Rev. Fitotec. Mex. Vol. 41 (4): 469 - 476, 2018

DIFERENCIACIÓN DE ACCESIONES DE GARBANZO MEDIANTE CARACTERES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES

DIFFERENTIATION OF CHICKPEA ACCESIONS WITH MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERS

Ernestina Valadez-Moctezuma* y Anselmo de J. Cabrera-Hidalgo

Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

**Autor para correspondencia* (evaladez@chapingo.mx)

RESUMEN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las principales leguminosas de grano cultivadas en el mundo. México es de los diez principales productores a nivel mundial con una producción total de 171 mil toneladas de grano. Este cultivo presenta alto nivel de autogamia y de monotonía genética, lo que dificulta la diferenciación de genotipos élite. En este estudio preliminar se evaluó la variabilidad de 57 genotipos de diferentes áreas geográficas mediante caracteres morfológicos y marcadores moleculares tipo RAPD e ISSR. El análisis de correspondencia múltiple mostró que los mayores valores discriminantes fueron el color de la flor azul y semillas grandes y de forma redondeada, pero el agrupamiento respectivo no diferenció a las accesiones, incluyendo las especies silvestres; sin embargo, el análisis UPGMA logró una mejor separación. Los marcadores RAPD aun cuando generaron perfiles de ADN, no fueron informativos, mientras que los ISSR diferenciaron a las 57 accesiones de *C. arietinum* utilizadas y a la especie silvestre *C. reticulatum*, lo que los hace buenos candidatos para caracterizar este cultivo. Este estudio sirvió como base para desarrollar otro sistema de marcadores moleculares más eficiente en esta especie.

Palabras clave: *Cicer arietinum*, marcadores ISSR, variables categóricas, variabilidad genética.

SUMMARY

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is one of the main grain legumes grown in the world. Mexico is among the top ten producers worldwide with a total production of 171 thousand tons of grain. This crop presents a high level of autogamy and of genetic evenness, which makes the differentiation of elite genotypes difficult. In this preliminary study, the variability of 57 genotypes from different geographic areas was evaluated using morphological characters and molecular markers such as RAPD and ISSR. Multiple correspondence analysis showed that the highest discriminating values were those of blue flower color and large seeds of rounded shape, but the respective grouping did not differentiate accessions, including wild species; however, UPGMA analysis achieved a better separation. RAPD markers, even when they generated DNA profiles, were not informative, while ISSR differentiated the 57 accessions of *C.arietinum* and the wild species *C. reticulatum*, which makes them good candidates to characterize this crop. This study served as a basis to develop another more efficient molecular marker system in this species.

Index words: *Cicer arietinum*, ISSR markers, categorical variables, genetic variability.

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las principales leguminosas de grano cultivadas en el mundo; por las características de sus semillas se reconocen dos tipos; Desi y Kabuli. Las semillas tipo Desi son angulares pequeñas, de varios colores, con cubierta rugosa y alto contenido de fibra (en México son conocidas como garbanzo porquero), mientras que las de tipo Kabuli son grandes y rugosas, con tonalidades blancas a beige y bajo porcentaje de fibra. Se ha reconocido un tercer tipo de garbanzo poco común, que presenta semillas pequeñas a medianas en forma de chícharo (*Pisum sativum* L.) de color crema (Upadhyaya *et al*., 2008).

México en uno de los 10 principales productores de esta leguminosa a nivel mundial, con aproximadamente 150 mil hectáreas y una producción total de 171 mil toneladas de grano. Las principales zonas productoras son Sinaloa, Sonora, Baja California Sur y El Bajío. La mayoría de la producción se destina a la exportación, y el resto a la alimentación de ganado. Desde 1950 el cultivo es comercialmente explotado, y a partir de 1961 el germoplasma de garbanzo mexicano ha sido sistemáticamente adaptado a las condiciones locales a través de distintos programas de fitomejoramiento. El garbanzo fue introducido a México desde la llegada de los españoles y su fitomejoramiento se ha basado en accesiones cuya diferenciación, sobre todo genética, no es muy eficiente por los altos niveles de endogamia (Padilla *et al*., 2008).

Kenemi *et al.* (2012) mencionan que las características genéticas de una especie pueden determinarse con descriptores morfológicos, bioquímicos y moleculares. De acuerdo con Jannatabadi *et al.* (2014), las evaluaciones morfológicas son directas, económicas y relativamente fáciles, pero algunas pueden ser subjetivas debido a que son afectadas por el ambiente y por la fenología del cultivo.

