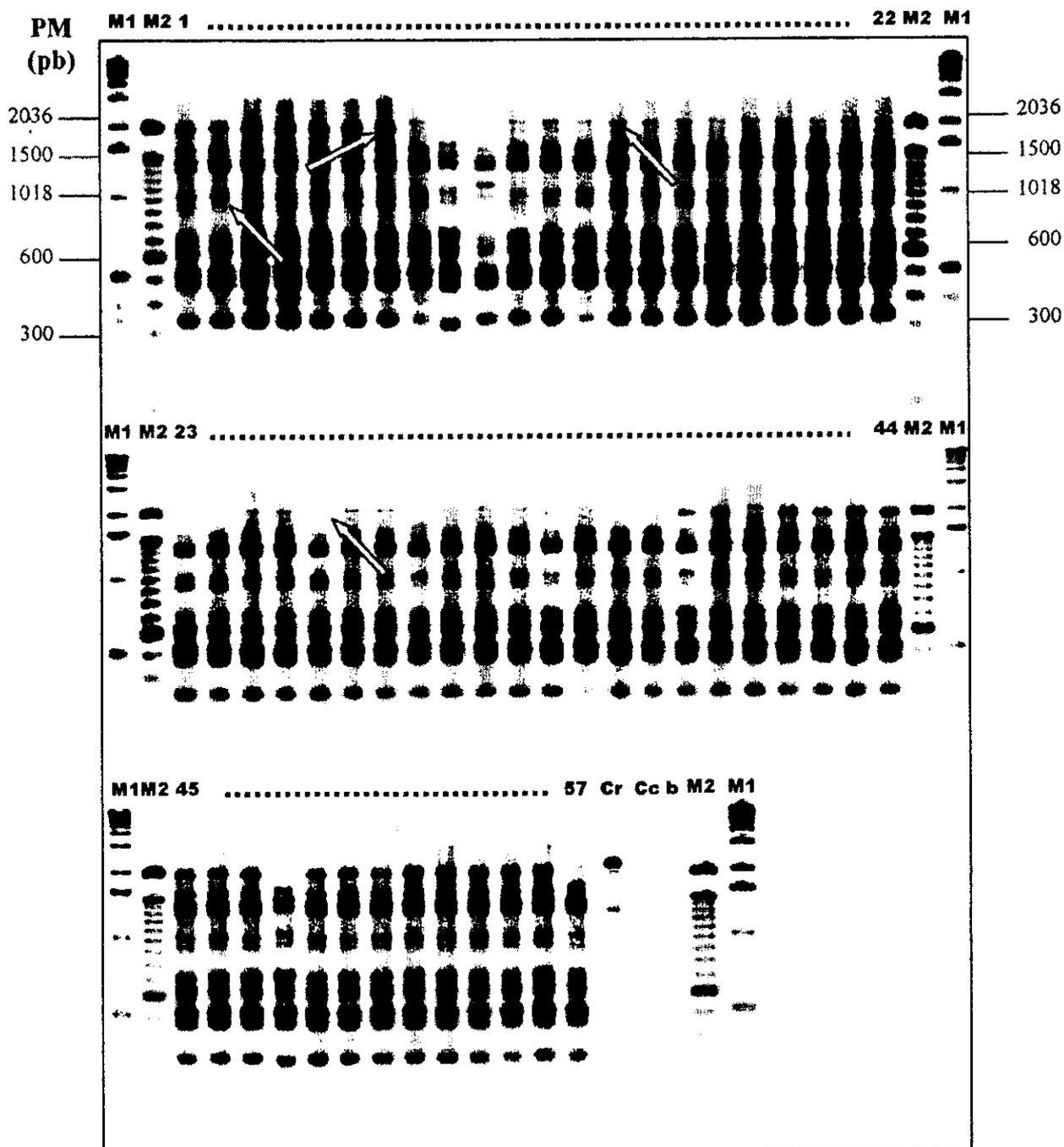


Figura 13. Huellas de ADN amplificadas con la técnica modificada de RAMP utilizando los iniciadores ( $[GATA]_4 + OPG 10$ ) en tres especies del género *Cicer*.

La figura muestra las huellas y polimorfismos obtenidos en tres especies de *Cicer* con la técnica modificada de RAMP. Las flechas señalan cuatro polimorfismos detectados en las colectas y variedades de *C. arietinum* L. Nótese que en *C. cuneatum* (Cc) no se amplificó ningún fragmento. Los marcadores de peso molecular están en los extremos de cada gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2).

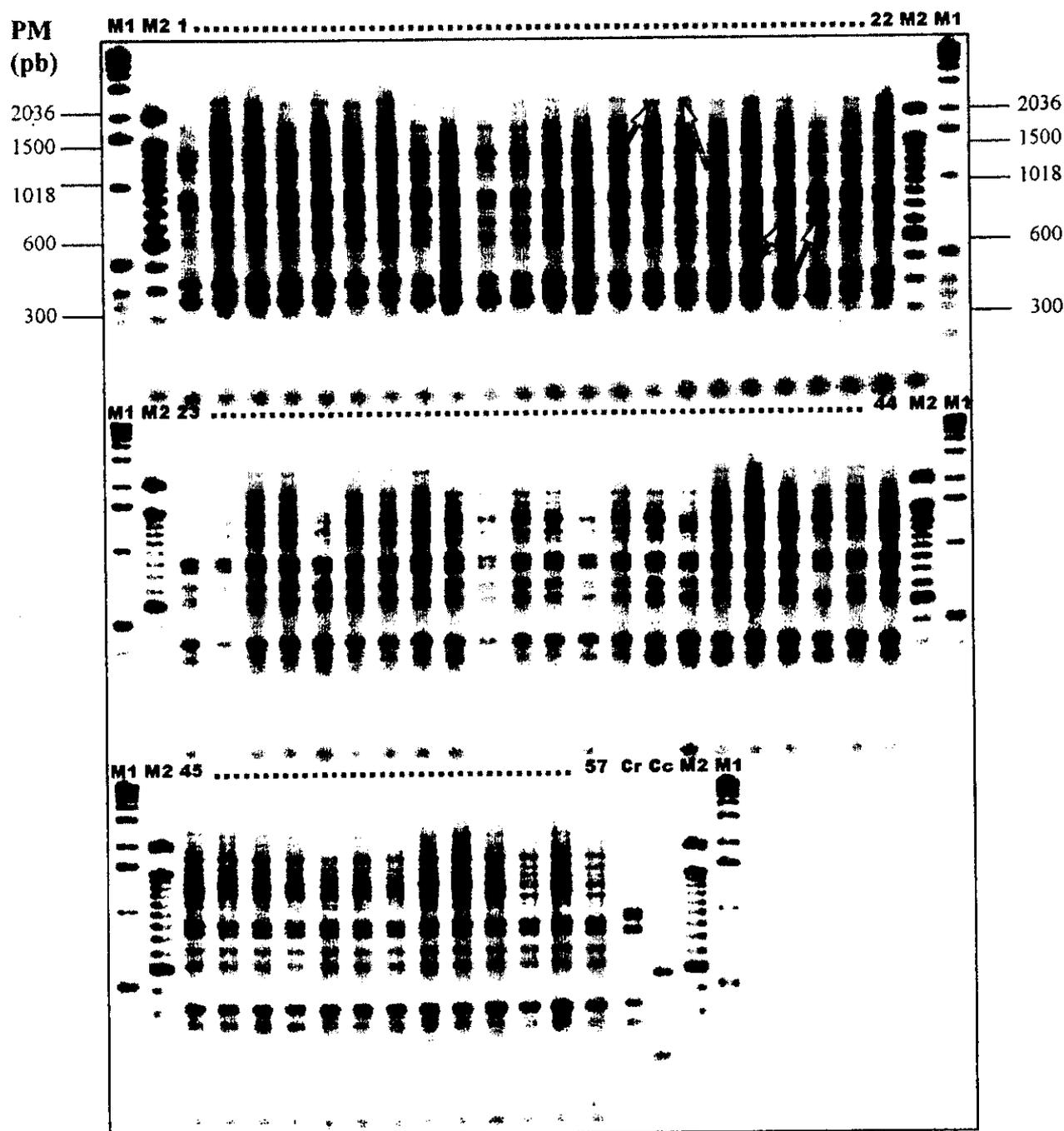


Figura 14. Huellas de ADN amplificadas con la técnica modificada de RAMP con los iniciadores  $([GACA]_4 + OPG\ 02)$  en tres especies del género *Cicero*.

Al igual que las Figuras 10 a 13, aquí se indican las huellas y polimorfismos obtenidos con la técnica modificada de RAMP en *C. anatinum* L. (carriles 1 al 57); *C. reticulatum* (Cr) y *C. cuneatum* (Cc), pero con diferente iniciador de microsatélite. Las flechas señalan cuatro diferentes polimorfismos. Los marcadores de peso molecular están en los extremos de cada gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2). Nótese la abundancia de fragmentos respecto a los amplificados con el microsatélite  $(GATA)_4$  en las Figuras 10, 11, 12 y 13.

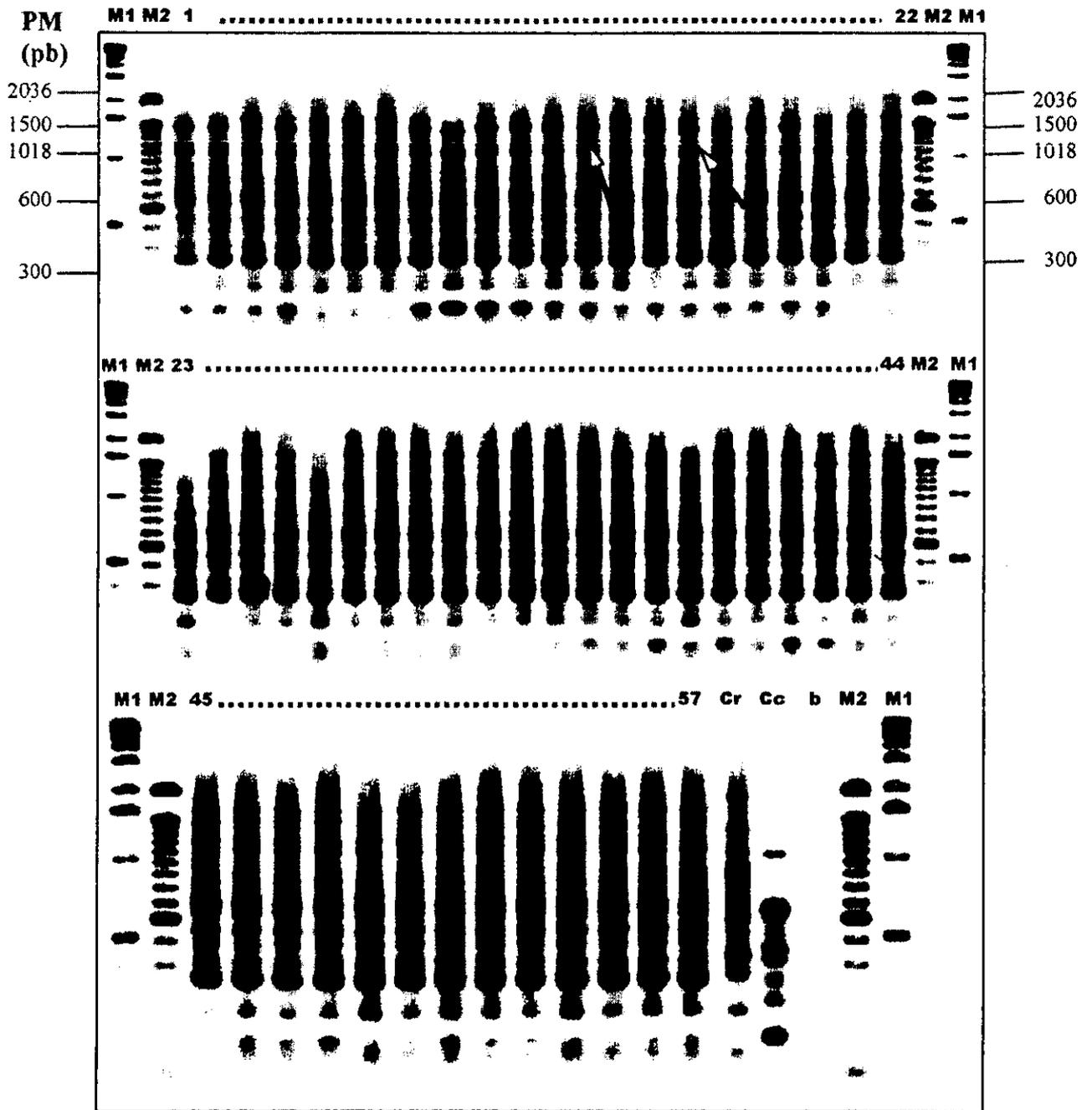


Figura 15. Huellas de ADN amplificadas con los iniciadores  $[(GACA)_4 + OPG\ 03]$  utilizando la técnica modificada de RAMP en tres especies del género *Cicer*.

