

MICROSATELLITE-BASED GENETIC DIVERSITY AND GRAIN QUALITY VARIATION IN CHICKPEA GENOTYPES FROM MEXICO AND INTERNATIONAL COLLECTIONS

DIVERSIDAD GENÉTICA BASADA EN MICROSATÉLITES Y VARIACIÓN DE LA CALIDAD DE GRANO DE GENOTIPOS DE GARBANZO DE COLECCIONES DE MÉXICO E INTERNACIONALES

Jeanett Chavez-Ontiveros¹, María F. Quintero-Soto¹, Karen V. Pineda-Hidalgo¹,
Hector S. Lopez-Moreno¹, Cuauhtemoc Reyes-Moreno¹, Jose A. Garzon-Tiznado¹,
Jose A. Lopez-Valenzuela^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sin., México 80010. (jalopezvla@uas.edu.mx).

ABSTRACT

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding programs in Northwestern Mexico have focused in developing extra-large-seeded Kabuli cultivars, but additional efforts are required to generate genotypes with better grain quality traits. Information about molecular genetic diversity of Mexican chickpea germplasm and other genotypes from international collections may be valuable sources to improve nutritional properties. The aim of this study was to determine the genetic diversity based on microsatellite markers and the variation in grain quality traits of 14 Kabuli genotypes from Mexico and nine Desi genotypes from other countries. The hypothesis was that the genetic variation detected allows the differentiation of the genotypes according to their origin. DNA was extracted and analyzed with 31 markers distributed across the chickpea genome. A total of 164 alleles were obtained (average of 5.3 alleles per locus) and a total gene diversity of 0.72, which demonstrated a broad genetic base of the chickpeas analyzed. The UPGMA-cluster analysis, model-based population structure and principal component analysis revealed two major groups, one formed by Desi chickpeas and the other by Kabuli genotypes. The chickpeas also showed a wide variability in seed coat color, seed weight, seed coat proportion, and starch, protein and phenolics content, which was significantly associated with 12 microsatellite markers. These genetic materials represent a broad source of variation for improving chickpea grain quality.

Keywords: *Cicer arietinum* L, genetic diversity, microsatellites, grain quality traits.

RESUMEN

Los programas de mejoramiento genético del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el noroeste de México se han enfocado en el desarrollo de cultivares tipo Kabuli con semillas extragrandes, pero se requieren esfuerzos adicionales para generar genotipos con mejores características de calidad de grano. La información sobre la diversidad genética molecular del germoplasma de garbanzo mexicano y otros genotipos de colecciones internacionales puede ser valiosa para mejorar las propiedades nutricionales. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética con base en marcadores microsatélites y la variación en las características de calidad de grano de 14 genotipos de garbanzo tipo Kabuli de México y nueve genotipos tipo Desi de otros países. La hipótesis fue que la variación genética detectada permite la diferenciación de los genotipos según su origen. El ADN se extrajo y se analizó con 31 marcadores distribuidos en el genoma del garbanzo. Un total de 164 alelos (promedio de 5.3 alelos por locus) se obtuvo y una diversidad genética total de 0.72, lo que demuestra una amplia base genética de los garbanzos analizados. El análisis de agrupamiento UPGMA, la estructura poblacional basada en modelos y el análisis de componentes principales revelaron dos grupos principales, uno formado por los garbanzos tipo Desi y el otro por genotipos tipo Kabuli. Los garbanzos también presentaron una amplia variabilidad en el color de la cubierta de la semilla, el peso de la semilla, la proporción de la cubierta de la semilla y el contenido de almidón, proteína y fenólicos, lo cual se asoció significativamente con 12 marcadores microsatélites. Estos materiales genéticos representan una amplia fuente de variación para mejorar la calidad de grano del garbanzo.

Palabras clave: *Cicer arietinum* L, diversidad genética, microsatélites, caracteres de calidad de grano.

* Author for correspondence v Autor responsable.
Received: February, 2019. Approved: September, 2019.
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 57-73. 2020.

INTRODUCTION

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is one of the most important legumes in human nutrition due to its content of proteins, carbohydrates and phytochemicals (Wood and Grusak, 2007). Cultivated chickpeas are typically classified as Desi and Kabuli types based on morphological characteristics. Desi types have small, angular-shaped and dark-colored seeds; they are mainly grown in the Indian subcontinent and Ethiopia, while Kabuli types have large, beige-colored seeds and are usually grown in the Mediterranean region and America.

Mexico is ranked tenth in chickpea production worldwide (FAO, 2017) and most of its production is exported to several countries; the State of Sinaloa occupies the first place in national chickpea production and exportation. Because seed size is one of the most important traits for trade, chickpea breeding programs in Northwestern Mexico have focused in developing extra-large seeded (100-seed weight >50 g) Kabuli cultivars, including Blanco Sinaloa 92 that shows high yield potential and stability across different environments (Gowda *et al.*, 2011a). This cultivar is very successful in the export market and it is the progenitor of several Kabuli chickpea genotypes (Valenzuela-Herrera *et al.*, 2016); however, additional efforts are required to generate chickpea cultivars with better quality traits, making it necessary to include molecular tools to assist the breeding of more competitive genotypes. The analysis of the molecular and phenotypic diversity of chickpea genetic resources that vary in grain quality characteristics could provide information about promising genotypes and molecular markers associated with these traits.

The genetic diversity and relationships between chickpea genotypes was analyzed by Sefera *et al.* (2011), Choudhary *et al.* (2012), Keneni *et al.* (2012) and Hajibarat *et al.* (2014). Microsatellites or simple sequence repeats (SSR) are widely used because they are highly reproducible, multi-allelic and co-dominant; however, there is no information about the microsatellite-based genetic diversity of Mexican chickpea germplasm and other genotypes from international collections that may be valuable to improve nutritional and nutraceutical properties. Desi genotypes are mainly used in Mexico for animal feeding, but they have good nutritional characteristics such as high protein content (Wang *et al.*, 2017), as

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las leguminosas más importantes para la alimentación humana debido a su contenido de proteínas, carbohidratos y fitoquímicos (Wood y Grusak, 2007). Los garbanzos cultivados se clasifican generalmente con base en sus características morfológicas en tipo Desi y Kabuli. Los tipos Desi tienen semillas pequeñas, de forma angular y de color oscuro; se cultivan principalmente en el subcontinente indio y en Etiopía. Los tipos Kabuli tienen semillas grandes, de color beige; generalmente se cultivan en la región del Mediterráneo y en América.

México ocupa el décimo lugar en la producción de garbanzo a nivel mundial (FAO, 2017) y la mayoría de su producción se exporta a diversos países; el estado de Sinaloa ocupa el primer lugar en la producción y exportación de garbanzo a nivel nacional. Debido a que el tamaño de la semilla es una de las características más importantes para el comercio, los programas de mejoramiento genético del garbanzo en el noroeste de México se han enfocado en desarrollar cultivares de garbanzo tipo Kabuli de semillas extragrandes (peso de 100 semillas >50 g), incluyendo a Blanco Sinaloa 92 que muestra un elevado potencial de rendimiento y estabilidad en diferentes ambientes (Gowda *et al.*, 2011a). Este cultivar es muy exitoso en el mercado de exportación y es el progenitor de diversos genotipos de garbanzo tipo Kabuli (Valenzuela-Herrera *et al.*, 2016); sin embargo, se requieren esfuerzos adicionales para generar cultivares de garbanzo con mejores características de calidad, razón por la cual es necesario incluir herramientas moleculares para ayudar al mejoramiento genético de genotipos más competitivos. El análisis de la diversidad molecular y fenotípica de recursos genéticos de garbanzo que varían en características de calidad del grano podría proporcionar información sobre genotipos prometedores y marcadores moleculares asociados con estas características.

Sefera *et al.* (2011), Choudhary *et al.* (2012), Keneni *et al.* (2012) y Hajibarat *et al.* (2014) analizaron la diversidad genética y las relaciones entre genotipos de garbanzo. Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) se usan ampliamente debido a que son altamente reproducibles, multialélicos y codominantes; sin embargo, no hay información sobre la diversidad genética basada en microsatélites del germoplasma

well as important health beneficial properties mainly associated with the phytochemicals of their colored seeds (Segev *et al.*, 2010; Quintero-Soto *et al.*, 2018). The objective of this study was to determine the molecular genetic diversity and the variation in grain quality traits of selected chickpea genotypes from the Mexican Breeding Program and Desi genotypes from the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). The hypothesis was that the genetic variation detected allows the differentiation of the genotypes according to their origin.

MATERIALS AND METHODS

Genetic materials

A set of 23 chickpea genotypes (nine Desi and 14 Kabuli) were included in this study (Table 1). The Desi genotypes were

de garbanzo mexicano y otros genotipos de colecciones internacionales que podría ser valiosa para mejorar las propiedades nutricionales y nutraceuticas del garbanzo. En México, los genotipos Desi se utilizan principalmente en la alimentación animal, pero tienen importantes características nutricionales, como un alto contenido proteico (Wang *et al.*, 2017) y propiedades beneficiosas para la salud, principalmente relacionadas con los fitoquímicos de sus semillas coloreadas (Segev *et al.*, 2010; Quintero-Soto *et al.*, 2018). El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética molecular y la variación de las características de calidad de grano de genotipos de garbanzo seleccionados del Programa Mexicano para el Mejoramiento Genético y genotipos Desi del Instituto Internacional de Investigación en Cultivos para los Trópicos Semiáridos (ICRISAT, por sus siglas en inglés). La hipótesis fue que la variación genética detectada permite la diferenciación de los genotipos según su origen.