Recibido: 27 de septiembre de 2017
Aceptado: 25 de septiembre de 2018

Los marcadores de ADN proporcionan una vía precisa e independiente del ambiente para evaluar la variación genética de cualquier especie.

Varios estudios se han realizado en garbanzo desde hace al menos dos décadas para separar genotipos y determinar variación intraespecífica; por ejemplo, mediante isoenzimas (Kazan y Muehlbauer, 1991), y algunas técnicas basadas en ADN (Ahmad *et al*., 2010; Nguyen *et al*., 2004; Udupa *et al*., 1993); pero no han sido exitosos debido a la poca variabilidad genética y alta homocigosis existente entre las variedades (Hüttel *et al*., 1999; Udupa *et al*., 1999; Upadhyaya *et al*., 2008). Posteriormente, se desarrollaron marcadores SSR para este cultivo los cuales han mostrado ser muy eficientes para diferenciar genotipos estrechamente relacionados (Saeed *et al*., 2011; Winter *et al*., 1999), pero su aplicación ha resultado costosa en términos económicos debido a la cantidad de marcadores que se requieren para este propósito.

El objetivo del presente estudio fue contrastar la diferenciación de una colección elite de genotipos de garbanzo realizada con descriptores morfológicos estables con la correspondiente mediante marcadores moleculares que serviría de base para desarrollar otro sistema de marcadores genéticos capaz de potenciar la detección de polimorfismos de ADN en este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 57 accesiones de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y dos especies silvestres de referencia, *C. reticulatum* y *C. cunneatum* provenientes del Banco de Germoplasma del Centro Internacional para Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas (ICARDA, Aleppo, Siria), del Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para los Trópicos Semiáridos (ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India) y del Campo Experimental del Valle de Culiacán (CEVACU) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Desarrollo de plántulas en invernadero y variables evaluadas

Debido a que los materiales utilizados en el presente estudio ya fueron ampliamente caracterizados, sobre todo desde el punto de vista morfológico (Gómez-Garza R. M., Com. Pers.)[1], en este trabajo se utilizaron 10 plantas de cada genotipo para revalorar algunos descriptores contrastantes recomendados por IBPGR, ICRISAT e ICARDA (1993), y contrastar el agrupamiento resultante con el obtenido con marcadores moleculares. Las plantas se cultivaron en invernadero (28 ± 3 ºC, 13 horas de luz y 40 % de humedad relativa) y se consideraron seis caracteres con diferentes variantes: 1) hábito de crecimiento o porte de la planta (erecto, formando un ángulo con el suelo de 0 hasta 15º; semi-erecto, con un ángulo de 16 hasta 25º; extenso, con un ángulo de 61 hasta 80º); 2) tipo de hoja: simple y compuesta; 3) color de flor, usando los criterios de la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS); 4) color de semilla: con base en los criterios de la RHS; 5) forma y tamaño de semilla: angular, redondo irregular y forma de chícharo; y tamaño: grande, mediano y chico; y 6) textura de la testa de la semilla: ásperas, lisas y tuberculosas.

Extracción de ADN y desarrollo de marcadores

El ADN se obtuvo a partir de 2.5 g de hojas jóvenes mezcladas de las 10 plantas de cada accesión siguiendo la metodología propuesta por Dellaporta *et al.* (1983). Se utilizaron iniciadores tipo RAPD (G-02, G-03, G-09 y G-10) (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) y para ISSR $(GACA)_4$, $(GATA)_4$, $(GGAT)_4$ $(CA)_8$ y $(CT)_8$ (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) para el desarrollo de los marcadores moleculares en todos los genotipos. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Perking Elmer 480® (Perking Elmer Corp., Norwalk, CT, USA) en un volumen de reacción total de 25 mL que contenía 50 ng de ADN genómico, 200 mM de dNTPs, 3 mM de $MgCl_2$, buffer PCR 1X, 20 pM de primer y 1U de *Taq* polimerasa (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial de 93 ºC por 1 min, seguido de 40 ciclos a 93 ºC por 20 s, 40 ºC para los iniciadores RAPD, 40 ºC para $(GATA)_4$ $(GGAT)_4$ y 48 ºC para $(GACA)_4$, $(CT)_8$ y $(CA)_8$ por 1 min, 72 ºC por 20 s y un ciclo de extensión final de 72 ºC por 10 min.