Esta Figura muestra las huellas y polimorfismos detectados con la técnica modificada de RAMP. Los 57 genotipos de *C. arietinum* L.; después, *C. reticulatum* (Cr) y por último *C. cuneatum* (Cc). Las flechas señalan la presencia y ausencia de dos fragmentos polimórficos de ADN. Los marcadores de peso molecular están en los extremos del gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2). Nótese el intenso barrido que indica la presencia de fragmentos no definidos.

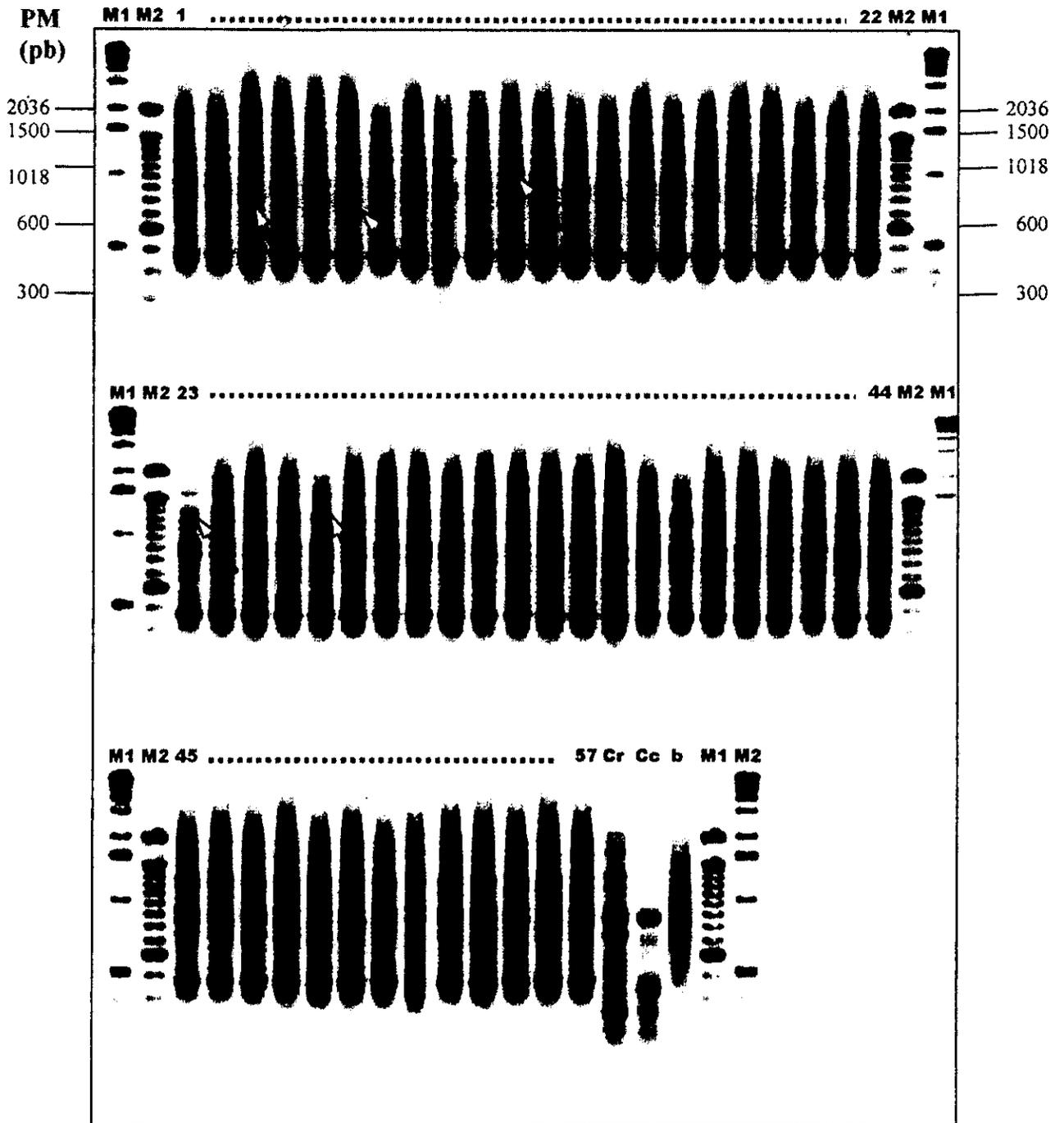


Figura 16. Huellas de ADN detectadas con los iniciadores  $[(GACA)_4 + OPG\ 09]$  de tres especies del género *Cicer* utilizando la técnica modificada de RAMP.

En esta Figura se ilustran las huellas y polimorfismos obtenidos con la técnica modificada de RAMP en 57 genotipos de *C. arietinum* L., uno de *C. reticulatum* (Cr) y uno de *C. cuneatum* (Cc). Las flechas señalan tres diferentes polimorfismos. Los marcadores de peso molecular están en el extremo del gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2). Nótese el intenso barrido que indica la presencia de fragmentos no definidos, al igual que la Figura 15.

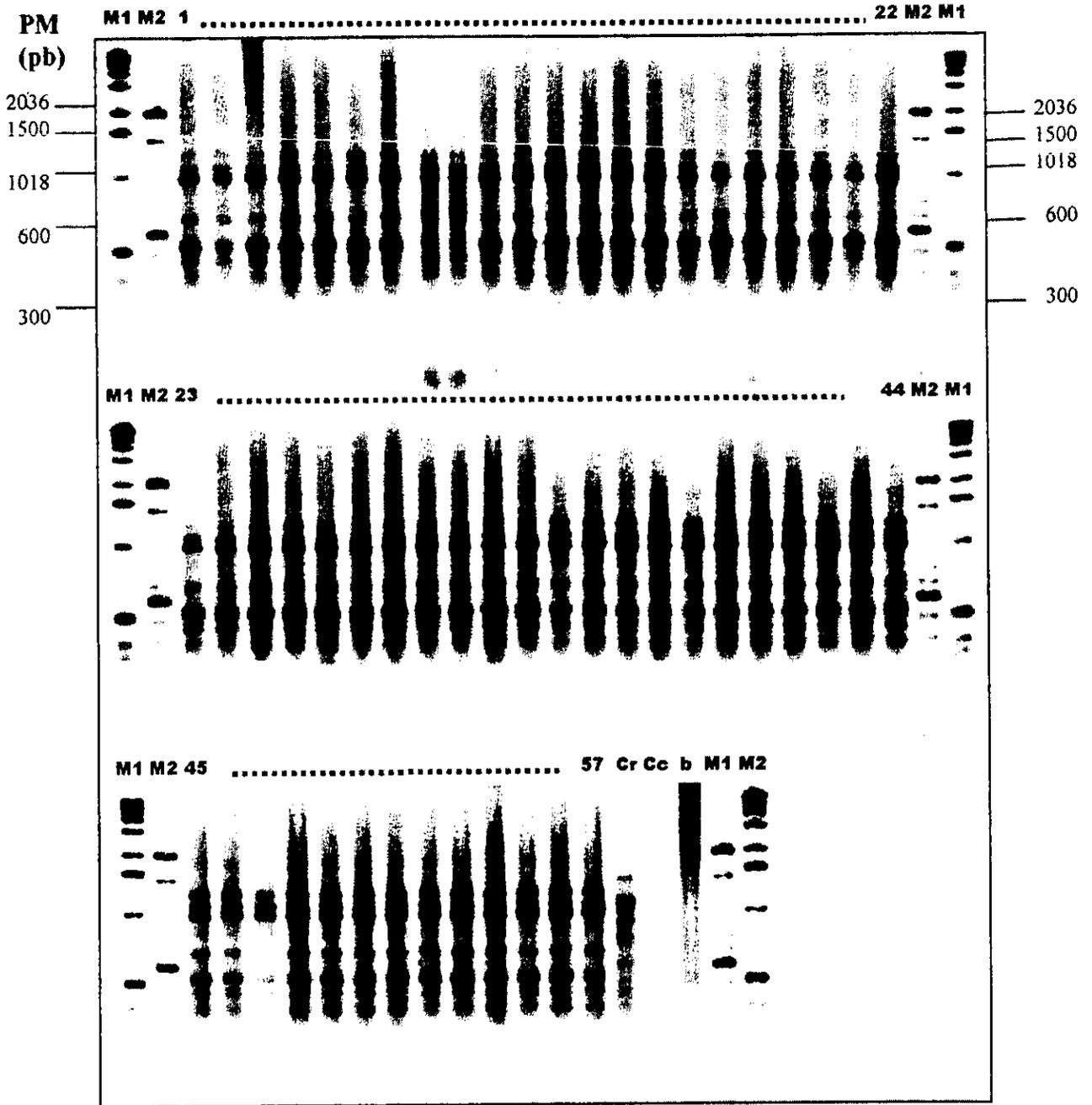


Figura 17. Huellas de ADN en tres especies del género *Cicor* amplificadas con la técnica modificada de RAMP utilizando los iniciadores ([GACA]<sub>4</sub> + OPG 10).

Esta Figura muestra las huellas y polimorfismos obtenidos con la técnica modificada de RAMP en tres especies de *Cicor*. A diferencia de los polimorfismos detectados con el resto de los iniciadores, en este caso no fue posible identificarlos en *C. arietinum* L., pero sí en *C. reticulatum* (Cr); mientras que en *C. cuneatum* (Cc) no hubo amplificación. Los marcadores de peso molecular están en los extremos de cada gel y son de 1 kb (M1) y de 100 pb (M2).

En las Figuras 10 a 17 que corresponden al análisis de ADN con la técnica modificada de RAMP, se pueden apreciar la nitidez y la cantidad de fragmentos de ADN detectados con esta modalidad; y por otro lado, se puede anotar también, la presencia abundante de amplificaciones no específicas obtenidas principalmente con las combinaciones de los iniciadores (GACA)<sub>4</sub> + G-03 y (GACA)<sub>4</sub> + G-09. En estos dos últimos casos, independientemente del barrido presente en el gel (Figuras 15 y 16), las huellas que se tomaron en cuenta para el análisis fueron las que mostraron definición.

En las diferentes fotografías, los polimorfismos presentes en *C. arietinum* L., se señalan con flechas de color blanco; en algunas ocasiones no es fácil distinguirlos gráficamente ya que en algunos casos influye el grosor mínimo de la banda y en otros, la diferencia de peso molecular; sin embargo, éstos fueron claramente separados en la computadora con el sistema Kodak Digital Science ID 2.0 utilizado en este trabajo. En el Cuadro 10 se resumen los productos amplificados, el número de polimorfismos y la eficiencia de los iniciadores en los 57 genotipos del garbanzo cultivado.