Table 1. Chickpea genotypes used in the study.

Cuadro 1. Genotipos de garbanzo utilizados en el estudio.

Genotype	Seed color	Country of origin	Pedigree
Desi (ICRISAT collection)			
ICC 6306	Black	Russia	NEC 208 [†]
ICC 4418	Black	Iran	P-5401-1 [†]
ICC 3761	Black	Iran	P-4376 [†]
ICC 3512	Brown	Iran	P-4216-1 [†]
ICC 5383	Brown	India	NP-59-1 [†]
ICC 13124	Brown	India	P-1390/PI-450831 [†]
ICC 14872	Brown	India	H 79-100M [†]
ICC 5613	Green	India	851 [†]
ICC 3421	Cream	Israel	P-4099 [†]
Kabuli (INIFAP collection)			
Surutato 77	Cream	Mexico	L-41 × Blanco
Santo Domingo 82	Cream	Mexico	L-41 × Breve Blanco
Blanco Sinaloa 92	Cream	Mexico	Santo Domingo 82 × Blanco Lechoso
Progreso 95	Cream	Mexico	Santo Domingo 82 × ILC-72
Jamu 96	Cream	Mexico	(Santo Domingo 82 × ILC72) × (Santo Domingo 82 × Blanco Lechoso)
Evora 98	Cream	Mexico	Surutato 77 × Santo Domingo 82
Suprema 03	Cream	Mexico	(Santo Domingo 82 × Blanco Lechoso) × (Santo Domingo 82 × Blanco Lechoso)
Costa 2004	Cream	Mexico	Tubutama 88 × Blanco Sinaloa 92
Jumbo 2010	Cream	Mexico	Dwellely × Blanco Sinaloa 92
Blanoro	Cream	Mexico	(L-4924 × Blanco Lechoso) × Blanco Sinaloa 92
Hoga 021	Cream	Mexico	Blanco Sinaloa 92 × Blanco Lechoso
Hoga 340	Cream	Mexico	Sandford × Blanco Sinaloa 92
Hoga 447	Cream	Mexico	(L-4924 × Blanco Lechoso) × Blanco Sinaloa 92
Hoga 490	Cream	Mexico	(L-4204 × Hermosillo 93) × Blanco Lechoso

[†] Pundir *et al.* (1988).

obtained from ICRISAT and the Kabuli genotypes from the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP), Mexico.

Growth conditions and experimental design

All genotypes were grown in a vertisol soil (pelluster) under irrigation conditions at the experimental field of INIFAP in Culiacan, Sinaloa, Mexico (24° 36' 58" N, 107° 25' 48" W), during the Winter-Spring season of 2015-2016. A randomized complete blocks design with three replications was used. Each plot consisted of four 6 m-long rows placed 0.8 m apart with a distance between plants of 0.1 m. Eighty plants were randomly chosen from the two center rows for evaluation of grain quality traits. Nitrogen (90 kg ha⁻¹) and phosphorous (44 kg ha⁻¹) were applied before planting. Daily minimum and maximum temperatures averaged 13.6 ± 4.5 and 29.0 ± 3.2 °C, respectively.

Evaluated traits

Grain physical properties

The 100-seed weight (100-SW) (g) was determined using an analytical balance (CP2245, Sartorius, Göttingen, Germany), while the seed coat content was obtained as described by Saini and Knights (1984) and expressed as g per 100 g on a dry-weight basis (g 100 g⁻¹, dw).

Starch content

Total starch (g 100 g⁻¹ dw) was determined using the K-TSTA assay kit (Megazyme, Wicklow, Ireland) following the instructions for samples containing resistant starch.

Protein content

Total nitrogen (N×6.25) was determined using a micro-Kjeldahl system according to the method 960.52 (AOAC, 2012) and it was expressed as g 100 g⁻¹ dw.

Total phenolics content

Methanol extracts were prepared according to Sreerama *et al.* (2010) with some modifications. Chickpea flour (0.75 g) was extracted with 30 mL of 80% methanol for 30 min (300 rpm) and sonicated (30 min). The extract was hydrolyzed with 12 mL of 2M HCl, heated (90 °C, 30 min) and then centrifuged (15 000 g, 20 min). The supernatant was mixed with 30 mL of hexane and the aqueous phase was mixed with 30 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was dried with a rotary evaporator (Büchi B-48,

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales genéticos

En este estudio se incluyeron 23 genotipos de garbanzo (nueve Desi y 14 Kabuli) (Cuadro 1). Los genotipos Desi se obtuvieron del ICRISAT y los genotipos Kabuli del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México.

Condiciones de cultivo y diseño experimental

Todos los genotipos se cultivaron en un suelo vertisol (pelluster) bajo condiciones de riego en el campo experimental del INIFAP en Culiacán, Sinaloa, México (24° 36' 58" N, 107° 25' 48" O), durante la temporada de invierno-primavera de 2015-2016. El diseño experimental fue de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. Cada parcela consistió en cuatro hileras de 6 m de largo con 0.8 m de distancia entre ellas y una distancia entre pantas de 0.1 m. Al azar se eligieron 80 plantas de las dos hileras centrales para evaluar las características de calidad de grano. El nitrógeno (90 kg ha⁻¹) y fósforo (44 kg ha⁻¹) se aplicaron antes de plantar. Las temperaturas mínima y máxima diarias promediaron 13.6 ± 4.5 y 29.0 ± 3.2 °C, respectivamente.

Características evaluadas

Propiedades físicas del grano

El peso de 100 semillas (100-SW) (g) se determinó con una balanza analítica (CP2245, Sartorius, Göttingen, Alemania), mientras que el contenido de la cubierta de la semilla se obtuvo con el método descrito por Saini y Knights (1984) y se expresó como g por 100 g de peso seco (g 100 g⁻¹, dw).

Contenido de almidón

El almidón total (g 100 g⁻¹ dw) se determinó con el kit K-TSTA (Megazyme, Wicklow, Irlanda) de acuerdo con las instrucciones para las muestras con almidón resistente.

Contenido de proteína

El nitrógeno total (N×6.25) se determinó con un sistema micro-Kjeldahl conforme al método 960.52 (AOAC, 2012) y se expresó como g 100 g⁻¹ dw.

Contenido de fenólicos totales

Extractos metanólicos se prepararon conforme a Sreerama *et al.* (2010) con algunas modificaciones. La harina de garbanzo

Brinkmann Instruments, Westbury, USA), resuspended in 0.75 mL of 80% methanol and passed through a PVDF membrane filter (0.45 μ m, Pall, USA).

Phenolics were quantified using the Folin-Ciocalteu method (Singleton *et al.*, 1999) with some modifications. Briefly, 20 μ L of the methanol extract were mixed with 220 μ L of eight-fold diluted Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min, the mixture was added with 60 μ L of 7% sodium carbonate solution, incubated in darkness at room temperature for 90 min, and the absorbance was measured at 750 nm with a BioMate 3S spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) 100 g⁻¹ dw.

Microsatellite genotyping

DNA was extracted from leaf tissue according to Cingilli and Akçin (2005) and all genotypes were analyzed using 31 microsatellite markers. Polymerase chain reactions (15 μ L) contained 50 ng of DNA, 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 2.1 mM MgCl₂, 0.083 mM dNTPs, 0.42 μ M of both primers and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The reactions were carried out using a C1000 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) programmed as follows: 5 min at 95 °C, 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 1.5 min at 72 °C, and a final extension period of 5 min at 72 °C. The amplified products were separated by electrophoresis using 15% (w/v) polyacrylamide gels with 1X TAE (40 mM Tris-acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) under non-denaturing conditions (Wang *et al.*, 2003). Gels were stained with ethidium bromide (1 μ g mL⁻¹) and visualized under UV light with a Chemidoc XRS system (BioRad). Gel images were used to estimate the allele sizes by comparison to molecular size markers (50 bp ladder) using the Quantity One software (BioRad).

Statistical analyses

The number and frequency of marker alleles, as well as the polymorphic information content (PIC) and gene diversity were determined with the software PowerMarker version 3.25 (Liu and Muse, 2005). Gene diversity within each chickpea genotype was estimated from 10 individuals. The genetic distance between the chickpeas was calculated with the coefficient of Nei *et al.* (1983). Clustering was performed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and the dendrogram was visualized using MEGA v5.0 (Kumar *et al.*, 2016) with a bootstrap value of 1000. The genetic structure was analyzed with a model-based clustering approach using the software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). The software tested 1 to

(0.75 g) se extrajo con 30 mL de metanol al 80% durante 30 min (300 rpm) y se sonicó (30 min). El extracto se hidrolizó con 12 mL de HCl 2M, se calentó (90 °C, 30 min) y centrifugó (15 000 g, 20 min). El sobrenadante se mezcló con 30 mL de hexano y la fase acuosa se mezcló con 30 mL de acetato de etilo. La fracción de acetato de etilo se secó con un rotavapor (Büchi B-48, Brinkmann Instruments, Westbury, EUA), se resuspendió en 0.75 mL de metanol al 80% y se pasó a través de un filtro de membrana PVDF (0.45 μ m, Pall, EUA).