Detección y análisis de productos amplificados

Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa 1.4 % (Separide® Gel Matrix, Gibco-BRL) en buffer TAE (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0; acetato de sodio 20 mM y EDTA 2 mM). Para referencia, se incluyeron marcadores de peso molecular de 100 pb (MBI, Fermentas, St-Leon, Alemania) y 1 kb (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). La electroforesis se corrió a 80 V durante 2.5 h y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL^{-1}) en buffer TAE. Todos los geles se registraron y analizaron digitalmente con el sistema Kodak Digital Science® DC 120 (Eastman Kodak, Co., Rochester, NY, USA).

[1]**Gómez-Garza, Rosa María.** Ing. Agrónoma fitomejoradora de garbanzo. Culiacán, Sinaloa.

Análisis de datos

Con los datos de caracterización morfológica se realizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) con el propósito de seleccionar los descriptores más informativos dentro del conjunto original de datos. Para corroborar la pertinencia del agrupamiento obtenido con el ACM, se efectuó un análisis de coordenadas principales (ACoP) y posteriormente se generó un dendrograma mediante el método del promedio aritmético de pares no ponderados (UPGMA) usando el coeficiente de Dice (Dice, 1945). Con los datos ISSR se generó una matriz binaria de 1 y 0 (presencia y ausencia) que fue utilizada para el análisis de conglomerados mediante el método UPGMA y obtener el dendrograma por medio del coeficiente de Dice para establecer la similitud genética.

Se evaluó la habilidad de los marcadores para diferenciar entre las accesiones estimando el contenido de información polimórfica (PIC), índice del marcador (MI) y poder de resolución (Rp) de acuerdo con la metodología propuesta por Valadez-Moctezuma *et al.* (2014). El porcentaje de bandas polimórficas (PBP) también fue determinado. Todos los análisis se realizaron con el programa NTSySpc. 2.21o de Applied Biostatistics Inc. Los marcadores RAPD no fueron analizados debido a que fueron escasos (2 a 4 fragmentos), definidos, reproducibles, pero prácticamente sin polimorfismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de caracteres morfológicos

El Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) permitió explicar la variabilidad total en función de la contribución de cada factor respecto a la variabilidad. Cuatro factores explicaron el 52 % de la variabilidad total, lo que mostró que el color de corola azul y semillas grandes de forma redondeada fueron los caracteres con el mayor valor discriminante (58.0 cada uno).

Los resultados concuerdan en parte con lo reportado por Narayan y Macefield (1976) quienes evaluaron una colección mundial de germoplasma de garbanzo con ocho caracteres relacionados a la aptitud física y rendimiento, incluidas 16 variedades mexicanas. En general, ACM detectó poca variabilidad en los genotipos estudiados, como resultado de la alta homocigosis presente entre las accesiones, tal como lo reportaron Saeed *et al.* (2011). Las plantas derivadas de semillas tipo Kabuli y Desi fueron agrupadas de manera indistinta e independiente de su origen geográfico. La accesión 35D resultó la más diferente porque presenta corola azul que comparte con las accesiones 16D y 43D y semilla redondeada pequeña, que solamente comparte con la accesión 20K tipo Kabuli.

Con el análisis de coordenadas principales (ACoP) mediante los datos morfológicos basados en la matriz de similitud obtenida con NTSyS pc.2.2 (Fig. 1) se separaron las accesiones en dos grupos; el primero incluyó 41 accesiones principalmente del tipo Kabuli a una distancia aproximada de 0.62; el segundo grupo, representado por 18 accesiones tipo Desi, incluyó a las dos especies silvestres (*C. reticulatum* y *C. cuneatum*). En el primer grupo se encontraron las accesiones 17D, 27D, 41D y 50D que corresponden a genotipos tipo Desi, lo que indica que estas comparten ciertas características morfológicas con los de tipo Kabuli. Dentro del primer grupo hubo pequeños subgrupos con características particulares; por ejemplo, las accesiones 1K, 2K, 4K, 7K, 38K, 56K, 55K, 54K, 49K, 53K, 46K, 40K y 42K (Kabuli) presentan porte erecto, hoja compuesta, flores blancas, semillas angulares grandes de color crema y superficie rugosa; mientras que los genotipos 3K, 12K y 14K difieren en algunas características, ya que tienen porte extenso y semillas angulares medianas.

Los materiales del segundo grupo presentaron características más comunes entre sí, en su mayoría fueron de porte extenso, hoja compuesta, flores rosas, semillas angulares y medianas de color marrón oscuras y con superficie tuberculada. *C. reticulatum* en este análisis no fue separada de los genotipos de *C. arietinum* ya que compartieron varias de las características morfológicas evaluadas, principalmente con los de tipo Desi, lo que en parte se explica por los bajos niveles de variabilidad dentro de *C. arietinum* (Aggarwal *et al.*, 2015). Ambos grupos incluyeron accesiones de las diferentes áreas geográficas y no se observó relación entre la divergencia morfológica y el origen geográfico; esto indica que la variación morfológica no está determinada solamente por diferencias ambientales sino también por factores genéticos (Ghaffari *et al.*, 2014).