La cantidad de bandas de ADN indicadas en el cuadro, hace referencia solamente a los fragmentos amplificados en las colectas y variedades de *C. arietinum* L. No se incluyeron los fragmentos ni polimorfismos presentes en las dos especies silvestres, debido a que se pretendió resaltar la eficiencia de cada iniciador o iniciadores en la especie cultivada. Cabe hacer notar, que la cantidad de productos amplificados en las especies silvestres fue superior a la de *C. arietinum* L. La frecuencia de los polimorfismos mostrada en el cuadro (expresada en porcentajes), nos permite estimar la capacidad que tuvo cada iniciador para caracterizar el ADN y seleccionar aquella técnica molecular específica (de las utilizadas en el presente estudio) que garantice un análisis más eficiente y rápido.

Cuadro. 10. Eficiencia de los iniciadores utilizados en PCR para el análisis de diferentes genotipos de *Cicer arietinum* L.

Iniciador	No. de fragmentos amplificados de ADN	No. de polimorfismos	Frecuencia de polimorfismos (%)
(GACA) <sub>4</sub>	11	4	36
(GATA) <sub>4</sub>	1	0	0
(GGAT) <sub>4</sub>	5	3	60
(GACA) <sub>4</sub> + G-02	18	5	27
(GACA) <sub>4</sub> + G-03	16	2	12
(GACA) <sub>4</sub> + G-09	17	9	52
(GACA) <sub>4</sub> + G-10	8	0	0
(GATA) <sub>4</sub> + G-02	12	5	41
(GATA) <sub>4</sub> + G-03	13	4	30
(GATA) <sub>4</sub> + G-09	17	6	35
(GATA) <sub>4</sub> + G-10	15	4	26

En la Figura 18 se muestra el dendrograma conformado con los resultados obtenidos en la técnica modificada de RAMP con los ocho pares de iniciadores utilizados: [(GATA)<sub>4</sub> + G-02, G-03, G-09 y G-10] y [(GACA)<sub>4</sub> + G-02, G-03, G-09 y G-10]. La gráfica se realizó con 116 datos codificados a partir de los fragmentos de ADN amplificados en todos los genotipos, tanto de *C. arietinum* L., como especies silvestres. Los datos permitieron formar 58 grupos diferentes con un coeficiente de 1.0, lo que indica que esta clase de marcadores fue capaz de distinguir a todas las colectas y variedades. Sin embargo, la técnica considera como iguales a los genotipos 46 y 56 que pertenecen a garbanzo tipo Kabuli (ver Cuadro 8). Si la gráfica se observa a una distancia de 0.97, la línea perpendicular trazada intercepta con 20 grupos definidos a esta distancia. La mayoría de estos agrupamientos contiene genotipos tanto al tipo Desi como Kabuli; lo que hace referencia a posibles entrecruzamientos y mezcla de características entre ellos, dadas las similitudes a nivel de ADN.

En esta misma gráfica todos los genotipos de *C. arietinum* L. (55) están relacionados en un nivel de 0.89 indicando una relación muy cercana entre ellos; mientras que *C. reticulatum* se aleja con un coeficiente de 0.55 aproximadamente y *C. cuneatum* con 0.25. Ambas especies silvestres, nuevamente se separaron del resto de los genotipos con una distancia bastante considerable lo que refleja diferencias drásticas a nivel de ADN

entre las tres especies; pero siempre se mantiene una similitud mayor entre *C. arietinum* L. y *C. reticulatum*.

#### **5.4.4 Relación genómica de las colectas y variedades de *C. arietinum* L., y dos especies silvestres mediante el análisis combinado de marcadores moleculares**

Con la finalidad de definir de una manera más precisa la diversidad genética del germoplasma en estudio, se realizó una gráfica con 151 datos moleculares (Figura 19) producto de la suma de todos los análisis realizados con ADN (MP-PCR y RAMP). En este caso, se puede observar la conformación de 58 grupos totales con un coeficiente de 1.0. En este nivel, el análisis nuevamente no muestra diferencias entre los genotipos 46 y 56 como en la Figura 1 (dendrograma con datos morfológicos), en la Figura 7 (dendrograma con marcadores de MP-PCR), y en la Figura 18 (análisis con la técnica modificada de RAMP); por lo que posiblemente se trate de variedades que presentan progenitores comunes o estrechamente relacionados, lo que resulta en una marcada similitud entre ellas. Estos genotipos corresponden a las variedades CUGA 95/96-3325 y Santo Domingo 82, provenientes del CEVACU y cuyos progenitores en parte son Gordo Lechoso y Progreso 95, respectivamente.

En esta gráfica, nuevamente todos los genotipos de *C. arietinum* L., se mantienen con una relación muy estrecha entre ellos con un coeficiente de alrededor de 0.90; mientras que las dos especies silvestres se separan a una distancia de 0.30.

Con este mismo propósito, se conformó la gráfica mostrada en la Figura 20, que incluye el total de los datos obtenidos en esta investigación; es decir, que para su conformación se conjuntaron los datos morfológicos (23), las huellas de MP-PCR (35) y de la técnica modificada de RAMP (116), haciendo un total de 174 caracteres. Como se puede apreciar en este dendrograma, se lograron definir los mismos 58 grupos que en la Figura 18, con un coeficiente de 1.0.

Posiblemente el hecho de utilizar todos los datos en conjunto para la realización del dendrograma en esta figura, nos permite definir aún con más precisión la relación

genética entre las colectas y variedades; solamente por mencionar un ejemplo, nos referiremos al genotipo 10, que de manera inmediata se caracteriza por ser del grupo Desi y en las gráficas 18 y 19 se mantiene agrupado con los genotipos 3 y 4 de Kabuli; sin embargo en la gráfica 20, este genotipo define una relación más cercana con el genotipo 4 que con el 3.

Respecto a las dos especies silvestres utilizadas para establecer la comparación, también en este caso se mantienen separadas de la especie cultivada; siendo *C. cuneatum* la de menor relación genómica con una distancia de 0.35 y *C. reticulatum* con una distancia de alrededor de 0.60 respecto a *C. arietinum* L., valores que se pueden apreciar en la matriz de coeficientes de similitud ubicada a partir de la página 104.

Al comparar el comportamiento de algunos genotipos en los distintos agrupamientos, se pudo notar una tendencia a mantenerse juntos de forma constante, como es el caso de los genotipos 6, 38 y 44; 17, 20 y 21; 11, 15 y 37; 22, 26, 25 y 23; 39 y 42; 45, 46 y 56 que se mantienen juntos al menos en las 3 últimas gráficas (Figuras 18, 19 y 20). Esta tendencia sugiere un mayor parentesco genético entre cada uno ellos, lo que puede también corroborarse con los valores altos de similitud mostrados en la matriz de coeficientes de similitud (página 104) que van desde 0.92 hasta 0.97 (ubicar las coordenadas en la matriz).

La matriz de similaridad contiene los valores calculados con el coeficiente de apareamiento simple (Simple Matching) que se utilizó para el análisis; dichos valores representan la similitud que cada genotipo tiene respecto al resto de los individuos que se están comparando. El valor máximo de similitud es 1.0, y que solamente lo tiene el individuo mismo. En este sentido, los genotipos 46 y 56 que tienden a no diferenciarse en los dendrogramas de las Figuras 1, 7 y 18 se debe a que la similitud entre ellos es el valor máximo, es decir 1.0; esto sugiere una relación genética bastante estrecha, que no fue posible diferenciar con las técnicas aquí utilizadas; aunque también podría tratarse de una duplicidad en la clasificación realizada por el CEVACU.

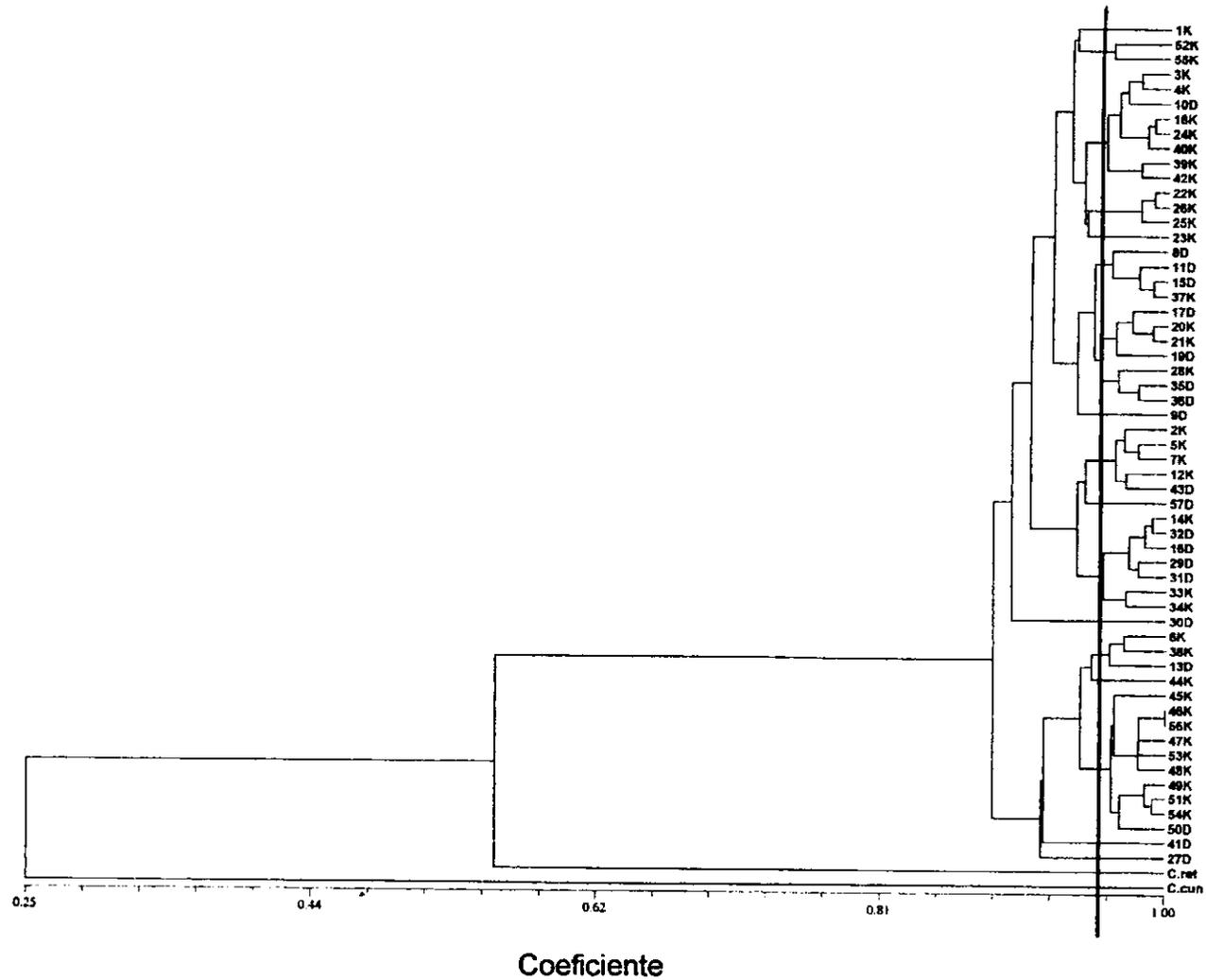


Figura 18. Relación genómica de tres especies del género *Cicer* establecida con huellas de ADN detectadas con la técnica modificada de RAMP.

El dendrograma muestra 58 grupos conformados con el método del promedio (UPGMA) con un coeficiente de 1.00 utilizando 116 datos moleculares; *C. reticulatum* y *C. cuneatum* fueron separados en el análisis a una distancia de 0.60 y 0.25, respectivamente, lo que indica una menor relación con *C. arietinum* L..