Los compuestos fenólicos se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) con algunas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 20 μ L del extracto metanólico con 220 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido ocho veces. Después de 3 min, se agregaron 60 μ L de una solución de carbonato de sodio al 7% a la mezcla, se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 min y se midió la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro BioMate 3S (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) 100 g⁻¹ dw.

Genotipificación con microsatélites

El ADN se extrajo de tejido foliar conforme a lo descrito por Cingilli y Akçin (2005) y todos los genotipos se analizaron empleando 31 marcadores microsatélites. Las reacciones en cadena de la polimerasa (15 μ L) contenían 50 ng de ADN, solución amortiguadora para 1X PCR (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM), MgCl₂ 2.1 mM, dNTP 0.083 mM, 0.42 μ M de ambos cebadores y 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Para las reacciones se utilizó el termociclador C1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) con las siguientes indicaciones: 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1.5 min a 72 °C, con un periodo de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (w/v) con 1X TAE (Tris-ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) bajo condiciones no desnaturizantes (Wang *et al.*, 2003). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 μ g mL⁻¹) y se visualizaron bajo luz UV con un sistema Chemidoc XRS (BioRad). Las imágenes de los geles se usaron para estimar los tamaños de los alelos al comparar con los marcadores de tamaño molecular (escalera de 50 bp) utilizando el software Quantity One (BioRad).

Análisis estadístico

El número y la frecuencia de los marcadores alélicos, así como el contenido de información polimórfica (PIC) y la diversidad genética se determinaron con el software PowerMarker, versión 3.25 (Liu y Muse, 2005). La diversidad genética dentro de cada

10 clusters (K) and was run five times per K, adjusting the burn-in time to 100 000 and replication number to 1 000 000. The optimal value of K was determined according to delta K (Evanno *et al.*, 2005). The genetic relationships between the chickpeas were also graphically depicted by principal component analysis (PCA) using STATA version 11.1 (Stata Corp, College Station, Texas, USA). Linkage disequilibrium (LD) between the markers was measured by the parameter r^2 and associations between marker genotypes and quality traits were determined using the General Linear Model (GLM) in TASSEL v 2.1 (Bradbury *et al.*, 2007); the genetic structure was used as covariate and the significance was assessed using 5000 permutations ($p \leq 0.05$).

Quality traits data from genotypes of the same type were analyzed by two-way ANOVA using a complete randomized blocks design with three replications and the means were compared by the Tukey test ($p \leq 0.05$) using the software STATGRAPHIC Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp. USA). The average values of Desi and Kabuli genotypes were compared with a t-test ($p \leq 0.05$). Pearson correlation analyses were performed to test for associations between the traits.

RESULTS AND DISCUSSION

Genetic diversity

High-density multi-population consensus genetic maps were developed for chickpea and they cover from about 771 to 1061 cM (Varshney *et al.*, 2014; Khajuria *et al.*, 2015); the average genetic distance between the 31 microsatellite markers used in our study varied from 24 to 34 cM. All markers were polymorphic across the 23 chickpea genotypes analyzed and detected a total of 164 alleles; the number of alleles per locus varied from two to eight with an average of 5.3 (Table 2). This average value was lower than those found by Saeed *et al.* (2011) (6.25) in 44 Iranian *Cicer* accessions and Sethy *et al.* (2006) (6.4) in 36 chickpea accessions from ICRISAT using microsatellite markers, but it was higher than the 4.8 alleles per locus obtained by Choudhary *et al.* (2012) in 48 Indian accessions.

The polymorphic information content (PIC) estimates the discriminatory power of a marker and the average value was 0.67 (Table 2); the lowest value was found in the TA71 marker (0.36), which showed only two alleles, whereas the highest value was obtained by the CaSTMS2 and TR29 markers (0.80) that amplified seven alleles. Similar PIC values (0.44-0.84) were reported by Saeed *et al.* (2011) in 44 chickpea accessions from Iran.

genotipo de garbanzo se estimó a partir de 10 individuos. La distancia genética entre los garbanzos se calculó con el coeficiente de Nei *et al.* (1983). El agrupamiento se realizó empleando el método de pares de grupos no ponderados con media aritmética (UPGMA) y el dendrograma se visualizó usando MEGA v5.0 (Kumar *et al.*, 2016) con un valor de *bootstrap* de 1000. La estructura genética se analizó con un método de agrupamiento basado en modelos utilizando el software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). El software evaluó de 1 a 10 agrupamientos (K) y se ejecutó cinco veces por K, ajustando el periodo de presimulación a 100 000 y el número de repeticiones a 1 000 000. El valor óptimo de K se determinó conforme a delta K (Evanno *et al.*, 2005). Las relaciones genéticas entre los garbanzos también se representaron gráficamente por análisis de componentes principales (PCA) utilizando la versión 11.1 de STATA (Stata Corp, College Station, Texas, EUA). El desequilibrio de ligamiento (LD) entre los marcadores se midió con el parámetro r^2 , y las asociaciones entre los genotipos de los marcadores y las características de calidad se determinaron con el Modelo Lineal Generalizado (GLM) en TASSEL v 2.1 (Bradbury *et al.*, 2007); se empleó la estructura genética como covariable y la significancia se estimó usando 5000 permutaciones ($p \leq 0.05$).

Los datos de las características de calidad de los genotipos del mismo tipo se analizaron mediante un ANDEVA de dos vías empleando un diseño de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el software STATGRAPHIC Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp. EUA). Los valores promedio de los genotipos Desi y Kabuli se compararon con una prueba t ($p \leq 0.05$). Análisis de correlación de Pearson se usaron para evaluar relaciones entre las características.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética

Mapas genéticos de consenso de alta densidad y multipoblacionales se han desarrollado para el garbanzo y abarcan aproximadamente de 771 a 1061 cM (Varshney *et al.*, 2014; Khajuria *et al.*, 2015); la distancia genética promedio entre los 31 marcadores microsatélites empleados en el presente estudio varió de 24 a 34 cM. Todos los marcadores fueron polimórficos en los 23 genotipos de garbanzo analizados y se detectó un total de 164 alelos; el número de alelos por locus varió de dos a ocho con un promedio de 5.3 (Cuadro 2). Este valor promedio fue menor al reportado por Saeed *et al.* (2011) (6.25) en 44 accesiones de *Cicer* iraní y Sethy *et al.* (2006) (6.4) en 36 accesiones de garbanzo del ICRISAT utilizando

Table 2. Polymorphic information content (PIC) of 31 microsatellite markers and gene diversity of 23 chickpea genotypes.**Cuadro 2.** Contenido de información polimórfica (PIC) de 31 marcadores microsatélites y diversidad genética de 23 genotipos de garbanzo.

Marker	Location	Repeated sequence	No. alleles	PIC	Genotype	Gene diversity
TA113	LG1	(TAA)26	6	0.67	ICC 6306	0.16
TA8	LG1	(TAA)44	4	0.64	ICC 4418	0.25
TR43	LG1	(TAA)24	6	0.70	ICC 3761	0.11
CaSTMS21	LG1	(CT)9n(CTTT)2(CT)4	2	0.37	ICC 3512	0.27
TA27	LG2	(TAA)21	3	0.52	ICC 5383	0.13
TA200	LG2	(TTA)37	5	0.64	ICC 13124	0.11
TA206	LG2	(TAA)25	6	0.76	ICC 14872	0.16
TA135	LG3	(TAA)17	4	0.63	ICC 5613	0.10
TR2	LG3	(TTA)36	6	0.76	ICC 3421	0.14
TR31	LG3	(TAA)20n(A)5(TAA)9	7	0.79	Surutato 77	0.03
TA64	LG3	(TAA)39	5	0.73	S. Domingo 82	0.01
TA76s	LG3	(AAT)7(AAT)4[(ACTAAT)11]2n(AAT)3n(AAT)2(ATT)5	5	0.71	B. Sinaloa 92	0.24
TA130	LG4	(TAA)19	6	0.73	Progreso 95	0.12
TA72	LG4	(ATT)36	5	0.66	Jamu 96	0.18
NCPGR6	LG4	(CA)12	5	0.68	Evora 98	0.12
NCPGR7	LG4	(CA)14	4	0.52	Suprema 03	0.24
TA46	LG4	(TAA)22	5	0.57	Costa 2004	0.15
TA71	LG5	(AAT)32	2	0.36	Jumbo 2010	0.21
TaaSH	LG5	(TAA)40	5	0.68	Blanoro	0.12
TR29	LG5	(TAA)8n(TAA)32	7	0.80	Hoga 021	0.15
TA14	LG6	(TAA)22n(TAA)4T(A)3n(AAT)5n(A)3n(GA)4(TAA)5	5	0.64	Hoga 340	0.11
CaSTMS15	LG6	(ATT)21	5	0.64	Hoga 447	0.24
TA22	LG6	(ATT)40	6	0.62	Hoga 490	0.16
TR7	LG6	(TTA)25	6	0.73		
TS84	LG6	(TTA)25	5	0.68		
CaSTMS2	LG6	(TAT)25	7	0.80		
TA21	LG7	(TAA)51	8	0.79		
TAA58	LG7	(AAT)41	6	0.74		
NCPGR19	LG7	(GA)19	7	0.76		
NCPGR12	LG7	(CT)35	6	0.73		
TA118	LG8	(TAA)45	5	0.74		
Average			5.3	0.67		0.15
Total Desi			113			0.62
Total Kabuli			127			0.61
Total			164			0.72

Gene diversity within the chickpea genotypes varied from 0.01 (Santo Domingo 82) to 0.27 (ICC 3512) with an average of 0.15. These values are similar to those reported by Keneni *et al.* (2012) in 12 chickpea populations from Ethiopia. The low genetic diversity observed in the cultivars Santo Domingo 82 and Surutato 77 corresponds with the fact that they represent the genetic basis of several Kabuli genotypes developed in Mexico (Table 1). The gene diversity values within the Desi and Kabuli genotypes were similar (0.62 and 0.61), but the number of alleles were 113 and 127, respectively (Table 2). There were

marcadores microsatélites, pero mayor a los 4.8 alelos por locus obtenidos por Choudhary *et al.* (2012) en 48 accesiones de la India.