Análisis RAPD e ISSR

Debido a que los perfiles RAPD resultaron monomórficos y poco informativos, no se consideraron para los análisis estadísticos propuestos; sin embargo, este resultado era de esperarse (Ahmad *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2007) y fueron de interés para el desarrollo y aplicación de otro sistema de marcadores más eficientes para este tipo de plantas, conjuntamente con los escasos resultados obtenidos con los iniciadores de ISSR (Valadez-Moctezuma y Cabrera-Hidalgo, 2018). Los marcadores ISSR $(GACA)_4$, $(GATA)_4$ y $(GGAT)_4$ resultaron con pocas bandas definidas y reproducibles en todos los genotipos. Los iniciadores $(CA)_8$ y $(CT)_8$ produjeron fragmentos de pesos moleculares muy cercanos entre sí, difícil de ser interpretados, por lo que no fueron considerados. El oligonucleótido $(GATA)_4$ sólo detectó una

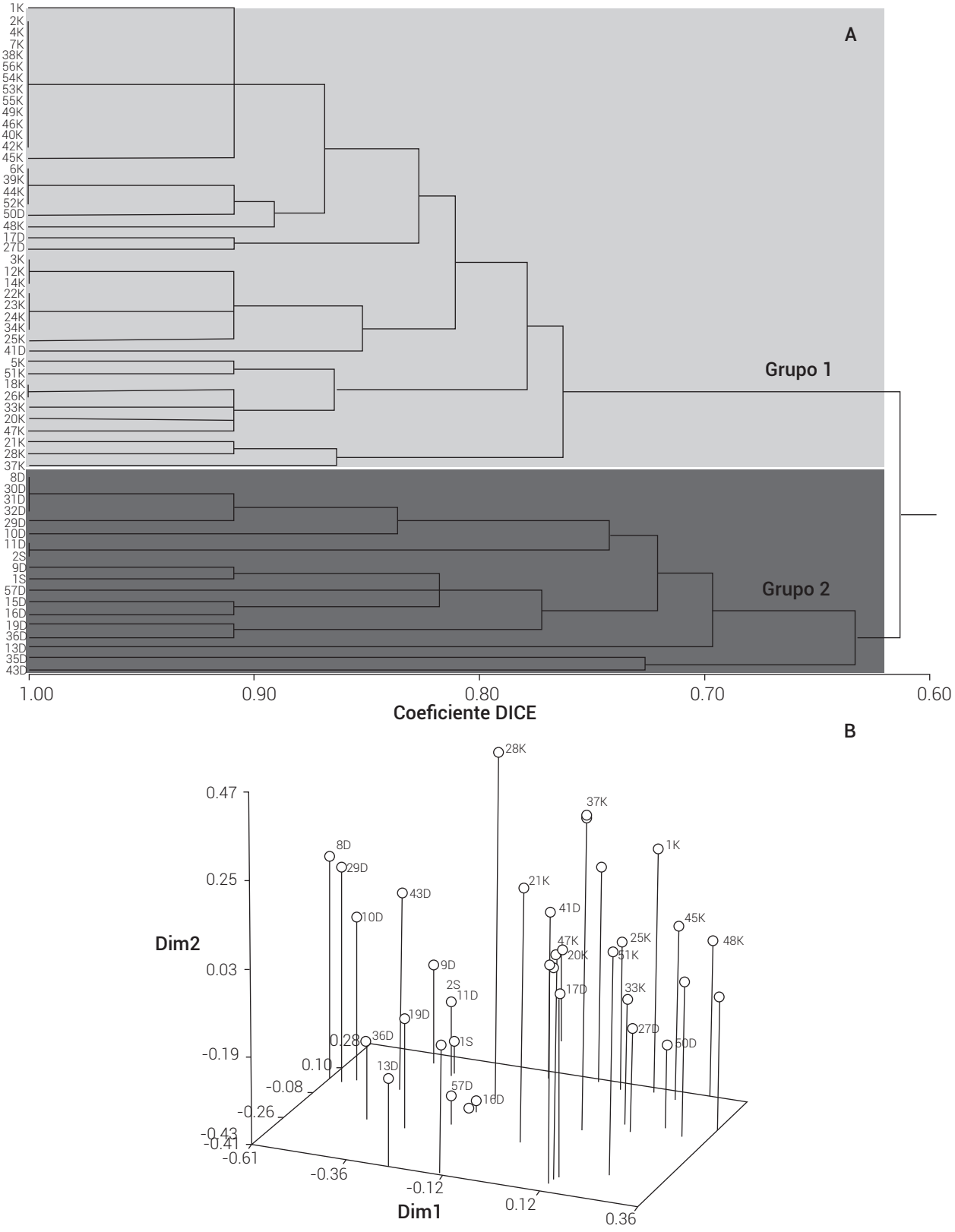


Figura 1. Panel A) Agrupamiento morfológico UPGMA de la colección de germoplasma de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y panel B) Análisis de Coordenadas Principales, 1S: *C. reticulatum*, 2S: *C. cuneatum*, K: semilla tipo Kabuli, D: semilla tipo Desi.

banda aparentemente monomórfica con las condiciones utilizadas, mientras que los iniciadores $(GGAT)_4$ y $(GACA)_4$ amplificaron un total de cinco y 10 fragmentos, de los cuales tres y cuatro fueron polimórficos, respectivamente.

Un total de 16 amplicones fueron registrados con los tres iniciadores con pesos moleculares aproximados de 600 a 2036 pb (Cuadro 1), de los cuales 43.7 % fueron polimórficos, con un promedio de 5.3 bandas por iniciador, similar a lo reportado por Aggarwal *et al.* (2015) y Yadav *et al.