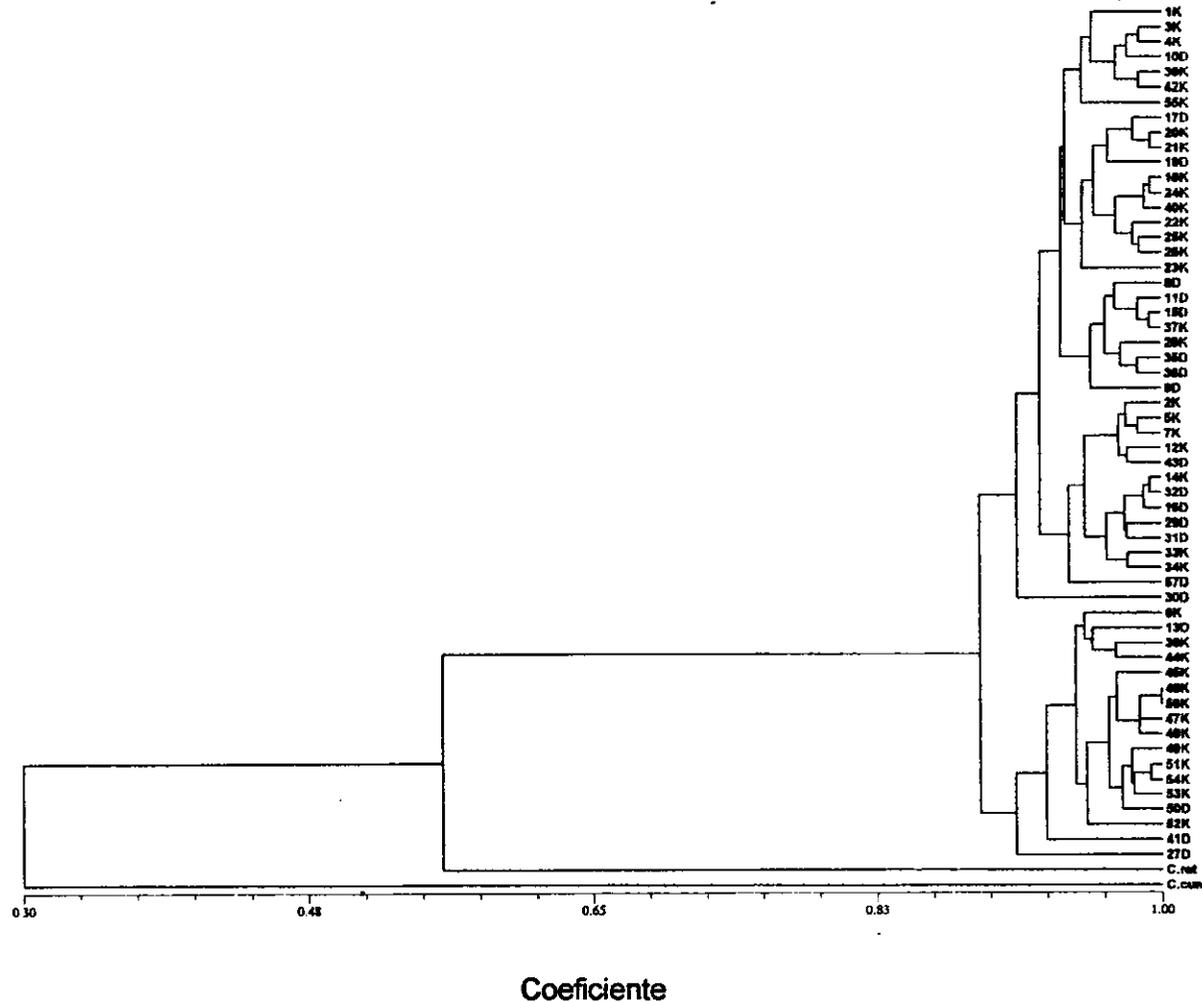


Figura 19. Relación genómica de tres especies del género *Cicer* establecida con huellas de ADN detectadas con la técnica MP-PCR y la técnica modificada de RAMP.

El dendrograma contiene 58 grupos conformados con el método del promedio (UPGMA) utilizando 151 datos moleculares que provienen del análisis con tres iniciadores de microsatélites [(GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub> y (GGAT)<sub>4</sub>] y con 8 pares de iniciadores RAMP [(GACA)<sub>4</sub> y (GATA)<sub>4</sub> combinados cada uno con 4 iniciadores aleatorios, (G-02, G-03, G-09 y G-10). *C. reticulatum* y *C. cuneatum* están separados de *C. arietinum* L., en la gráfica a una distancia de 0.60 y 0.30 respectivamente, lo que indica una menor relación de ambas con la especie cultivada.

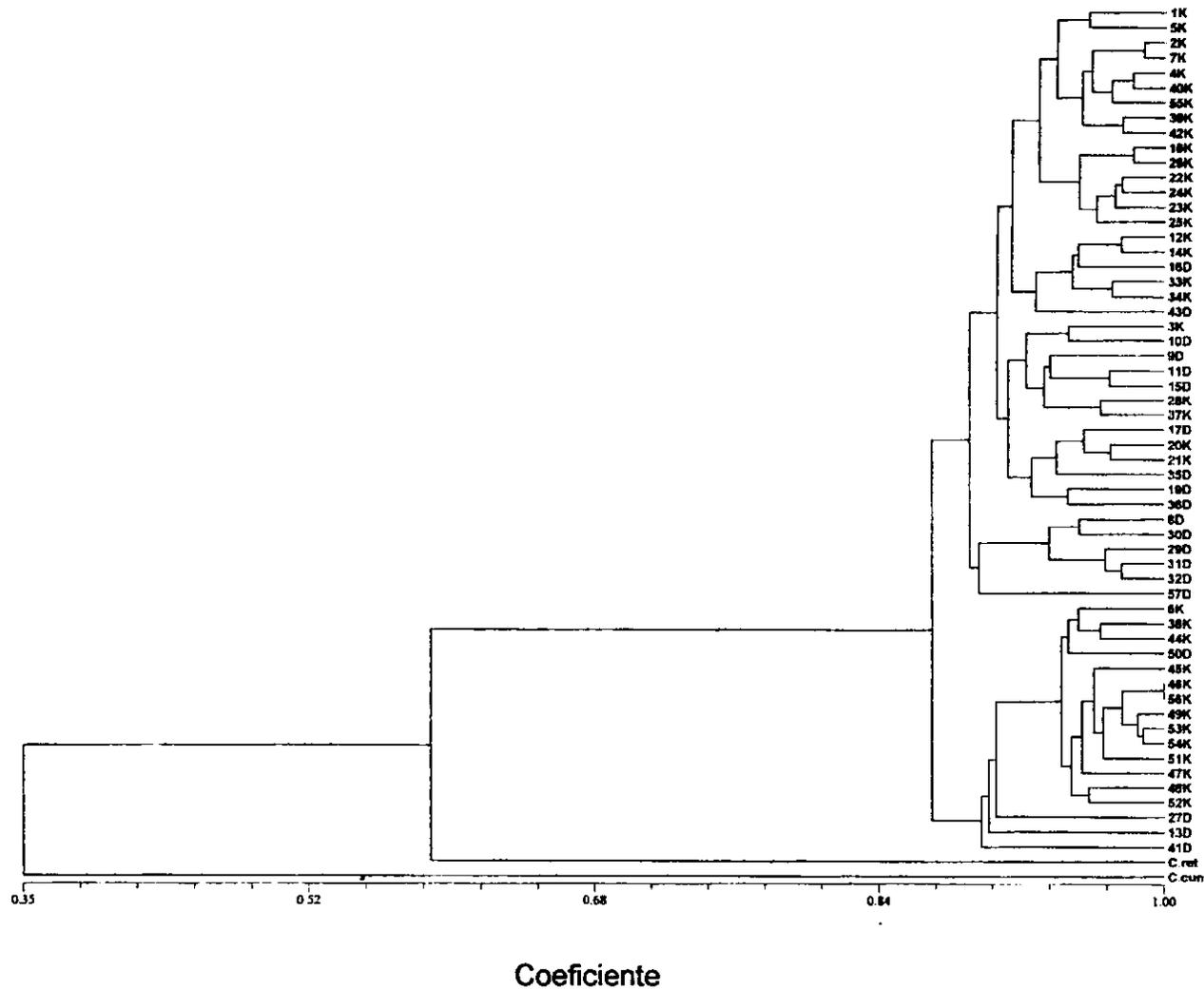


Figura 20. Relación genómica de tres especies del género *Cicer* establecida con características morfológicas y moleculares (huellas de ADN).

El dendrograma muestra 58 grupos detectado con el método del promedio (UPGMA) utilizando 174 datos que provienen del análisis morfológico y de ADN con las técnicas de MP-PCR y la técnica modificada de RAMP. *C. reticulatum* y *C. cuneatum* fueron separados en el análisis a una distancia de 0.60 aproximadamente y 0.35, sugiriendo una menor relación de ambas con *C. arietinum* L. *C. cuneatum* sigue manteniéndose con menor relación genómica respecto el resto de los genotipos.

## VI. PERSPECTIVAS

El uso de técnicas para marcadores moleculares ha sido ampliamente utilizada en varias disciplinas. Su utilidad en el mejoramiento de plantas se ha enfocado a una diversidad de aspectos, incluyendo el mejoramiento de resistencia a plagas y enfermedades, caracterización de germoplasma, tipificación de genomas y conocimiento de la diversidad genética de especies vegetales de importancia.

En el caso particular de *C. arietinum* L., ha sido difícil su fitomejoramiento por las características mismas del cultivo y su limitada variación genética; pero ha habido avances bastante considerables; como es el caso del incremento de la diversidad genética (expansión del contenido genético o “pool” de genes), donde los investigadores han recurrido a técnicas no convencionales, como es el mejoramiento por mutación y la hibridación intra o inter-específica, obteniéndose resultados satisfactorios (Singh et al., 1991). Desde el punto de vista de fitomejoramiento, se han utilizado las técnicas más costosas y extravagantes para detectar marcadores moleculares en el cultivo, que han permitido desde el establecimiento de cruzamientos específicos para favorecer la expresión de características de interés (Hüttel et al., 1999; Winter et al., 1999; Udupa et al., 1999; Udupa et al., 1998; Halila y Strange, 1997), hasta la elaboración de un mapa genético que se puede utilizar para la selección asistida y el etiquetamiento de genes (Simon y Muehlbauer, 1997; Kahl, 2000, comunicación personal).

Tomando en cuenta que el uso de técnicas para marcadores genéticos ha permitido un avance considerable en el estudio del cultivo de garbanzo; la modificación a la técnica de RAMP empleada en esta investigación, es una herramienta adicional que se puede utilizar de manera bastante confiable y sin riesgos de irradiación; ya que permite reproducir los resultados y detectar más fácilmente polimorfismos de ADN. Lo anterior hace de esta nueva alternativa una estrategia adicional que podría ser empleada para analizar cualquier genoma, utilizando prácticamente el mismo tiempo e insumos de laboratorio que cualquier metodología basada en la PCR (por ejemplo, la técnica de RAPDs o MP-PCR).

La diversidad genética estimada en este estudio en las colectas y variedades del germoplasma de garbanzo presente en México, indicó una variación que se podría considerar bastante amplia, ya que fue posible definir de manera individual a la mayoría de los genotipos con un coeficiente de 1.0; y a una distancia de 0.95 aproximadamente, fue posible agrupar a todos los genotipos en al menos 10 grupos diferentes. En todos los casos también hubo la separación de las dos especies silvestres, lo que indica una discriminación intra e inter-específica.