El contenido de información polimórfica (PIC) estima el poder discriminatorio de un marcador y su valor promedio fue 0.67 (Cuadro 2); el valor más bajo se encontró en el marcador TA71 (0.36), que mostró únicamente dos alelos, mientras que el valor más alto se obtuvo en los marcadores CaSTMS2 y TR29 (0.80), los cuales amplificaron siete alelos. Saeed *et al.* (2011) reportaron valores de PIC similares (0.44-0.84) en 44 accesiones de garbanzo de Irán.

33 alleles unique to Desi chickpeas and 51 alleles only found in Kabuli genotypes. The total gene diversity value was 0.72, which is similar to the 0.74 found by Sethy *et al.* (2006) in 36 chickpea accessions from ICRISAT and the 0.70 reported by De Giovanni *et al.* (2017) in a collection of 103 *Cicer arietinum* accessions from the USDA GenBank. The allelic variation of the microsatellite markers and the total gene diversity found in the present study (Table 2) demonstrated a broad genetic basis of the chickpea genotypes evaluated.

Genetic relationships and population structure

The genetic distance between the 23 chickpea genotypes was estimated using the coefficient of Nei *et al.* (1983). The UPGMA clustering separated the genotypes into two main groups corresponding to Desi and Kabuli types (Figure 1A). The first genotypes clustered together within the Desi group were ICC 3761 and ICC 4418, two black chickpeas from Iran whose genetic distance was 0.419. Three genotypes that clustered more distantly within the same subgroup were ICC 5383 and ICC 5613 from India, as well as ICC 6306 from Russia. The other four genotypes formed another subgroup; two brown chickpeas from India (ICC 13124 and ICC 14872) showed a genetic distance of 0.516 and clustered together, followed by ICC 3512, a brown color genotype from Iran and more distantly ICC 3421, a cream chickpea from Israel.

The Kabuli group was formed by chickpea genotypes developed by the INIFAP's Breeding Program in Northwestern Mexico. In one of the subgroups, Santo Domingo 82 showed the smallest genetic distance (0.387) with Evora 98, which originated from a cross between Surutato 77 and Santo Domingo 82, two genotypes that represent the genetic basis of several Kabuli genotypes developed in Mexico (Table 1). Progreso 95 and Hoga 490 also formed part of this subgroup; Progreso 95 originated from Santo Domingo 82, whereas the advanced line Hoga 490 clustered together even though it appears to be more genetically distant based on its pedigree (Table 1). Blanco Sinaloa 92 and Suprema 03 also clustered together within the Kabuli group, as both genotypes derived from the cross between Santo Domingo 82 and Blanco Lechoso, a chickpea line from Spain with good grain quality traits. Costa 2004 and Hoga 021

La diversidad genética dentro de los genotipos de garbanzo varió de 0.01 (Santo Domingo 82) a 0.27 (ICC 3512) con un promedio de 0.15. Estos valores son similares a los reportados por Keneni *et al.* (2012) en 12 poblaciones de garbanzo de Etiopía. La baja diversidad genética observada en los cultivares Santo Domingo 82 y Surutato 77 coincide con el hecho de que representan la base genética de diversos genotipos Kabuli desarrollados en México (Cuadro 1). Los valores de diversidad genética dentro de los genotipos Desi y Kabuli fueron similares (0.62 y 0.61), pero los números de alelos fueron 113 y 127, respectivamente (Cuadro 2). Se encontraron 33 alelos específicos del garbanzo tipo Desi y 51 alelos específicos del genotipo Kabuli. El valor de diversidad genética total fue 0.72, que es similar al 0.74 reportado por Sethy *et al.* (2006) en 36 accesiones de garbanzo del ICRISAT y el 0.70 reportado por De Giovanni *et al.* (2017) en una colección de 103 accesiones de *Cicer arietinum* del banco de genes del USDA. La variación alélica de los marcadores microsatélites y la diversidad genética total reportadas en este estudio (Cuadro 2) demostraron una amplia base genética de los genotipos de garbanzo evaluados.

Relaciones genéticas y estructura poblacional

La distancia genética entre los 23 genotipos de garbanzo se estimó con el coeficiente de Nei *et al.* (1983). El agrupamiento UPGMA separó los genotipos en dos grupos principales, tipos Desi y Kabuli (Figura 1A). Los primeros genotipos agrupados en Desi fueron ICC 3761 e ICC 4418, dos genotipos de garbanzo negro de Irán cuya distancia genética fue 0.419. Tres genotipos agrupados a una mayor distancia dentro del mismo subgroup fueron ICC 5383 e ICC 5613 de India, así como ICC 6306 de Rusia. Los otros cuatro genotipos formaron otro subgroup; dos genotipos de garbanzo café de India (ICC 13124 e ICC 14872) presentaron una distancia genética de 0.516 y se agruparon, seguidos por ICC 3512, un genotipo de color café de Irán, y con mayor distancia el ICC 3421, un genotipo de garbanzo color crema de Israel.

El grupo Kabuli se integró por genotipos de garbanzo desarrollados por el Programa de Mejoramiento Genético del INIFAP en el Noroeste de México. En uno de los subgrupos, Santo Domingo 82 presentó la distancia genética más pequeña (0.387) con Evora 98,

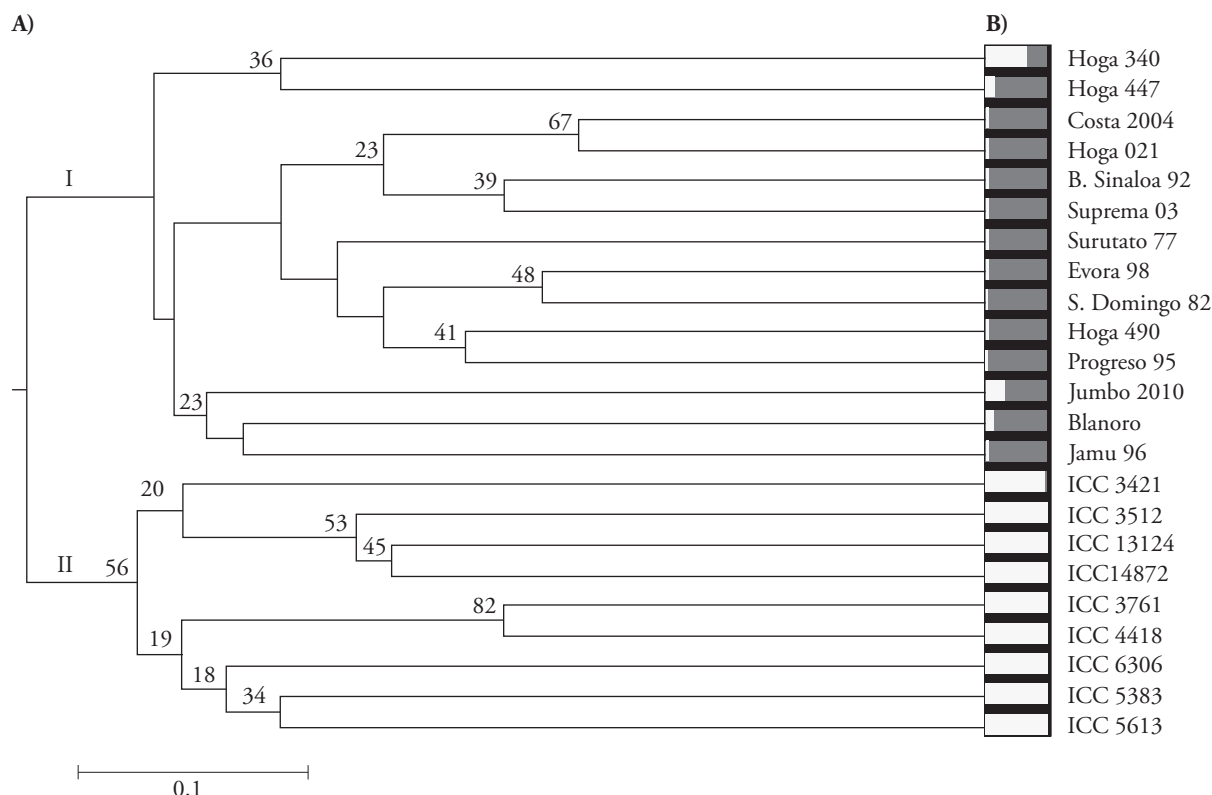


Figure 1. Genetic relationships among 23 chickpea genotypes from Mexico and ICRISAT. A) Dendrogram constructed using the UPGMA method based on Nei *et al.* (1983) distance. Clusters I and II correspond to Kabuli and Desi genotypes, respectively. B) Estimated population structure of the chickpea genotypes ($K=2$). Each individual is represented by a horizontal bar, which is partitioned into colored segments that represent the different populations. Population I (black), population II (white).