* (2015) en garbanzo. Los valores de *Rp* oscilaron entre 0.0 para $(GATA)_4$ y 1.51 para $(GACA)_4$, con un promedio de 0.75. El iniciador $(GACA)_4$ fue el más eficiente para evaluar la variabilidad genética de los genotipos de garbanzo, presentando los valores *Rp* mayores. El contenido de información polimórfica fluctuó de 0.0 $(GATA)_4$ a 0.13 $(GGAT)_4$, con un promedio de 0.08 y el índice de marcador osciló entre 0.0 para el iniciador $(GATA)_4$ y 0.74 para $(GGAT)_4$ y un promedio de 0.27; por lo que $(GGAT)_4$ proporcionó la mayor información sobre la variación genética de las accesiones en estudio.

Cuadro 1. Genotipos de garbanzo utilizados para el análisis de caracteres morfológicos y moleculares.

No.	Cultivares	Origen	Tipo	No.	Cultivares	Origen	Tipo
1	VC-15	ICARDA	Kabuli	29	ICC-12435	ICRISAT	Desi
2	Mission	ICARDA	Kabuli	30	ICC-12241	ICRISAT	Desi
3	Lyons	ICARDA	Kabuli	31	ICC-12257	ICRISAT	Desi
4	ILC-136	ICARDA	Kabuli	32	ICC-12437	ICRISAT	Desi
5	ILC-35	ICARDA	Kabuli	33	ICC-9001	ICRISAT	Kabuli
6	ILC-98	ICARDA	Kabuli	34	ICCV-5	ICRISAT	Kabuli
7	ILC-3500	ICARDA	Kabuli	35	ICCV-3	ICRISAT	Desi
8	WR-315	ICARDA	Desi	36	ICC-11322	ICRISAT	Desi
9	BG-212	ICARDA	Desi	37	ICC-6366	ICRISAT	Kabuli
10	JG-62	ICARDA	Desi	38	ICC-12435	ICRISAT	Kabuli
11	Annigeri	ICARDA	Desi	39	Unión	CEVACU	Kabuli
12	Chaffa	ICARDA	Kabuli	40	Dorado	CEVACU	Kabuli
13	L-550	ICARDA	Desi	41	1123Ga-62-2-3-M-M	CEVACU	Desi
14	K-850	ICARDA	Kabuli	42	1126Ga-L2V	CEVACU	Kabuli
15	C-104	ICARDA	Desi	43	Breve blanco	CEVACU	Desi
16	JG-74	ICARDA	Desi	44	1131-CGa-1-1-M-1-M	CEVACU	Kabuli
17	CPS-1	ICARDA	Desi	45	Macarena	CEVACU	Kabuli
18	FLIP-83-100C	ICARDA	Kabuli	46	Gordo lechoso	CEVACU	Kabuli
19	FLIP-83-24C	ICARDA	Desi	47	Sonora 80	CEVACU	Kabuli
20	FLIP-82-21C	ICARDA	Kabuli	48	11-GaC83-4-85-M-1-M	CEVACU	Kabuli
21	FLIP-83-60C	ICARDA	Kabuli	49	Kino	CEVACU	Kabuli
22	ILC-72	ICARDA	Kabuli	50	CUGA-134	CEVACU	Desi
23	ILC-202	ICARDA	Kabuli	51	Apolo	CEVACU	Kabuli
24	7573-14-IP-14-BP-2C-M	ICRISAT	Kabuli	52	Mutante	CEVACU	Kabuli
25	ICC-6304	ICRISAT	Kabuli	53	S-77	CEVACU	Kabuli
26	K-1184-IC-M	ICRISAT	Kabuli	54	M-88	CEVACU	Kabuli
27	7573-74-IP-IP BP-2C-CM	ICRISAT	Desi	55	Blanco Sinaloa-92	CEVACU	Kabuli
28	ICCV-93308	ICRISAT	Kabuli	56	Progreso-95	CEVACU	Kabuli
				57	Santo Domingo-82	CEVACU	Desi