El hecho de contar con una variación genética amplia en México, incrementa la posibilidad de que existan genotipos y/o genes que pudieran ya no estar presentes en los cultivares de otros países y que tengan la capacidad de responder de mejor manera a las presiones de selección actuales. Lo anterior puede repercutir en un avance importante en el fitomejoramiento de este cultivo, en el sentido de incremento en la producción y en el abatimiento de enfermedades; sin embargo, esto deberá ser corroborado mediante el registro de los genotipos mexicanos en los bancos de germoplasma mundiales (ICRISAT e ICARDA), ya que en comunicación verbal, el ICRISAT comentó no tener conocimiento de algunos de los genotipos utilizados en el presente estudio (comunicación personal, 1999).

Actualmente no se tienen respuestas que expliquen de manera convincente la razón por la cual, los cultivares de garbanzo que se han venido utilizando en México muestran la calidad que los distingue a nivel mundial; pero es posible suponer varias razones; por ejemplo, contar con una diversidad genética y genómica amplia que se ha venido acumulando desde que el cultivo fue introducido a México y que no es del todo conocida ni explotada; no existencia en nuestro país de las razas agresivas de hongos *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* y *A. rabiei* que devastan al cultivo en otras partes del mundo; condiciones bióticas y abióticas favorables para el buen desarrollo del cultivo y desfavorables para algunos fitopatógenos; y/o estrategias de fitomejoramiento adecuado. Existe la posibilidad que este tipo de respuestas se puedan encontrar en algunos genotipos presentes en nuestro país, ya que los pocos que se han explotado desde el punto de vista agronómico, demuestran tener un potencial genético de buena calidad que

les permite soportar diferentes condiciones de estrés y expresar características de interés comercial (Gómez-Garza y Paredes 1984; Gómez-Garza, 1994).

Tomando en cuenta la variación reportada en el tamaño del genoma de *C. arietinum* L., no fue posible establecer con los resultados obtenidos en este trabajo, alguna relación entre el número de fragmentos de ADN (detectados con MP-PCR o la técnica modificada de RAMP) con el tipo de garbanzo Desi o Kabuli, pero sí fue posible observar una diferencia en este sentido entre la especie cultivada y las dos especies silvestres. Los geles de ADN referido en las Figuras 4, 5, 6 y 10 a 17, demuestran que independientemente de que el garbanzo pertenezca al grupo Desi o Kabuli, el número de fragmentos amplificados con cada una de las técnicas no varía (ver Cuadro 10), lo que podría sugerir dos cosas que podrían ser válidas al menos para las tres especies utilizadas en este trabajo;

- el tamaño de genoma de una especie en particular no necesariamente influye en el incremento de huellas de ADN.
- Si se comparan dos especies diferentes dentro del mismo género, independientemente del tamaño del genoma que las defina, es posible detectar variación en el número de fragmentos de ADN amplificados y polimorfismos.

Los resultados obtenidos en esta investigación apoyan estas aseveraciones, ya que si se observan los geles de las Figuras 4 y 6 principalmente, muestran una cantidad superior de fragmentos (la mayoría polimórficos) en las dos especies silvestres respecto a las detectadas en *C. arietinum* L. que no mostró muchas diferencias, independientemente de ser genotipos Desi o Kabuli. Por ejemplo, el microsatélite (GACA)<sub>4</sub> amplificó 11 fragmentos en *C. arietinum* L. y 18 fragmentos en las silvestres, con varios polimorfismos; mientras que el microsatélite (GGAT)<sub>4</sub> amplificó 6 fragmentos en *Cicer arietinum* L. y 13 fragmentos en los silvestres, también con varios polimorfismos (datos no mostrados).

El apoyo que este tipo de estudios puede proporcionar a los fitomejoradores al observar una determinada gráfica o dendrograma, es la opción a seleccionar genotipos

alternativos, que morfológicamente o a nivel de ADN, pueden ser equivalentes a aquellos que se han explotado de manera tradicional; sin embargo es posible que su selección requiera de considerar otros aspectos tales como características culinarias, resistencia a enfermedades y plagas o tolerancia a ciertos factores de estrés, propios de la región donde se cultive. En caso de buscar genotipos nuevos que sirvan como base para iniciar un programa de fitomejoramiento; el investigador podría optar por aquellos que presenten una mayor relación con las especies silvestres; e incluso, establecer hibridaciones inter-específicas con *C. reticulatum*. En este sentido, si se observa la Figura 1, se puede apreciar que el genotipo 9 es de los más cercanos a dicha especie y puede representar una opción para contar con una combinación de genes heterólogos o nuevos en los híbridos resultantes. Pero si se observa la Figura 18, la cantidad de opciones se incrementa; ya que *C. reticulatum* comparte información con una cantidad de genotipos más amplia; por lo que se podría suponer que dichos genotipos pueden tener una fuente de alelos silvestres considerables.

## VII. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se pueden concluir los siguientes aspectos:

Los marcadores moleculares fueron eficientes para estimar la diversidad genética de *Cicer arietinum* L. y establecer una diferenciación intra-específica.

La estimación de la diversidad genética de *C. arietinum* L. con la técnica MP-PCR no fue lo suficientemente informativa; ya que la cantidad de iniciadores de microsatélites utilizada no fue la adecuada; sin embargo el análisis con una mayor cantidad de iniciadores podría detectar polimorfismos que permitan una discriminación intra e inter-específica.

El iniciador de microsatélite que menos información detectó en las colectas y variedades de *C. arietinum* L. fue (GATA)<sub>4</sub> ya que amplificó una sola banda y 0 polimorfismos.

Uno de los factores determinantes para la detección de las huellas con MP-PCR y la técnica modificada de RAMP es la temperatura, puesto que si no se considera la más adecuada para el iniciador o iniciadores en función de su longitud y tipo de bases nitrogenadas, los patrones de ADN pueden no ser constantes, reproducibles o nítidos.

La modificación e implementación de la técnica RAMP para análisis de ADN realizada en la presente investigación resultó ser bastante eficiente, ya que con ella se detectaron la mayor cantidad de polimorfismos en las tres especies de *Cicer*, además de que fue posible establecer diferenciación inter e intra-específica.

Los iniciadores que detectaron una mayor cantidad de polimorfismos en las tres especies de *Cicer*, fueron (GACA)<sub>4</sub> + G-09 utilizados en la técnica modificada de RAMP.

Los dendrogramas realizados con una mayor cantidad de características (por ejemplo RAMP o la combinación de datos morfológicos y de ADN) nos permiten apreciar, además de la diversidad genética existente, el posible parentesco o relación cercana entre individuos del grupo Desi y Kabuli.

Con base a la experiencia en *C. arietinum* L., es conveniente (y en algunos casos necesario) utilizar la mayor cantidad de marcadores disponibles, ya que dependiendo del grado de selección que tenga el cultivo, es más difícil detectar sus diferencias por la homología de sus genomas.

No fue posible agrupar los diferentes genotipos estudiados tomando en función de su origen, lo que puede indicar que la selección y conservación del germoplasma de garbanzo existente en México ha sido con base a la adaptabilidad y posible respuesta a factores agronómicos de interés.

La búsqueda de polimorfismos en las regiones no codificantes de los genomas de los organismos (90 a 95%) son mucho más informativos que los presentes en las regiones codificantes; de allí la importancia de buscarlos en este tipo de secuencias (Beebee y Burke, 1992).

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmad, F. and A. E. Slinkard.** 1992. Genetic relationships in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. *Theor. Appl. Genet.* 84: 688-692.
- Ahn, S. and S. D. Tanksley.** 1993. Comparative linkage map of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7980-7984.
- Al-Zahim, M., H. J. Newbury and B. V. Ford-Lloyd.** 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *HortScience* 32 (6): 1102- 1104.
- Andrade, A. E.** 1979. Chickpea in México. Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement. Hyderabad, India: 246-248.
- Arumuganathan K. and E. Earle.** 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
- Barrera, H. A., R. Ortiz, A. Rojas y D. Reséndez.** 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo* 18: 50-60.
- Barrón, J. M. and A. Espinoza.** 1993. Fortification of maize tortilla with alkali-treated chickpea flour. *Int. J. Food Sci. and Tech.* 28: 505-511.
- Beebe, S. E., I. Ochoa, Paul Skroch, J. Nienhuis and J. Tivang.** 1995. Genetic diversity among common bean breeding lines developed for Central America. *Crop Sci.* 35: 1178-1183.
- Beebe, T. And J. Burke.** 1992. Gene structure and transcription. 2<sup>nd</sup>. Ed. IRL Press, N.Y. 89 p.
- Bennett, D. M. and I. J. Leitch.** 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms -583 New estimates. *Ann. Bot* 80: 169-196.
- Berger, G. U. and H. C. Minor.** 1999. An RFLP marker associated with resistance to *Phomopsis* seed decay in soybean PI417479. *Crop Sci.* 39: 800-805.
- Bierwerth, S., G. Kahl, F. Weigand and K. Weising.** 1992. Oligonucleotide fingerprinting of plant and fungal genomes: A comparison of radioactive, colorigenic and chemiluminescent detection methods. *Electrophoresis* 13: 115-122.
- Bradley, K. F., M. A. Rieger and G. G. Collins.** 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Aust. J. of Exp. Agric.* 36: 613-618.
- Caetano-Anollés, G., B. J. Bassam and P. M. Greshoff.** 1991. DNA amplifications fingerprinting: A strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 294-307.
- Caetano Anollés, G. and P.M. Gresshoff.** 1997. DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-VCH, N.Y. 364 p.
- Castagna, R., S. Gnocchi, M. Perenzin and M. Heun.** 1997. Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 424-430.

- Chen, H. B., J. M. Martin, M. Lavin and L. E. Talbert.** 1994. Plant Genetic Resources: Genetic diversity in hard red spring wheat based on sequence-tagged-site PCR markers. *Crop Sci.* 34: 1628-1632.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks.** 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Delgado, S. A.** 1999. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of phaseolus (Fabaceae). *Syst. Bot.* 24: 438-460.
- Duke, A.J.** 1981. *Handbook of Legumes of World Economic Importance.* Plenum Press, N.Y. London. 52-57.
- Furman, B. J., D. Grattapaglia, W. S. Dvorak and D. M. O'Malley.** 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Mol. Ecol.* 6: 321-331.
- Gómez-Garza, R. M.** 1994. Blanco Sinaloa-92: Nueva variedad de garbanzo para el noroeste de México. Folleto Técnico No. 13, 2da. ed. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Valle de Culiacán. INIFAP, SARH, 11 p.
- Gómez-Garza, R. M. y Paredes, V. P.** 1989. El cultivo de garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto Técnico No. 4, 3a. ed. Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias en el Estado de Sinaloa. Campo Experimental Valle de Culiacán. INIFAP, SARH, 33 p.
- Hajj, M. E., T. Millán, J. Gil and J. I. Cubero.** 1996. Variability and genome length estimation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) revealed by RAPD analysis. *J. Genet. & Breed.* 51: 83-85.
- Halla, M. H. and R. N. Strange.** 1997. Screening of Kabuli chickpea germplasm for resistance to Fusarium wilt. *Euphytica* 96: 273-279.
- Hegstad, J. M., C. D. Nickell and L. O. Vodkin.** 1998. Identifying resistance to *Phytophthora sojae* in selected accessions using RFLP techniques. *Crop Sci.* 38: 50-55.
- Holezel, A. R.** 1992. *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach.* IRL Press. Oxford University Press. New York. 315 pp.
- Hüttel B., P. Winter and G. Kahl.** 1997. Generation on Simple Repetitive Sequence-mediated DNA markers for the analysis of chickpea populations. In: *DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea.* International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria. 127-142.
- Hüttel, B., P. Winter, K. Weising, W. Choumane, F. Weigand and G. Kahl.** 1999. Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 42: 210-217.
- IBPGR, ICRISAT and ICARDA.** 1993. *Descriptors for chickpea (Cicer arietinum L.).* International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy; International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India and International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Innis, A. M., D. H. Gelfand and J. J. Sninsky.** 1995. *PCR Strategies.* Academic Press, Inc. USA. 373 p.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein.** 1985. (a). Hypervariable "minisatellite" region human DNA. *Nature* 314: 67-73.

- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein.** 1985. (b). Individual specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316: 76-79.
- Jiménez, D. R. M.** 1994. La fusariosis vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*: Quince años de onvestigación en España. *Invest. Agrar. Fuera de Serie* (2): 285-294.
- Kaemmer, D., J. Ramser, M. Schön, F. Weigand, M. C. Saxena, A. J. Driesel, G. Kahl and K. Weising.** 1992. DNA fingerprinting of fungal genomes: A case study with *Ascochyta rabiei*. *Adv. in Mol. Gen.* 5: 255-270.
- Kahl G.** 1995. *Dictionary of Gene Technology*. VCH. Federal Republic of Germany. 550 p.
- Karp, A., S. Kresovich, K. V. Bhat, W. G. Ayad and T. Hodgkin.** 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources institute. Tech. bulletin No. 2, 47 p.
- Kazan, K., F. J. Muehlbauer, N. F. Weeden and G. Ladizinsky.** 1993. Inheritance and linkage relationships of morphological and isozyme loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 86: 417-426.
- Kirby, T. L.** 1992. *DNA Fingerprinting: an introduction*. W.H. Freeman and Company. Copyright. USA. 365 p.
- Kusmenoglu, I., F. J. Muehlbauer and K. Kazan.** 1992. Inheritance of isozyme variation in ascochyta blight-resistant chickpea lines. *Crop Sci.* 32: 121-127.
- Krawczak, M. and J. Schmidtke.** 1998. *DNA Fingerprinting*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Springer-Verlag, N.Y. 113 p.
- Mayer, M. S., A. Tullu, C. J. Simon, J. Kumar, W. J. Kaiser, J. M. Kraft and F. J. Muehlbauer.** 1997. Development of a DNA marker for *Fusarium* wilt resistance in chickpea. *Crop Sci.* 37: 1625-1629.
- Maughan, P. J., M. A. Saghai Maroof and G. R. Buss.** 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 38: 715-723.
- Morjane, H., J. Geistlinger, M. Harrabi, K. Weising and G. Kahl.** 1994. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta* isolates from a single chickpea field in Tunisia. *Curr. Genetics* 26: 191-197.
- Moussa, E. J., T. Millán, J. Gil and J. I. Cubero.** 1996. Variability and genome length estimation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) revealed by RAPD analysis. *J. Genet & Breed.* 51: 83-85.
- Moxon, R. E. and C. Wills.** 1999. DNA Microsatellites: Agents of Evolution?. *Sci. Am.* 280 (1): 72-77.
- Muehlbauer, F. J., W. J. Kaiser and I. Kusmenoglu.** 1998 a. Registration of "Sanford" Chickpea. *Crop Sci.* 38: 282.
- Muehlbauer, F. J., W. J. Kaiser and I. Kusmenoglu.** 1998 b. Registration of "Dwelley" Chickpea. *Crop Sci.* 38: 282-283.
- Nene, Y. L. and M. P. Haware.** 1980. Screening chickpea for resistance to wilt. *Plant Dis.* 64: 379-380.

- Nybohm, H., J. Ramser, D. Kaemmer, G. Kahl and K. Weising.** 1992. Oligonucleotide DNA fingerprinting detects a multiallelic locus in box elder (*Acer negundo*). *Mol. Ecol.* 1: 65-67.
- Ohri, D. and M. Pal.** 1990. The origin of chickpea (*Cicer arietinum* L.): karyotype and nuclear DNA amount. *Heredity* 66: 367-372.
- Pääbo, S.** 1989. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1939-1943.
- Pejic, I., P. Ajmone-Marsan and M. Morgante.** 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
- Pérez de la V. M.** 1997. El uso de Marcadores Moleculares en Genética Vegetal y Mejora. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 12 (1, 2 y 3): 33-60.
- Phillips, L. D. and I. K. Vasil.** 1994. DNA-based markers in Plants. Kluwer Academic Publishers. USA. 384 p.
- Plaschke, J., M. W. Ganai and M. S. Röder.** 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1001-1007.
- Poulsen, G. B., G. Kahl and K. Weising.** 1993. Abundance and polymorphism of simple repetitive DNA sequences in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* 85: 994-1000.
- Powell, W., G. C. Machray and J. Provan.** 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci.* 1: 215-222.
- Rabinow, P.** 1996. Making PCR. A story of Biotechnology. The University Chicago Press. USA. 190 p.
- Ramser, J., C. López-Peralta, R. Wetzel, K. Weising and G. Kahl.** 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 39: 17-25.
- Ramser, J., K. Weising, V. Chikaleke and G. Kahl.** 1997. Increased Informativeness of RAPD Analysis by Detection of Microsatellite Motifs. *BioTechniques* 23: 285-290.
- Robertson, L. D., K. B. Singh and B. Ocampo.** 1995. A Catalog of Annual Wild *Cicer* Species. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria. 171 p.
- Rohlf, F. J.** 1997. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.00. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
- Sambrook, D. J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Senior, M. L. and M. Heun.** 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889.
- Sharma, P. C., P. Winter, T. Bünger, B. Hüttel, F. Weigand, K. Weising and G. Kahl.** 1995. Abundance and polymorphism of di-, tri- and tetranucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. and Appl. Genet.* 90: 90-96.

- Sharma, P. C., P. Winter, T. Bunger, B. Huttel and G. Kahl.** 1997. Expanding the repertoire of molecular markers for resistance breeding in chickpea. In: DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria. 175-198.
- Simon, C. J. and F. J. Muehlbauer.** 1997. Construction of a chickpea linkage map and its comparison with maps of pea and lentil. *J. Hered.* 88: 115-119.
- Singh, K. B., L. Holly and G. Bejiga.** 1991. A Catalog of Kabuli Chickpea Germplasm. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria. 398 pp.
- Sokal R. R. and A.P.H. Sneath.** 1963. Principles of numerical taxonomy. Copyright. USA. 359 p.
- Staub, E. J. and F. C. Serquen.** 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31 (5): 729-741.
- Tanksley, S.D., M. W. Ganai, J. P. Price, M. C. de Vicente, M. W. Fulton, H. Giovanonni, S. Grandillo, G. B. Martin, R. Messeguer, L. Miller, A. H. Patterson, O. Pineda, M. Roder, R. A. Wing, W. Wu and N. D. Young.** 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes; biological inferences and practical applications. *Genetics* 132: 1141-1160 pp.
- Udupa, S. M. and F. Weigand.** 1997. Genotyping with micrisatellite and RAPD markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen on chickpea. In: DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria. 67-77.
- Udupa S. M., F. Weigand, M. C. Saxena y G. Kahl.** 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochita blight pathogen of chickpea. *Theor. Appl. Genet.* 97: 299-307.
- Udupa, S. M., L. D. Robertson, F. Weigand, M. Baum and G. Kahl.** 1999. Allelic variation at (TAA)<sub>n</sub> microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Mol Gen Genet.* 261: 354-363.
- van Rheenen, H. A.** 1991. Chickpea breeding -progress and prospects. *Plant Breed. Abstr.* 61 (9): 997-1009.
- Valadez, M. E. y G. Kahl.** 2000. Huellas de DNA en Genomas de Plantas (Teora y Protocolos de Laboratorio). Mundiprensa. 182 p.
- Vignani, R., J. E. Bowers and C. P. Meredith.** 1996. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* "Sangiovese". *Scientia Horticulturae.* 65: 163-169.
- Vallejo, C. E., N. S. Sakiyama and C. D. Chase.** 1992. A molecular marker-based linkage of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131: 733-740.
- Welsing, K., D. Kaemmer, F. Weigand, J. T. Epplen and G. Kahl.** 1992. Oligonucleotide fingerprinting reveals various probe-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 35: 346-442.
- Welsing, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer.** 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. USA. 322 p.

- Welsing, K., P. Winter, B. Hüttel and G. Kahl.** 1998. Microsatellite markers for molecular breeding. *Crop Sci.: Recent Advances* 1 (1): 113-143.
- Welsh, J., K. Chada, S.S. Dalal, R. Cheng, D. Ralph and M. McClelland.** 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 4965-4970
- Winter, P. and G. Kahl.** 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 438-448.
- Winter, P.** 1997. Development and use of molecular markers for chickpea improvement. In: *DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea*. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria. 153-174.
- Winter, P. T. Pfaff, S. M. Udupa, B. Hüttel, P. C. Sharma, S. Sahi, R. Arreguín-Espinoza, F. Weigand, F. J. Muehlbauer and G. Kahl.** 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol. Gen. Genet.* 262: 90-101.
- Wu, K-S. And S. D. Tanksley.** 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235.
- Yang, W., A. C. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz and J. L. Bennetzen.** 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinese sorghums. *Crop Sci.* 36: 1669-1676.
- Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L. and Stead, D. E.** 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 67-105.

## ANEXO

### MATRIZ DE COEFICIENTES DE SIMILARIDAD

(Comparación de las similitudes entre cada individuo representante del germoplasma de garbanzo cultivado *Cicer arietinum* L., y dos especies silvestres, *Cicer reticulatum* y *Cicer cuneatum*.)

	1K	2K	3K	4K	5K	6K	7K	8D
1K	1							
2K	0.9386503	1						
3K	0.9506173	0.9333333	1					
4K	0.962963	0.969697	0.9638554	1				
5K	0.9567901	0.9515152	0.9221557	0.9337349	1			
6K	0.9197531	0.9272727	0.9216867	0.9575758	0.9036145	1		
7K	0.9440994	0.9878049	0.939759	0.969697	0.9638554	0.9393939	1	
8D	0.8841463	0.8727273	0.9156627	0.9036145	0.873494	0.8606061	0.8787879	1
9D	0.9079755	0.8773006	0.9268293	0.9079755	0.902439	0.8780488	0.8902439	0.9212121
10D	0.9151515	0.8969697	0.9461078	0.9216867	0.8922156	0.8795181	0.8975904	0.9464286
11D	0.8834356	0.8773006	0.9085366	0.902439	0.8536585	0.8650307	0.8834356	0.9337349
12K	0.9390244	0.9518072	0.9520958	0.9341317	0.9461078	0.8975904	0.9578313	0.8982036
13D	0.8518519	0.8658537	0.8855422	0.8969697	0.8554217	0.9030303	0.8727273	0.8855422
14K	0.9074074	0.9325153	0.9454545	0.9146341	0.9333333	0.8841463	0.9512195	0.9090909
15D	0.8819876	0.8895706	0.9272727	0.9207317	0.8545455	0.8780488	0.8963415	0.9329268
16D	0.8757764	0.931677	0.9202454	0.9135802	0.8957055	0.8703704	0.9382716	0.9090909
17D	0.8765432	0.8957055	0.9212121	0.9268293	0.8606061	0.8841463	0.902439	0.9161677
18K	0.9085366	0.9268293	0.9337349	0.9575758	0.9156627	0.9151515	0.9272727	0.8982036
19D	0.8597561	0.8787879	0.8975904	0.9090909	0.8554217	0.8674699	0.8787879	0.9221557
20K	0.8773006	0.8963415	0.9036145	0.9272727	0.8975904	0.8969697	0.9090909	0.8928571
21K	0.8895706	0.902439	0.9096386	0.9333333	0.8915663	0.9030303	0.9151515	0.9277108
22K	0.9141104	0.9085366	0.9277108	0.9393939	0.9096386	0.9090909	0.9212121	0.8682635
23K	0.8987342	0.9245283	0.925	0.9375	0.89375	0.9056604	0.9308176	0.8695652
24K	0.9197531	0.9390244	0.9515152	0.9636364	0.9151515	0.9329268	0.9512195	0.8975904
25K	0.9151515	0.8975904	0.9281437	0.9281437	0.9101796	0.8975904	0.9096386	0.875
26K	0.9151515	0.9096386	0.9161677	0.9401198	0.9341317	0.9096386	0.9216867	0.8869048
27D	0.88125	0.9074074	0.8711656	0.9079755	0.8895706	0.9259259	0.9135802	0.8181818
28K	0.8780488	0.873494	0.9281437	0.9041916	0.8862275	0.873494	0.8915663	0.9345238
29D	0.8765432	0.8841463	0.8909091	0.8666667	0.9212121	0.8353659	0.902439	0.9277108
30D	0.8727273	0.8373494	0.8915663	0.8674699	0.873494	0.8373494	0.8545455	0.9520958
31D	0.8719512	0.8909091	0.8855422	0.873494	0.9156627	0.8424242	0.9090909	0.9401198
32D	0.8606061	0.8915663	0.8862275	0.8742515	0.9041916	0.8433735	0.9096386	0.952381
33K	0.8614458	0.9216867	0.9161677	0.9041916	0.9221557	0.873494	0.939759	0.8757396
34K	0.8909091	0.9457831	0.9341317	0.9221557	0.9161677	0.8915663	0.9578313	0.8690476
35D	0.8588957	0.8650307	0.8963415	0.8963415	0.8719512	0.8711656	0.8895706	0.9036145