Figura 1. Relaciones genéticas entre 23 genotipos de garbanzo de México y el ICRISAT. A) Dendrograma obtenido con el método de UPGMA basado en la distancia de Nei *et al.* (1983). Los grupos I y II corresponden a los genotipos Kabuli y Desi, respectivamente. B) Estructura poblacional estimada de los genotipos de garbanzo ($K=2$). Cada individuo está representado por una barra horizontal, dividida en segmentos de diferente color que representan las diferentes poblaciones. Población I (negro), población II (blanco).

derived from Blanco Sinaloa 92 and they also clustered together with a genetic distance of 0.355.

Three genotypes that clustered more distantly within the same group were Blanoro, Jamu 96 and Jumbo 2010; the first two genotypes share the genetic background of Blanco Lechoso (Table 1), whereas Jumbo 2010 shares the Blanco Sinaloa 92 background and, therefore, the slightly higher genetic distance of this genotype may be due to the influence from Dwelley, a Kabuli cultivar developed by the USDA-ARS from a cross between FLIP 85-58 and Surutato 77 (Muehlbauer *et al.*, 1998a). Lastly, the genotypes Hoga 447 and Hoga 340 were grouped more distantly (0.613). The first genotype has the same parents as Blanoro and the second one resulted from the cross between Sandford, a sister line of Dwelley

que es el resultado de una cruce entre Surutato 77 y Santo Domingo 82, dos genotipos que representan la base genética de diversos genotipos Kabuli desarrollados en México (Cuadro 1). Progreso 95 y Hoga 490 también formaron parte de este subgrupo; Progreso 95 surgió de Santo Domingo 82, mientras que la línea avanzada Hoga 490 se agrupó a pesar de que parece tener una mayor distancia genética con base en su linaje (Cuadro 1). Blanco Sinaloa 92 y Suprema 03 también se ubicaron juntos dentro del grupo Kabuli, ya que ambos genotipos surgieron de la cruce entre Santo Domingo 82 y Blanco Lechoso, una línea de garbanzo española con buenas características de calidad de grano. Costa 2004 y Hoga 021 surgieron de Blanco Sinaloa 92 y también se agruparon con una distancia genética de 0.355.

(Muehlbauer *et al.*, 1998b), and Blanco Sinaloa 92; both share the genetic background of Blanco Sinaloa 92. Thus, cluster analysis of the Kabuli genotypes was in agreement with the pedigree data (Table 1).

The model-based clustering provided support for the existence of genetic structure in the chickpea genotypes (Figure 1B). Individuals with a probability of membership $\geq 80\%$ were assigned to the same group (Choudhary *et al.*, 2012; Keneni *et al.*, 2012). This analysis was consistent with the dendrogram generated (Figure 1A). The Kabuli genotypes were assigned to population I (Pop I, Black), whereas the Desi chickpeas were assigned to pop II (White) (Figure 1B). The structure obtained was similar to that described by Choudhary *et al.* (2012) and Hajibarat *et al.* (2014), who observed a $K=2$ with uniform structure. Sefera *et al.* (2011) also grouped chickpea genotypes into two subpopulations corresponding to Desi and Kabuli types.

Principal component analysis (PCA) was used to estimate the distribution of variance and genetic relationships within the 23 genotypes. A plot of PC1 (12.89%) and PC2 (8.50%) revealed two groups (Figure 2). The group on the left side of the plot

Los tres genotipos que se agruparon a una mayor distancia dentro del mismo grupo fueron Blanoro, Jamu 96 y Jumbo 2010; los primeros dos genotipos comparten el trasfondo genético de Blanco Lechoso (Cuadro 1), mientras que Jumbo 2010 comparte el trasfondo de Blanco Sinaloa 92 y, por lo tanto, la ligeramente mayor distancia genética de este genotipo se podría deber a la influencia de Dwelley, un cultivar tipo Kabuli desarrollado por el USDA-ARS a partir de una cruce entre FLIP 85-58 y Surutato 77 (Muehlbauer *et al.*, 1998a). Finalmente, los genotipos Hoga 447 y Hoga 340 se agruparon a una mayor distancia (0.613). El primer genotipo tiene los mismos progenitores que Blanoro y el segundo es el resultado de la cruce entre Sandford, una línea hermana de Dwelley (Muehlbauer *et al.*, 1998b), y Blanco Sinaloa 92; ambos comparten el trasfondo genético de Blanco Sinaloa 92. Así, el análisis de agrupamiento de los genotipos Kabuli coincide con los datos de linaje (Cuadro 1).

El agrupamiento basado en modelos proporcionó evidencias de la existencia de la estructura genética en los genotipos de garbanzo (Figura 1B). Los individuos con una probabilidad de afiliación $\geq 80\%$ se asignaron al mismo grupo (Choudhary *et al.*, 2012; Keneni *et*

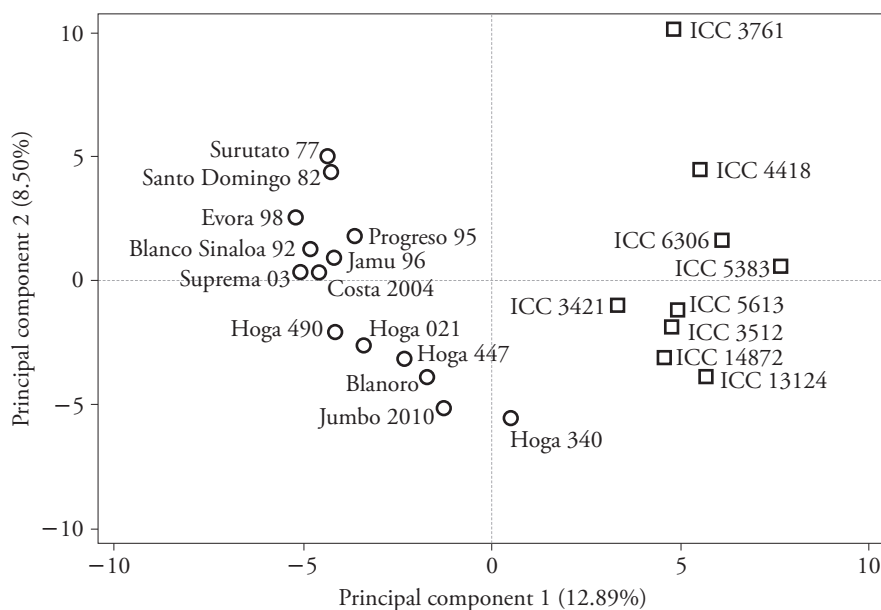


Figure 2. Principal component representation of 23 chickpea genotypes from Mexico and ICRI SAT using 31 microsatellite markers. Symbols reflect the individuals grouped according to the dendrogram. First group (open circles), second group (open squares).

Figura 2. Representación de los componentes principales de 23 genotipos de garbanzo de México y el ICRI SAT utilizando 31 marcadores microsatélites. Los símbolos representan los individuos agrupados conforme al dendrograma. Primer grupo (círculos vacíos), segundo grupo (cuadrados vacíos).

was formed by individuals of population I (Kabuli genotypes), whereas the other group formed in the upper and lower right plot side corresponded mainly to individuals of the population II (Desi genotypes). PCA and population structure provide good predictions of grouping patterns and they are commonly used to complement the cluster analysis, since different combinations of genetic distance matrices and clustering algorithms may result in different groups (Reif *et al.*, 2005). The three grouping methods used in the present study showed high concordance in recognizing two principal groups that corresponded to Desi and Kabuli genotypes.

Grain quality traits

The 100-seed weight (100-SW) is an important quality trait for chickpea commercialization and its range of values in Desi and Kabuli genotypes were 14.9-39.2 and 40.4-89.1 g, respectively (Table 3). The Desi chickpeas showed 100-SW values within the range reported by Wang *et al.* (2017) for an extensive collection of Desi genotypes from ICRISAT (8.9-38.0 g), whereas most of the Kabuli genotypes showed values higher than those reported by Gowda *et al.* (2011a) (20.5-63.0 g) and Wang *et al.* (2017) (9.7-57.9 g) in Kabuli chickpeas from ICRISAT collected from different regions around the world. These results are in agreement with the fact that the Chickpea Breeding Program at INIFAP has focused on seed size and yield. Blanco Sinaloa 92 is the most competitive chickpea cultivar developed in Mexico, but other promising genotypes are Jumbo 2010 and Blanoro (Table 3). Regarding the seed coat proportion, the average value in Desi chickpeas ($17.7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) was similar to the $16.6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ reported by Segev *et al.* (2010) in 15 Desi genotypes. The average seed coat content in Desi genotypes was 2.3 times higher than that of the Kabuli genotypes ($7.8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), which can be associated with the greater surface area of the small Desi seeds compared to the large seeds of Kabuli genotypes.