Cuadro 2. Eficiencia y características de los iniciadores utilizados en el análisis molecular de *Cicer* sp.

Tipo de iniciador	Iniciadores 5´-3´	TM (ºC)	Bandas totales	BP	PBP	Rp	PIC	MI
RAPD	G-02: GGCACTGAGG	-	2	†	-	-	-	-
	G03: GAGCCCTCCA	-	2	†	-	-	-	-
	G-09: CTGACGTCAC	-	3	†	-	-	-	-
	G-10: AGGGCCGTCT	-	4	†	-	-	-	-
ISSR	$(GACA)_4$	48	10	4	40	1.51	0.113	0.451
	$(GATA)_4$	40	1	0	0	0.00	0.000	0.000
	$(GGAT)_4$	48	5	3	60	0.74	0.126	0.737
Promedio			5.3	2.3	33.3	0.75	0.08	0.27
Total			16	7	100	2.25	0.24	0.83

†No evaluado en el germoplasma completo; TM: temperatura de alineamiento; BP: bandas polimórficas; PBP: porcentaje de bandas polimórficas; Rp: poder de resolución; PIC: contenido de información polimórfica; MI: índice del marcador.

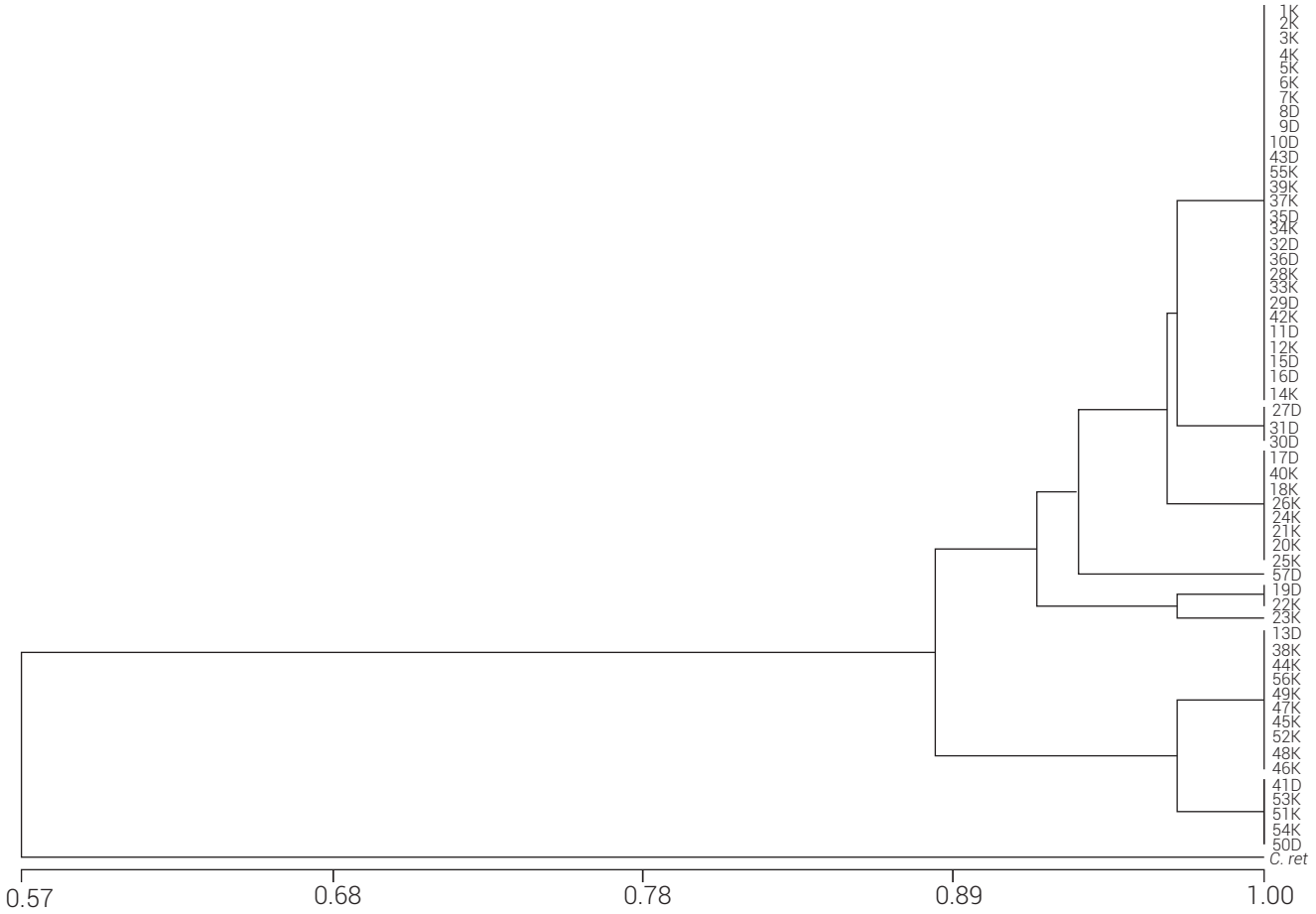


Figura 2. Dendrograma UPGMA de genotipos de garbanzo basados en sus valores de similitud Nei y Li/Dice usando iniciadores tipo ISSR. El agrupamiento UPGMA se construyó con el programa NTSySpc 2.2. *C. rec: C. reticulatum*. Las etiquetas 1-57 corresponden a *C. arietinum*. K: semilla tipo Kabuli, D: semilla tipo Desi.

Aun cuando el análisis ISSR de este estudio no separó a los genotipos de *C. arietinum* acorde al menos por las formas de la semilla, sí los separó interespecíficamente de *C. reticulatum*, aun con la cantidad de iniciadores utilizados, lo que significa que ISSR representa un sistema de marcadores más eficiente en comparación con RAPD para este caso, aun cuando el número de marcadores fue escaso. Este resultado concuerda con lo reportado por Rao *et al.* (2007) y Aggarwal *et al.* (2015) quienes encontraron entre 60 y 90 % de polimorfismo mediante RAPD e ISSR respectivamente, también en garbanzo. Los marcadores ISSR obtenidos al ser reproducibles y proporcionar más información polimórfica, sustentan el amplio uso que han tenido para estudios de diversidad y relaciones filogenéticas en variadas especies y cultivos, sobre todo con alto nivel de endogamia (Valadez-Moctezuma *et al*., 2014).