36D	0.8650307	0.8727273	0.9096386	0.9036145	0.8674699	0.8787879	0.8969697	0.9401198
37K	0.9079755	0.8975904	0.9401198	0.9281437	0.8862275	0.8855422	0.9036145	0.9401198
38K	0.902439	0.9090909	0.8975904	0.9333333	0.8795181	0.9518072	0.9151515	0.8433735
39K	0.9393939	0.9518072	0.9401198	0.9760479	0.9101796	0.9578313	0.9457831	0.8928571
40K	0.945122	0.9515152	0.9515152	0.9818182	0.9272727	0.9515152	0.9634146	0.8915663
41D	0.8787879	0.873494	0.9036145	0.8855422	0.8614458	0.8855422	0.8727273	0.8682635
42K	0.9390244	0.9518072	0.939759	0.9759036	0.9096386	0.9337349	0.9454545	0.8922156
43D	0.8969697	0.9156627	0.9101796	0.8922156	0.9281437	0.8674699	0.9277108	0.8869048
44K	0.8841463	0.8915663	0.8862275	0.9161677	0.8682635	0.9518072	0.9036145	0.827381
45K	0.9085366	0.9030303	0.8975904	0.9036145	0.9036145	0.9272727	0.9151515	0.8143713
46K	0.9036145	0.9036145	0.9161677	0.9341317	0.8982036	0.9578313	0.9216867	0.8284024
47K	0.8795181	0.8674699	0.8922156	0.8982036	0.8982036	0.9216867	0.8855422	0.816568
48K	0.9030303	0.8848485	0.9041916	0.9156627	0.8862275	0.9457831	0.8855422	0.8214286
49K	0.9018405	0.8841463	0.8909091	0.9090909	0.8848485	0.9329268	0.8963415	0.8083832
50D	0.8650307	0.8727273	0.8795181	0.8975904	0.8493976	0.9454545	0.8848485	0.8095238
51K	0.8780488	0.8606061	0.8674699	0.8855422	0.8855422	0.9090909	0.8727273	0.797619
52K	0.9192547	0.9018405	0.9146341	0.9329268	0.9085366	0.9447853	0.9207317	0.8373494
53K	0.9090909	0.8915663	0.8982036	0.9161677	0.8922156	0.939759	0.9036145	0.8154762
54K	0.8915663	0.8795181	0.8862275	0.9041916	0.8802395	0.9277108	0.8915663	0.7988166
55K	0.9454545	0.939759	0.9520958	0.9700599	0.9341317	0.9457831	0.9578313	0.8690476
56K	0.9090909	0.9036145	0.9161677	0.9341317	0.8982036	0.9578313	0.9216867	0.8333333
57D	0.8650307	0.902439	0.8727273	0.8787879	0.8909091	0.8536585	0.9207317	0.8742515
C. reticulatum	0.5796178	0.5732484	0.5859873	0.5732484	0.5732484	0.5605096	0.5859873	0.572327
C. cuneatum	0.3575758	0.3597561	0.3454545	0.3515152	0.3393939	0.3292683	0.3536585	0.3712575

9D	10D	11D	12K	13D	14K	15D	16D	17D	18K
1									
0.9101796	1								
0.9207317	0.9281437	1							
0.9030303	0.922619	0.8975904	1						
0.8606061	0.9101796	0.8902439	0.8674699	1					
0.9207317	0.9041916	0.8963415	0.9759036	0.8536585	1				
0.9509202	0.939759	0.9693252	0.9096386	0.9085366	0.9212121	1			
0.9146341	0.9096386	0.9079755	0.945122	0.8841463	0.9575758	0.9509202	1		
0.8963415	0.8862275	0.9146341	0.9030303	0.8787879	0.9212121	0.9329268	0.9272727	1	
0.8855422	0.9053254	0.8915663	0.9341317	0.9216867	0.9096386	0.9151515	0.9030303	0.9337349	1
0.9096386	0.9047619	0.8848485	0.8975904	0.873494	0.8969697	0.9329268	0.9146341	0.9216867	0.9281437
0.8909091	0.875	0.8787879	0.9036145	0.8795181	0.9212121	0.9085366	0.9030303	0.9520958	0.9580838
0.8969697	0.8988095	0.9036145	0.9101796	0.8727273	0.9277108	0.9151515	0.9085366	0.9575758	0.9520958
0.9151515	0.8869048	0.8727273	0.9277108	0.8674699	0.9212121	0.9085366	0.902439	0.9277108	0.9464286
0.8867925	0.8950617	0.86875	0.9259259	0.8553459	0.9192547	0.8993711	0.9056604	0.918239	0.9440994
0.9141104	0.9156627	0.8963415	0.9518072	0.8902439	0.945122	0.9325153	0.9259259	0.9390244	0.9698795
0.9156627	0.8934911	0.8922156	0.9230769	0.8554217	0.9161677	0.8975904	0.8848485	0.9036145	0.9404762
0.9036145	0.8934911	0.8742515	0.9112426	0.9036145	0.9041916	0.8975904	0.8848485	0.9156627	0.9821429
0.8509317	0.847561	0.8148148	0.8658537	0.8641975	0.8641975	0.8385093	0.863354	0.8711656	0.8658537
0.9212121	0.9047619	0.9216867	0.8988095	0.8554217	0.9337349	0.9272727	0.8902439	0.9216867	0.9101796
0.9146341	0.9156627	0.8963415	0.9036145	0.8606061	0.9393939	0.9079755	0.9329268	0.8963415	0.8666667
0.9216867	0.9107143	0.8855422	0.8511905	0.8484848	0.8795181	0.8969697	0.8780488	0.8787879	0.8622754
0.9212121	0.9107143	0.8855422	0.9047619	0.8545455	0.9341317	0.8909091	0.9333333	0.8909091	0.8682635
0.9156627	0.9112426	0.9041916	0.9171598	0.8614458	0.9461078	0.9036145	0.9393939	0.8975904	0.8809524
0.8742515	0.8764706	0.8571429	0.9349112	0.8682635	0.9580838	0.9036145	0.9457831	0.9041916	0.9230769
0.8915663	0.887574	0.8682635	0.9408284	0.8493976	0.9640719	0.9096386	0.9454545	0.9036145	0.9047619
0.8957055	0.8915663	0.902439	0.8795181	0.8895706	0.9030303	0.9207317	0.9207317	0.9393939	0.9212121

0.9454545	0.9341317	0.9272727	0.8922156	0.8915663	0.9151515	0.9573171	0.9329268	0.9151515	0.9096386
0.9329268	0.9101796	0.9454545	0.922619	0.8674699	0.9393939	0.9454545	0.9079755	0.9515152	0.9216867
0.8614458	0.8630952	0.8484848	0.8862275	0.9212121	0.873494	0.8666667	0.8536585	0.8727273	0.9041916
0.8855422	0.9112426	0.8922156	0.9230769	0.8795181	0.8982036	0.9096386	0.8909091	0.9096386	0.9404762
0.9030303	0.9161677	0.9030303	0.9401198	0.8963415	0.9212121	0.9207317	0.9141104	0.9390244	0.9698795
0.8915663	0.8809524	0.8614458	0.9047619	0.8909091	0.9036145	0.8848485	0.8841463	0.8909091	0.8742515
0.8848485	0.9101796	0.8909091	0.9221557	0.8787879	0.8969697	0.9146341	0.8895706	0.9212121	0.939759
0.8975904	0.9230769	0.8622754	0.9467456	0.8493976	0.9341317	0.8795181	0.9272727	0.873494	0.8928571
0.8484848	0.8511905	0.8373494	0.875	0.8975904	0.8674699	0.8545455	0.847561	0.8855422	0.8922156
0.8545455	0.8511905	0.8373494	0.8869048	0.8909091	0.8802395	0.8363636	0.8545455	0.8484848	0.8682635
0.8742515	0.8529412	0.8392857	0.8816568	0.9221557	0.8742515	0.8674699	0.8614458	0.8742515	0.8994083
0.8622754	0.8411765	0.8154762	0.8579882	0.9221557	0.8502994	0.8433735	0.8373494	0.8502994	0.9053254
0.8622754	0.8411765	0.8383234	0.8690476	0.8982036	0.8502994	0.8433735	0.8373494	0.8502994	0.8757396
0.8597561	0.8443114	0.8181818	0.8562874	0.8963415	0.8493976	0.8414634	0.8363636	0.8545455	0.873494
0.8353659	0.8443114	0.8181818	0.8443114	0.8969697	0.8363636	0.8414634	0.8353659	0.8614458	0.8614458
0.8363636	0.8333333	0.7951807	0.8333333	0.8969697	0.8313253	0.8181818	0.8181818	0.8493976	0.8742515
0.8834356	0.8606061	0.8466258	0.8787879	0.8895706	0.8719512	0.8650307	0.8588957	0.8848485	0.8963415
0.8674699	0.852071	0.8263473	0.8639053	0.9036145	0.8562874	0.8493976	0.8424242	0.8554217	0.8809524
0.8562874	0.8352941	0.8095238	0.852071	0.8922156	0.8502994	0.8373494	0.8373494	0.8562874	0.8698225
0.9096386	0.8934911	0.8802395	0.9171598	0.873494	0.9101796	0.9036145	0.8969697	0.9096386	0.9345238
0.873494	0.8579882	0.8443114	0.8816568	0.9216867	0.8742515	0.8674699	0.8606061	0.873494	0.8988095
0.902439	0.8742515	0.8727273	0.9036145	0.8545455	0.9151515	0.8957055	0.9329268	0.8969697	0.873494
0.6352201	0.58125	0.5886076	0.572327	0.5350318	0.5822785	0.611465	0.6050955	0.5859873	0.5660377
0.369697	0.3690476	0.3975904	0.3413174	0.3515152	0.3575758	0.3719512	0.3719512	0.3757576	0.3353293