Starch content ranged from 31.0 (ICC 5383) to $47.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (ICC 14872) in the Desi genotypes; this range of values is similar to that reported by Wang *et al.* (2017) in a collection of Desi genotypes grown in India (31.3-47.4 $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$). Kabuli genotypes showed starch contents from 32.5 (Progreso 95) to $55.9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (Santo Domingo

al., 2012). Este análisis coincide con el dendrograma obtenido (Figura 1A). Los genotipos Kabuli se asignaron a la población I (Pop I, Negro), mientras que los garbanzos tipo Desi se asignaron a la población II (Blanco) (Figura 1B). La estructura obtenida fue similar a la descrita por Choudhary *et al.* (2012) y Hajibarat *et al.* (2014), quienes observaron una $K=2$ con estructura uniforme. Sefera *et al.* (2011) también agruparon los genotipos de garbanzo en dos subpoblaciones correspondientes a los tipos Desi y Kabuli.

El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para estimar la distribución de varianza y las relaciones genéticas entre los 23 genotipos. Un gráfico de PC1 (12.89%) y PC2 (8.50%) reveló dos grupos (Figura 2). El grupo del lado izquierdo del gráfico está formado por individuos de la población I (genotipos Kabuli), mientras que el otro grupo en el lado superior e inferior derecho del gráfico correspondió principalmente a los individuos de la población II (genotipos Desi). El PCA y la estructura poblacional proporcionan buenas predicciones de patrones de agrupación y se utilizan comúnmente para complementar el análisis de agrupamiento, ya que diferentes combinaciones de matrices de distancia genética y algoritmos de agrupamiento pueden resultar en diferentes grupos (Reif *et al.*, 2005). Los tres métodos de agrupamiento utilizados en este estudio presentaron una elevada concordancia en el reconocimiento de dos grupos principales que corresponden a los genotipos Desi y Kabuli.

Características de calidad de grano

El peso de 100-semillas (100-SW) es una característica de calidad importante para la comercialización de garbanzo y el intervalo de este valor en los genotipos Desi y Kabuli fue 14.9-39.2 y 40.4-89.1 g, respectivamente (Cuadro 3). Los garbanzos tipo Desi presentaron valores de 100-SW dentro del intervalo reportado por Wang *et al.* (2017) para una colección exhaustiva de genotipos Desi del ICRISAT (8.9-38.0 g), mientras que la mayoría de los genotipos Kabuli presentaron valores mayores a los reportados por Gowda *et al.* (2011a) (20.5-63.0 g) y Wang *et al.* (2017) (9.7-57.9 g) en garbanzos tipo Kabuli del ICRISAT colectados de diferentes regiones alrededor del mundo. Estos resultados coinciden con el hecho de que el Programa de Mejoramiento Genético del Garbanzo en el INIFAP se ha enfocado en el tamaño y rendimiento de

Table 3. Grain quality traits of the chickpea genotypes.**Cuadro 3.** Características de calidad de grano de los genotipos de garbanzo.

Genotype	100-SW (g)	Seed Coat (g 100 g ⁻¹)	Starch (g 100 g ⁻¹)	Protein (g 100 g ⁻¹)	Phenolics (mg GAE 100 g ⁻¹)
ICC 6306	34.4 ± 2.9 ^b	17.3 ± 0.2 ^{cde}	41.8 ± 3.4 ^{bc}	24.9 ± 0.3 ^c	311.9 ± 1.9 ^b
ICC 4418	14.9 ± 0.8 ^f	28.1 ± 0.2 ^a	43.5 ± 0.6 ^b	24.7 ± 0.6 ^c	362.0 ± 8.9 ^a
ICC 3761	15.0 ± 0.6 ^f	20.2 ± 0.7 ^b	45.9 ± 0.8 ^{ab}	22.4 ± 0.5 ^d	173.4 ± 1.1 ^c
ICC 3512	23.8 ± 0.3 ^{cd}	19.4 ± 1.5 ^{bc}	39.3 ± 1.3 ^d	28.9 ± 0.7 ^b	136.7 ± 7.4 ^d
ICC 5383	25.7 ± 0.4 ^c	13.1 ± 0.4 ^f	31.0 ± 0.5 ^f	27.7 ± 0.3 ^a	100.2 ± 3.6 ^e
ICC 13124	39.2 ± 1.6 ^a	10.3 ± 0.2 ^g	40.2 ± 0.5 ^{cd}	25.6 ± 0.4 ^c	69.9 ± 1.6 ^f
ICC 14872	22.1 ± 0.7 ^{de}	18.9 ± 1.9 ^{bcd}	47.5 ± 0.8 ^a	21.5 ± 0.5 ^d	102.1 ± 4.9 ^e
ICC 5613	19.9 ± 0.4 ^e	16.5 ± 0.8 ^{de}	35.7 ± 2.1 ^e	27.2 ± 0.2 ^{bc}	161.3 ± 3.2 ^c
ICC 3421	22.4 ± 0.3 ^{cde}	15.2 ± 0.7 ^{ef}	43.1 ± 0.7 ^{bc}	29.9 ± 0.6 ^a	24.1 ± 1.0 ^g
AVG (Desi)	24.2 ^b	17.7 ^a	41.0 ^b	25.9 ^a	160.2 ^a
Surutato 77	56.9 ± 0.8 ^{fgh}	16.5 ± 0.4 ^{ab}	34.8 ± 0.6 ^{fg}	25.3 ± 0.6 ^{cd}	38.3 ± 1.8 ^{de}
S. Domingo 82	55.5 ± 0.9 ^{ghi}	15.0 ± 0.1 ^b	55.9 ± 0.6 ^a	23.1 ± 0.5 ^{ef}	28.7 ± 1.1 ^{fg}
B. Sinaloa 92	71.6 ± 0.6 ^{cd}	4.7 ± 0.1 ^{def}	46.9 ± 1.4 ^d	22.2 ± 0.6 ^h	37.9 ± 1.2 ^{de}
Progreso 95	49.1 ± 1.3 ^{ij}	18.3 ± 1.5 ^a	32.5 ± 1.9 ^g	29.7 ± 0.3 ^a	44.2 ± 1.4 ^{bc}
Jamu 96	40.4 ± 1.8 ^k	5.9 ± 0.2 ^{cde}	50.4 ± 0.9 ^{bcd}	22.8 ± 0.6 ^{efgh}	33.2 ± 3.2 ^{ef}
Evora 98	44.2 ± 0.8 ^{jk}	6.4 ± 1.1 ^{cd}	42.0 ± 0.7 ^e	22.1 ± 0.1 ^{fgh}	32.9 ± 2.4 ^{ef}
Suprema 03	65.7 ± 1.3 ^{de}	5.2 ± 0.5 ^{def}	50.7 ± 4.0 ^{bc}	24.8 ± 0.8 ^{ef}	47.7 ± 1.3 ^{ab}
Costa 2004	51.1 ± 2.6 ^{hi}	6.2 ± 0.3 ^{cde}	36.9 ± 0.5 ^f	21.2 ± 1.9 ^{gh}	50.1 ± 1.2 ^a
Jumbo 2010	89.1 ± 1.3 ^a	4.2 ± 0.4 ^{ef}	42.4 ± 3.5 ^e	24.9 ± 0.7 ^{de}	27.1 ± 1.3 ^g
Blanoro	81.4 ± 3.3 ^b	3.7 ± 0.5 ^f	41.1 ± 0.5 ^e	28.0 ± 0.2 ^{ab}	30.7 ± 1.2 ^{fg}
Hoga 021	76.0 ± 2.7 ^{bc}	4.3 ± 0.2 ^{ef}	42.1 ± 1.0 ^e	24.2 ± 0.5 ^{def}	40.0 ± 1.3 ^{cd}
Hoga 340	72.6 ± 5.3 ^c	4.7 ± 1.1 ^{def}	48.3 ± 1.1 ^{cd}	22.5 ± 0.8 ^{fgh}	49.3 ± 1.2 ^{ab}
Hoga 447	62.1 ± 1.6 ^{ef}	5.9 ± 1.1 ^{cde}	52.8 ± 0.1 ^{ab}	22.9 ± 0.9 ^{efg}	26.1 ± 1.2 ^g
Hoga 490	60.4 ± 0.2 ^{efg}	7.6 ± 0.7 ^c	43.6 ± 0.7 ^e	26.5 ± 0.3 ^{cd}	33.2 ± 3.2 ^{ef}
AVG (Kabuli)	62.6 ^a	7.8 ^b	44.3 ^a	24.3 ^b	37.1 ^b

100-SW: 100-seed weight. Means with different superscript letters in a column within the same type of chickpea are significantly different (Tukey, $p \leq 0.05$). Different letters between the average values of Desi and Kabuli chickpeas indicate significant differences (t-test; $p \leq 0.05$). ♦ 100-SW: peso de 100-semillas. Las medias con diferentes letras superíndice en una columna dentro del mismo tipo de garbanzo son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Las diferentes letras entre los valores promedio de los garbanzos tipo Desi y Kabuli indican diferencias significativas (t-test; $p \leq 0.05$).