Todas las investigaciones realizadas en *C. arietinum* han reportado bajos niveles de variabilidad genética en comparación con las especies silvestres (Choudhary *et al*., 2012), y de acuerdo con Ghaffari *et al.* (2014), esto se debe a que el garbanzo tiene una estrecha base genética, y a pesar de los grandes esfuerzos de mejoramiento, las variedades actualmente disponibles están cercanamente relacionadas entre sí (Jannatabadi *et al*., 2014; Singh *et al*., 2008). Se concluye que el análisis UPGMA derivado del análisis morfológico logró una mejor separación de los tipos de garbanzo con respecto al análisis ACM. Morfológicamente las especies silvestres *C. reticulatum* y *C. cunneatum* compartieron mayor similitud con garbanzo tipo Desi. Los marcadores tipo ISSR diferenciaron claramente a las 57 accesiones de *C. arietinum* de las de la especie *C. reticulatum*; también separaron los grupos de garbanzo tipo Kabuli y tipo Desi, aunque se apreciaron algunos grupos que compartieron ambos tipos de garbanzo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Ing. Rosa María Gómez-Garza y al Campo Experimental del Valle de Culiacán (CEVACU) las facilidades y apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal H., A. Rao, A. Kumar, J. Singh, J. S. Rana, P. K. Naik and V. Chhokar (2015) Assessment of genetic diversity among 125 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) of Indian origin using ISSR markers. *Turkish Journal of Botanic* 39:218-226, doi:10.3906/bot-1401-80

Ahmad F., A. I. Khan, F. S. Awan, B. Sadia, H. A. Sadaqat and S. Bahadur (2010) Genetic diversity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm in Pakistan as revealed by RAPD analysis. *Genetics and Molecular Research* 9:1414-1420, doi: 10.4238/vol9-3gmr862

Choudhary P., S. M. Khanna, P. K. Jain, C. Bharadwaj, J. Kumar, P. C. Lakhera and R. Srinivasan (2012) Genetic structure and diversity analysis of the primary gene pool of chickpea using SSR markers. *Genetics and Molecular Research* 11:891-905, doi: 10.4238/2012. April.10.5

Dellaporta S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.