19D	20K	21K	22K	23K	24K	25K	26K	27D	28K
1									
0.9221557	1								
0.939759	0.9698795	1							
0.9221557	0.9401198	0.9457831	1						
0.9125	0.93125	0.931677	0.96875	1					
0.9333333	0.9515152	0.9575758	0.9759036	0.9751553	1				
0.8982036	0.9161677	0.9285714	0.9700599	0.9447853	0.9700599	1			
0.9101796	0.9520958	0.9464286	0.9640719	0.9325153	0.9640719	0.9529412	1		
0.8282209	0.8597561	0.8650307	0.8841463	0.90625	0.8848485	0.8666667	0.8727273	1	
0.8982036	0.9161677	0.9520958	0.8922156	0.882716	0.9161677	0.9053254	0.9053254	0.8242424	1
0.8787879	0.8787879	0.9090909	0.8787879	0.8509317	0.8787879	0.8742515	0.8862275	0.8404908	0.9221557
0.8922156	0.8614458	0.8922156	0.8674699	0.8395062	0.8674699	0.8757396	0.8757396	0.8231707	0.9107143
0.8915663	0.8795181	0.9101796	0.8674699	0.8527607	0.8795181	0.8639053	0.8757396	0.8597561	0.9107143
0.9041916	0.8862275	0.922619	0.8622754	0.8650307	0.8922156	0.8764706	0.8764706	0.830303	0.9349112
0.8869048	0.922619	0.9166667	0.9047619	0.9202454	0.9341317	0.9058824	0.9176471	0.8545455	0.9171598
0.8802395	0.8982036	0.9107143	0.9101796	0.9325153	0.9401198	0.9117647	0.9	0.8787879	0.9112426
0.9085366	0.9515152	0.9272727	0.8902439	0.88125	0.9085366	0.8862275	0.9101796	0.8404908	0.9156627

0.9457831	0.9156627	0.939759	0.9036145	0.8881988	0.9216867	0.8988095	0.8988095	0.8353659	0.9345238
0.8975904	0.9277108	0.9337349	0.9036145	0.8944099	0.9277108	0.9047619	0.9047619	0.8353659	0.9642857
0.8562874	0.8855422	0.8922156	0.8975904	0.9068323	0.9212121	0.8869048	0.8988095	0.9141104	0.8622754
0.8922156	0.9101796	0.9166667	0.9221557	0.9325153	0.9461078	0.9117647	0.9235294	0.8909091	0.887574
0.9216867	0.9454545	0.9518072	0.9575758	0.9440994	0.9757576	0.9404762	0.952381	0.8957055	0.9041916
0.8742515	0.8674699	0.8742515	0.8674699	0.8703704	0.8855422	0.8639053	0.852071	0.8902439	0.8630952
0.9041916	0.9216867	0.9156627	0.9216867	0.931677	0.9457831	0.9107143	0.922619	0.8902439	0.8869048
0.8922156	0.8742515	0.8928571	0.8862275	0.9018405	0.9101796	0.8823529	0.8823529	0.8727273	0.8816568
0.8443114	0.8982036	0.8922156	0.8982036	0.8950617	0.9041916	0.8698225	0.8816568	0.8969697	0.8461538
0.8192771	0.8554217	0.8622754	0.8795181	0.8773006	0.8855422	0.8816568	0.8698225	0.902439	0.8452381
0.8511905	0.8809524	0.8869048	0.9047619	0.8834356	0.9101796	0.8882353	0.9	0.9030303	0.8639053
0.8392857	0.8809524	0.875	0.8988095	0.8711656	0.8922156	0.8882353	0.9117647	0.8848485	0.852071
0.827381	0.8452381	0.8511905	0.8809524	0.8518519	0.8795181	0.8934911	0.8816568	0.8841463	0.8452381
0.8242424	0.8614458	0.8674699	0.8969697	0.882716	0.8848485	0.875	0.8869048	0.9207317	0.8383234
0.8253012	0.8443114	0.8493976	0.8554217	0.863354	0.873494	0.8392857	0.8511905	0.9151515	0.827381
0.813253	0.8802395	0.8622754	0.8795181	0.8580247	0.8614458	0.852071	0.887574	0.9030303	0.827381
0.847561	0.8909091	0.8841463	0.9146341	0.8867925	0.9085366	0.8975904	0.9096386	0.8773006	0.8614458
0.8323353	0.8622754	0.8690476	0.8982036	0.8773006	0.8922156	0.8823529	0.8941176	0.9212121	0.8461538
0.8214286	0.8630952	0.8690476	0.8988095	0.8711656	0.8802395	0.8705882	0.8823529	0.9212121	0.8343195
0.8862275	0.9161677	0.922619	0.9401198	0.9202454	0.9461078	0.9235294	0.9352941	0.8909091	0.8994083
0.8502994	0.8802395	0.8869048	0.9041916	0.8834356	0.9101796	0.8882353	0.9	0.9030303	0.8639053
0.873494	0.8855422	0.8787879	0.8855422	0.8765432	0.8909091	0.8622754	0.8742515	0.8650307	0.8502994
0.591195	0.5759494	0.5696203	0.6139241	0.6428571	0.5987261	0.59375	0.58125	0.6258065	0.5597484
0.3373494	0.3554217	0.3493976	0.3554217	0.3726708	0.3575758	0.3630952	0.3392857	0.3865031	0.3532934

29D

30D

31D

32D

33K

34K

35D

36D

37K

38K

1								
0.9337349	1							
0.9700599	0.9404762	1						
0.9640719	0.9171598	0.9763314	1					
0.9101796	0.852071	0.8994083	0.9235294	1				
0.9041916	0.8461538	0.8934911	0.9176471	0.9705882	1			
0.8841463	0.873494	0.8795181	0.9041916	0.9221557	0.8982036	1		

0.9041916	0.9101796	0.9221557	0.9404762	0.9107143	0.9047619	0.9393939	1		
0.8975904	0.8922156	0.8982036	0.9107143	0.8928571	0.8988095	0.9090909	0.9101796	1	
0.8181818	0.8095238	0.8203593	0.8333333	0.8630952	0.8928571	0.8666667	0.8614458	0.873494	1
0.8443114	0.8461538	0.8461538	0.8588235	0.8882353	0.9176471	0.8802395	0.8809524	0.9166667	0.9285714
0.8666667	0.8630952	0.8742515	0.875	0.9047619	0.9107143	0.9090909	0.9156627	0.9216867	0.9281437
0.8433735	0.8343195	0.8571429	0.8579882	0.852071	0.8816568	0.8674699	0.8682635	0.8862275	0.922619
0.8433735	0.8571429	0.8443114	0.8571429	0.8869048	0.9166667	0.8909091	0.8802395	0.9281437	0.9281437
0.9101796	0.852071	0.9112426	0.9235294	0.9058824	0.9235294	0.8982036	0.8988095	0.8690476	0.8690476
0.8083832	0.7916667	0.8095238	0.816568	0.8461538	0.8757396	0.8614458	0.8511905	0.8690476	0.9640719
0.8443114	0.8154762	0.8284024	0.8284024	0.8579882	0.887574	0.8313253	0.8323353	0.8443114	0.9520958
0.8383234	0.8343195	0.8224852	0.8235294	0.8654971	0.8823529	0.8622754	0.8630952	0.8630952	0.9702381
0.8383234	0.8461538	0.8224852	0.8117647	0.8654971	0.8588235	0.8622754	0.8511905	0.8392857	0.9345238
0.8313253	0.827381	0.8154762	0.8047337	0.8352941	0.852071	0.8253012	0.8263473	0.8562874	0.9345238
0.8253012	0.8203593	0.8095238	0.797619	0.8452381	0.8690476	0.8373494	0.8373494	0.8373494	0.9578313
0.8012048	0.8083832	0.8083832	0.797619	0.8333333	0.8571429	0.8493976	0.8383234	0.8263473	0.9457831
0.8192771	0.8214286	0.8154762	0.7869822	0.8461538	0.8461538	0.8502994	0.8263473	0.8263473	0.9341317
0.847561	0.8424242	0.8363636	0.8253012	0.8674699	0.8795181	0.8727273	0.8666667	0.8787879	0.9329268
0.8323353	0.8402367	0.8284024	0.8058824	0.8470588	0.8764706	0.8443114	0.8452381	0.8452381	0.9642857
0.8263473	0.8284024	0.8224852	0.7941176	0.8362573	0.8647059	0.8323353	0.8333333	0.8333333	0.952381
0.8742515	0.8698225	0.8579882	0.8588235	0.9	0.9176471	0.8982036	0.8988095	0.8988095	0.922619
0.8383234	0.8343195	0.8224852	0.8235294	0.8647059	0.8823529	0.8622754	0.8630952	0.8630952	0.9702381
0.9036145	0.8674699	0.9161677	0.9161677	0.8869048	0.9101796	0.8902439	0.9036145	0.873494	0.8545455
0.5822785	0.6125	0.59375	0.56875	0.5714286	0.59375	0.5732484	0.6075949	0.5696203	0.5534591
0.3878788	0.3832335	0.3832335	0.3690476	0.3431953	0.3452381	0.3454545	0.3493976	0.373494	0.3433735

39K	40K	41K	42K	43D	44K	45K	46K	47K	48K
1									
0.952381	1								
0.8816568	0.8809524	1							
0.9761905	0.9520958	0.8809524	1						
0.8882353	0.8928571	0.8994083	0.8869048	1					
0.9349112	0.9161677	0.9107143	0.922619	0.8579882	1				
0.887574	0.9041916	0.8988095	0.8862275	0.8698225	0.9345238	1			
0.9058824	0.9345238	0.9053254	0.9047619	0.8529412	0.9467456	0.9704142	1		
0.8705882	0.8988095	0.8816568	0.8690476	0.8411765	0.9112426	0.9349112	0.9649123	1	
0.9112426	0.9041916	0.8928571	0.8862275	0.8284024	0.9345238	0.9583333	0.9647059	0.9411765	1
0.8928571	0.9096386	0.8922156	0.8915663	0.8392857	0.9401198	0.9583333	0.9761905	0.952381	0.9520958
0.9047619	0.8975904	0.9161677	0.8802395	0.8511905	0.9464286	0.9341317	0.952381	0.9166667	0.9401198
0.8698225	0.8862275	0.8809524	0.8802395	0.8284024	0.9345238	0.9404762	0.9526627	0.9526627	0.9285714
0.9277108	0.9329268	0.8666667	0.9151515	0.8493976	0.9457831	0.9272727	0.9578313	0.9337349	0.9575758
0.9	0.9166667	0.9112426	0.8988095	0.8470588	0.9408284	0.964497	0.9823529	0.9588235	0.9585799
0.8882353	0.9047619	0.8994083	0.8869048	0.8352941	0.9408284	0.9585799	0.9707602	0.9473684	0.9470588
0.9411765	0.8702381	0.8698225	0.9404762	0.8882353	0.9112426	0.9230769	0.9529412	0.9176471	0.9171598
0.9058824	0.9345238	0.9053254	0.9047619	0.8529412	0.9467456	0.9704142	1	0.9647059	0.964497
0.8742515	0.8848485	0.8614458	0.8855422	0.9041916	0.8622754	0.8562874	0.8511905	0.827381	0.8143713
0.5625	0.591195	0.5625	0.5786164	0.58125	0.5471698	0.56875	0.5714286	0.5714286	0.54375
0.3333333	0.3493976	0.3353293	0.3614458	0.3392857	0.3413174	0.3413174	0.3254438	0.3254438	0.327381

49K	50D	51K	52K	53K	54K	55K	56K	57D	C. reticulat	C. cuneatum
1										
0.9520958	1									
0.9702381	0.9404762	1								
0.9454545	0.9337349	0.9337349	1							
0.9821429	0.9583333	0.9704142	0.9518072	1						
0.9880952	0.9583333	0.9822485	0.939759	0.9882353	1					
0.9404762	0.9166667	0.9171598	0.9457831	0.9352941	0.9352941	1				
0.9761905	0.952381	0.9526627	0.9578313	0.9823529	0.9705882	0.9529412	1			
0.8373494	0.8373494	0.8433735	0.8658537	0.8562874	0.8511905	0.8862275	0.8502994	1		
0.6037736	0.5759494	0.5974843	0.5923567	0.59375	0.5962733	0.6125	0.575	0.6289308	1	
0.3493976	0.3253012	0.3353293	0.3353659	0.327381	0.3431953	0.3452381	0.3214286	0.373494	0.4658385	1