82) and their average value was higher than that of Desi types (Table 3). These values are similar to those reported by Wang *et al.* (2017) in Kabuli genotypes (33.0–53.8 g 100 g⁻¹). The protein content varied from 21.5 (ICC 14872) to 29.9 g 100 g⁻¹ (ICC 3421) and from 21.2 (Costa 2004) to 29.7 g 100 g⁻¹ (Progreso 95) for Desi and Kabuli genotypes, respectively (Table 3); these values fall within the range reported by Wang *et al.* (2017) (15.1–31.6 g 100 g⁻¹) and Bhagyawant *et al.* (2018) (4.6–33.9 g 100 g⁻¹) in two chickpea collections from ICRISAT, but some of them were higher than those reported by Jadhav *et al.* (2015) in another collection of 187 genotypes grown in India (13.3–26.8 g 100 g⁻¹). The variability observed in starch and protein content in the chickpea genotypes suggests they represent a good source of genes to improve these traits; however, as

la semilla. Blanco Sinaloa 92 es el cultivar de garbanzo más competitivo desarrollado en México, pero otros genotipos prometedores son Jumbo 2010 y Blanoro (Cuadro 3). Con respecto a la proporción de cubierta de la semilla, el valor promedio en los garbanzos tipo Desi (17.7 g 100 g⁻¹) fue similar al reportado por Segev *et al.* (2010) (16.6 g 100 g⁻¹) en 15 genotipos Desi. El contenido promedio de cubierta de la semilla en los genotipos Desi fue 2.3 veces mayor al de los genotipos Kabuli (7.8 g 100 g⁻¹), lo que se podría deber a la mayor área superficial de las semillas pequeñas del garbanzo tipo Desi en comparación con las semillas grandes de los genotipos Kabuli.

El contenido de almidón osciló de 31.0 (ICC 5383) a 47.5 g 100 g⁻¹ (ICC 14872) en los genotipos Desi; este intervalo de valores es similar al reportado por Wang *et al.* (2017) en una colección de genotipos

observed in chickpea (Wang *et al.*, 2017), there was a significant inverse relationship ($r = -0.597$, $p \leq 0.01$) between starch and protein content. Nevertheless, there were some promising genotypes with relatively high levels of both components, such as ICC 3421 and Blanoro (Table 3).

Total phenolics varied from 24.1 (ICC 3421) to 362.0 mg GAE 100 g⁻¹ (ICC 4418) in the Desi chickpeas and from 26.1 (Hoga 447) to 50.1 mg GAE 100 g⁻¹ (Costa 2004) in the Kabuli genotypes (Table 3). The values were in agreement with those reported in chickpea (Bhagyawant *et al.*, 2018), except for two genotypes with black seeds (ICC 4418 and ICC 6306) that showed high levels of phenolics. The average content of these compounds was 4.3 times higher in Desi than Kabuli genotypes, which agreed with reports showing higher levels of phenolics in chickpeas with dark-colored seeds than those with white/cream seeds (Segev *et al.*, 2010).

Marker-trait associations

The average LD between the markers measured as r^2 was 0.098, which was very close to the minimum threshold value ($r^2 = 0.1$) considered for significant association between pairs of loci (Zhu *et al.*, 2008). A low-resolution association analysis was performed taking as cofactor the genetic structure of the population (Table 4), which revealed 12 markers associated with the quality traits ($p \leq 0.05$). Three markers located on linkage groups (LG) 4 (NCPGR7, TA46) and 8 (TA118) were associated with 100-SW. Seed weight is a very important in chickpea and several genetic studies using microsatellite markers were conducted to find genomic regions influencing this trait. Cobos *et al.* (2007; 2009) identified highly significant QTLs for seed weight on LG4 linked to the markers TA130, GA24 and STMS11. Varshney *et al.* (2014) also identified two QTLs on LG4 flanked by the NCPGR127-NCPGR21 and CaM2093-ICCM0249 markers, whereas Saeed *et al.* (2013) reported a significant association between the NCPGR6 marker and seed weight in the same region. The NCPGR7 marker associated with 100-SW in our study was located very close to CaM2093 and NCPGR6, supporting the importance of LG4 for the improvement of yield related traits in chickpea. Other QTLs reported for seed weight were identified on LG1 (Das *et al.*, 2015), LG2 (Cobos *et al.*, 2009)

Desi cultivados en India (31.3-47.4 g 100 g⁻¹). Los genotipos Kabuli presentaron contenidos de almidón de 32.5 (Progreso 95) a 55.9 g 100 g⁻¹ (Santo Domingo 82) y su valor promedio fue mayor al del tipo Desi (Cuadro 3). Estos valores son similares a los reportados por Wang *et al.* (2017) en genotipos Kabuli (33.0-53.8 g 100 g⁻¹). El contenido de proteína osciló de 21.5 (ICC 14872) a 29.9 g 100 g⁻¹ (ICC 3421) y de 21.2 (Costa 2004) a 29.7 g 100 g⁻¹ (Progreso 95) para los genotipos Desi y Kabuli, respectivamente (Cuadro 3); estos valores se encuentran dentro del intervalo reportado por Wang *et al.* (2017) (15.1-31.6 g 100 g⁻¹) y Bhagyawant *et al.* (2018) (4.6-33.9 g 100 g⁻¹) en dos colecciones de garbanzo del ICRISAT, pero algunos fueron mayores a los reportados por Jadhav *et al.* (2015) en otra colección de 187 genotipos cultivados en India (13.3-26.8 g 100 g⁻¹). La variabilidad observada en el contenido de almidón y proteína en los genotipos de garbanzo sugiere que representan una buena fuente de genes para mejorar estas características; sin embargo, como se observó previamente en el garbanzo (Wang *et al.*, 2017), hubo una relación inversa significativa ($r = -0.597$, $p \leq 0.01$) entre el contenido de almidón y proteína. No obstante, se observaron algunos genotipos prometedores con niveles relativamente altos de ambos componentes, como ICC 3421 y Blanoro (Cuadro 3).

Los fenólicos totales variaron de 24.1 (ICC 3421) a 362.0 mg de GAE 100 g⁻¹ (ICC 4418) en los garbanzos tipo Desi y de 26.1 (Hoga 447) a 50.1 mg de GAE 100 g⁻¹ (Costa 2004) en los genotipos Kabuli (Cuadro 3). Los valores coinciden con los reportados en garbanzo (Bhagyawant *et al.*, 2018), excepto dos genotipos con semillas negras (ICC 4418 y ICC 6306) que presentaron altos niveles de fenólicos. El contenido promedio de estos compuestos fue 4.3 veces mayor en los genotipos Desi que en Kabuli, lo que coincide con informes de niveles más altos de compuestos fenólicos en garbanzos con semillas de color oscuro que en aquellos con semillas color blanco/crema (Segev *et al.*, 2010).

Asociaciones marcador-característica

El LD promedio entre los marcadores medido como r^2 fue 0.098, muy cercano al valor umbral mínimo ($r^2 = 0.1$) considerado para la asociación significativa entre pares de loci (Zhu *et al.*, 2008). Un análisis de asociación de baja resolución se realizó

Table 4. Associations between microsatellite markers and quality traits in 23 chickpea genotypes.**Cuadro 4.** Asociaciones entre marcadores microsatélites y características de calidad en 23 genotipos de garbanzo.

Trait	Marker	Location	GLM	R ²
100-SW	NCPGR7	LG4	0.038	0.242
	TA46	LG4	0.036	0.283
	TA118	LG8	0.033	0.281
Seed coat	NCPGR6	LG4	0.020	0.420
	TA8	LG1	0.026	0.351
Starch	TA64	LG3	0.015	0.489
	TA71	LG5	0.038	0.185
Protein	TaaSH	LG5	0.034	0.434
Phenolics	TA113	LG1	0.049	0.360
	TA8	LG1	0.050	0.242
	TA27	LG2	0.022	0.313

LG: linkage group; R²: phenotypic variation explained by the marker. ♦ LG: grupo de ligamiento; R²: variación fenotípica explicada por el marcador.

and LG8 (Cobos *et al.*, 2007). Seed coat content was associated with the NCPGR6 and TA8 (LG1) markers (Table 4) and showed a highly significant inverse correlation with 100-SW ($r = -0.795$; $p \leq 0.001$). In this sense, Saeed *et al.* (2013) found the NCPGR6 marker associated with seed weight, whereas TA8 was linked to a QTL for the same trait on LG1 (Das *et al.*, 2015).

The markers TA64 (LG3) and TA71 (LG5) showed significant associations with starch content. No reports were found showing genetic associations for this trait, but several QTLs are identified for desirable agronomic traits on these LG, yield-related traits such as seed weight (Gowda *et al.*, 2011b; Varshney *et al.*, 2014), a characteristic correlated with starch content in chickpea (Wang *et al.*, 2017). The protein content only showed association with the marker TaaSH on LG5 (Table 4). Jadhav *et al.* (2015) identified significant associations between this trait and two microsatellite markers located on LG3 (TR26) and LG5 (CaM1068). TaaSH maps close to CaM1068 and it is tightly linked to TA71 on LG5, which is in agreement with the inverse correlation observed between protein and starch content ($r = -0.597$; $p \leq 0.01$), suggesting that this region is very important for both characteristics. Protein content is also reported to be negatively correlated with seed weight

considerando como cofactor la estructura genética de la población (Cuadro 4), el cual reveló 12 marcadores asociados con las características de calidad ($p \leq 0.05$). Tres marcadores ubicados en los grupos de ligamiento (LG) 4 (NCPGR7, TA46) y 8 (TA118) se asociaron con el 100-SW. El peso de semilla es muy importante en el garbanzo y se han realizado varios estudios genéticos con marcadores microsatélites para encontrar regiones genómicas que afectan esta característica. Cobos *et al.* (2007; 2009) identificaron QTL altamente significativos para el peso de semilla en LG4 ligados a los marcadores TA130, GA24 y STMS11. Varshney *et al.* (2014) también identificaron dos QTL en LG4 flanqueados por los marcadores NCPGR127-NCPGR21 y CaM2093-ICCM0249, mientras que Saeed *et al.* (2013) reportaron una asociación significativa entre el marcador NCPGR6 y el peso de semilla en la misma región. El marcador NCPGR7 asociado con el 100-SW en el presente estudio se ubicó muy cerca de CaM2093 y NCPGR6, lo que corrobora la importancia de LG4 para la mejora de las características relacionadas con el rendimiento del garbanzo. Otros QTL reportados para el peso de semilla se identificaron en LG1 (Das *et al.*, 2015), LG2 (Cobos *et al.*, 2009) y LG8 (Cobos *et al.*, 2007). El contenido de cubierta de la semilla se asoció con los marcadores NCPGR6 y TA8 (LG1) (Cuadro 4) y presentó una

(Wang *et al.*, 2017), making it difficult to develop chickpea cultivars with high protein content and desired seed traits. Nevertheless, some promising genotypes with large seeds and relatively high levels of starch and protein (Table 3) were developed by the Chickpea Breeding Program at INIFAP in Mexico.