Dice L. R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302, doi: 10.2307/1932409

Ghaffari P., R. Talebi and F. Keshavarzi (2014) Genetic diversity and geographical differentiation of Iranian landrace, cultivars, and exotic chickpea lines as revealed by morphological and microsatellites markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20:225-233, doi: 10.1007/s12298-014-0223-9

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, doi: 10.1139/g98-122

IBPGR, ICRISAT and ICARDA (1993) Descriptors of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Board for Plant Genetic Resource. Rome, Italy. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Pantancheru, India and International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria. 31 p.

Jannatabadi A. A., R. Talebi, M. Armin, J. G. Jamalabadi and N. Baghebani (2014) Genetic diversity of Iranian landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions from different geographical origins as revealed by morphological and sequence tagged microsatellite markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23:225-229, doi: 10.1007/s13562-013-0206-x

Kazan K. and F. J. Muehlbauer (1991) Allozyme variation and phylogeny in annual species of ***Cicer*** (Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution* 175:11-21, doi: 10.1007/BF00942142

Keneni G., E. Bekele, M. Imtiaz, K. Dagne, E. Getu and F. Assefa (2012) Genetic diversity and population structure of Ethiopian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm accessions from different geographical origins as revealed by microsatellite markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30:654-665, doi:10.1007/s11105-011-0374-6

Narayan R. K. J. and A. J. Macefield (1976) Adaptive responses and genetic divergence in a world germplasm collection of chick pea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 47:179-187, doi: 10.1007/BF00278376

Nguyen T. T., P. W. J. Taylor, R. J. Redden and R. Ford (2004) Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. *Plant Breeding* 123:173-179, doi: 10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x

Padilla V. I., R. I. Valenzuela V., C. M. Armenta C., R. A. Salinas P. y E. Sánchez S. (2008) Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el Valle del Mayo, Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31:43-49.

Rao L. S., P. Usha Rani, P. S. Deshmukh, P. A. Kumar and S. K. Panguluri (2007) RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Landizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:1235-1244, doi: 10.1007/s10722-006-9104-6

Saeed A., H. Hovsepyan, R. Darvishzadeh, M. Imtiaz, S. K. Panguluri and R. Nazaryan (2011) Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives by using simple sequence repeats. *Plant Molecular Biology Reporter* 29:848-858, doi: 10.1007/s11105-011-0294-5

Singh R., V. Singhal and G. J. Randhawa (2008) Molecular analysis of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars using AFLP and STMS markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 17:167-171, doi: 10.1007/BF03263279

Udupa S. M., L. D. Robertson, F. Weigand, M. Baum and G. Kahl (1999) Allelic variation at $(TAA)_n$ microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Molecular and General Genetics* 261:354-363, doi: 10.1007/s004380050976

Udupa S. M., A. Sharma, R. P. Sharma and R. A. Pai (1993) Narrow genetic variability in *Cicer arietinum* L. as revealed by RFLP analysis. *Journal Plant Biochemistry and Biotechnology* 2:83-86, doi: 10.1007/BF03262930

Upadhyaya H. D., S. L. Dwivedi, M. Baum, R. K. Varshney, S. M. Udupa, C. L. L. Gowda, D. Hoisington and S. Singh (2008) Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Plant Biology* 8:106, doi:10.1186/1471-2229-8-106

Valadez-Moctezuma E., Q. Ortíz-Vásquez and S. Samah (2014) Molecular based assessment of genetic diversity of xoconostle accessions (*Opuntia* spp.). *African Journal of Biotechnology* 13:202-210, doi: 10.5897/AJB2013.13350

Valadez-Moctezuma E. and A. J. Cabrera-Hidalgo (2018) Easy strategy used to detect the genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24:921-928, doi: 10.1007/s12298-018-0548-x

Winter P., T. Pfaff, S. M. Udupa, B. Hüttel, P. C. Sharma, S. Sahi, R. Arreguin-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. *Molecular and General Genetics* 262:90-101, doi: 10.1007/s004380051063

Yadav P., K. K. Koul, N. Shrivastava, M. J. Mendaki and S. S. Bhagyawant (2015) DNA polymorphisms in chickpea accessions as revealed by PCR-based markers. *Cellular and Molecular Biology* 61:84-90, doi: 10.14715/cmb/2015.61.5.15