Two markers located on LG1 (TA113 and TA8) and one on LG2 (TA27) showed significant associations with total phenolics content (Table 4). This trait showed a highly significant correlation with 100-SW ($r = -0.608$; $p \leq 0.01$) and seed coat content ($r = 0.713$; $p \leq 0.01$). The marker TA113 was associated with seed coat color in chickpea (Hossain *et al.*, 2011), whereas TA8 was found linked to a QTL for 100-SW (Das *et al.*, 2015) and was also significantly associated with seed coat content in the present study (Table 4).

CONCLUSIONS

The chickpeas analyzed showed a broad genetic basis and the clustering of the different genotypes was in agreement with their origin and classification as Desi and Kabuli. The variation in grain quality traits showed association with some microsatellite markers. The phenotypic and genetic diversity observed suggest that these genetic materials represent a good source of genetic variation for further improvement of the grain quality in chickpea.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Universidad Autónoma de Sinaloa (PROFAP). MFQS received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico). We thank Milagros Ramírez and Víctor Valenzuela (INIFAP) for their assistance with the field work.

LITERATURE CITED

- AOAC. 2012. AOAC Official Method 960.52. Microchemical determination of nitrogen. Micro-Kjeldahl Method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19th. AOAC International. Gaithersburg, MA. p. 7.
- Bhagyawant, S. S., A. K. Gautam, D. T. Narvekar, N. Gupta, A. Bhadkaria, N. Srivastava, and H. D. Upadhyaya. 2018. Biochemical diversity evaluation in chickpea accessions employing mini-core collection. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24: 1165-1183.
- Bradbury, P. J., Z. Zhang, D. E. Kroon, T. M. Casstevens, Y. Ramdoss, and E. S. Buckler. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.

correlación inversa altamente significativa con el 100-SW ($r = -0.795$; $p \leq 0.001$). En este sentido, Saeed *et al.* (2013) encontraron una asociación entre el marcador NCPGR6 y el peso de semilla, mientras que TA8 se encontró ligado a un QTL para la misma característica en LG1 (Das *et al.*, 2015).

Los marcadores TA64 (LG3) y TA71 (LG5) presentaron asociaciones significativas con el contenido de almidón. No se encontraron reportes de asociaciones genéticas para esta característica, pero se han identificado diversos QTL para características agronómicas deseables en estos LG, características relacionadas con el rendimiento, como peso de semilla (Gowda *et al.*, 2011b; Varshney *et al.*, 2014), la cual se ha correlacionado con el contenido de almidón en el garbanzo (Wang *et al.*, 2017). El contenido de proteína se asoció únicamente con el marcador TaaSH en el LG5 (Cuadro 4). Jadhav *et al.* (2015) identificaron asociaciones significativas entre esta característica y dos marcadores microsatélites ubicados en el LG3 (TR26) y LG5 (CaM1068). TaaSH se ubica en el mapa cerca de CaM1068 y está estrechamente ligado a TA71 en el LG5, lo cual corresponde con la correlación inversa observada entre el contenido de proteína y almidón ($r = -0.597$; $p \leq 0.01$), lo cual sugiere que esta región es muy importante para ambas características. También se ha reportado que el contenido de proteína presenta una correlación negativa con el peso de semilla (Wang *et al.*, 2017), lo cual dificulta el desarrollo de cultivares de garbanzo con un alto contenido de proteína y características de semilla deseables. Sin embargo, el Programa para el Mejoramiento Genético del Garbanzo del INIFAP en México desarrolló algunos genotipos prometedores con semillas grandes y relativamente altos niveles de almidón y proteína (Cuadro 3).

Dos marcadores ubicados en el LG1 (TA113 y TA8) y uno en el LG2 (TA27) mostraron asociaciones significativas con el contenido de fenólicos totales (Cuadro 4). Esta característica se correlacionó significativamente con el 100-SW ($r = -0.608$; $p \leq 0.01$) y el contenido de la cubierta de la semilla ($r = 0.713$; $p \leq 0.01$). El marcador TA113 se asoció con el color de la cubierta de la semilla en el garbanzo (Hossain *et al.*, 2011), mientras que TA8 estuvo ligado al QTL para el 100-SW (Das *et al.*, 2015) y también se asoció significativamente con el contenido de cubierta de la semilla en el presente estudio (Cuadro 4).

- 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. *Gen. Mol. Res.* 11: 891-905.
- Cingilli, H., and A. Akçin. 2005. High quality DNA isolation method for chickpea genotypes. *Turkish J. Biol.* 29: 1-5.
- Cobos, M. J., J. Rubio, M. D. Fernández-Romero, R. Garza, M. T. Moreno, T. Millan, and J. Gil. 2007. Genetic analysis of seed size, yield and days to flowering in a chickpea recombinant inbred line population derived from a Kabuli × Desi cross. *Ann. Appl. Biol.* 151: 33-42.
- Cobos, M. J., P. Winter, M. Kharat, J. I. Cubero, J. Gil, T. Milian, and J. Rubio. 2009. Genetic analysis of agronomic traits in a wide cross of chickpea. *Field Crops Res.* 111: 130-136.
- Das, S., H. D. Upadhyaya, D. Bajaj, A. Kujur, S. Badoni, Laxmi, V. Kumar, S. Tripathi, C. L. L. Gowda, S. Sharma, S. Singh, A. K. Tyagi, and S. K. Parida. 2015. Deploying QTL-seq for rapid delineation of a potential candidate gene underlying major trait-associated QTL in chickpea. *DNA Res.* 22: 193-203.
- De Giovanni, C., S. Pavan, F. Taranto, V. Di Rienzo, M. M. Miazzi, A. R. Marcotrigiano, G. Mangini, C. Montemurro, L. Ricciardi, and C. Lotti. 2017. Genetic variation of a global germplasm collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) including Italian accessions at risk of genetic erosion. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 23: 197-205.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- FAO. 2017. FAOSTAT Statistics Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. <http://www.fao.org/faostat/> (Accessed: January 2019).
- Gowda, C. L. L., H. D. Upadhyaya, N. Dronavalli, and S. Singh. 2011a. Identification of large-seeded high-yielding stable kabuli chickpea germplasm lines for use in crop improvement. *Crop Sci.* 51: 198-209.
- Gowda, S. J. M., P. Radhika, L. B. Mhase, B. M. Jamadagni, V. S. Gupta, and N. Y. Kadoo. 2011b. Mapping of QTLs governing agronomic and yield traits in chickpea. *J. Appl. Genet.* 52: 9-21.
- Hajibarat, Z., A. Saidi, Z. Hajibarat, and R. Talebi. 2014. Genetic diversity and population structure analysis of landrace and improved chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes using morphological and microsatellite markers. *Environ. Exp. Biol.* 12: 161-166.
- Hossain, S., J. F. Panozzo, C. Pittock, and R. Ford. 2011. Quantitative trait loci analysis of seed coat color components for selective breeding in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Plant Sci.* 91: 49-55.
- Jadhav, A. A., S. J. Rayate, L. B. Mhase, M. Thudi, A. Chitkineni, P. N. Harer, A. S. Jadhav, R. K. Varshney, and P. L. Kulwal. 2015. Marker-trait association study for protein content in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Genet.* 94: 279-286.
- 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 Mol. Biol. Rep.* 30: 654-665.
- Khajuria, Y. P., M. S. Saxena, R. Gaur, D. Chattopadhyay, M. Jain, S. K. Parida, and S. Bhatia. 2015. Development and

CONCLUSIONES

Los garbanzos analizados presentaron una amplia base genética y el agrupamiento de los diferentes genotipos coincidió con su origen y clasificación como Desi y Kabuli. La variación en las características de calidad de grano se asoció con algunos marcadores microsatélites. La diversidad fenotípica y genética observada sugiere que estos materiales genéticos representan una buena fuente de variación genética para la mejora adicional de la calidad de grano del garbanzo.

—Fin de la versión en Español—



- integration of genome-wide polymorphic microsatellite markers onto a reference linkage map for constructing a high-density genetic map of chickpea. *PLoS ONE* 10(5): e0125583.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Liu, K. J., and S. V. Muse. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- Muehlbauer, F. J., W. J. Kaiser, and I. Kusmenoglu. 1998a. Registration of 'Dwellely' chickpea. *Crop Sci.* 38: 282-283.
- Muehlbauer, F. J., W. J. Kaiser, and I. Kusmenoglu. 1998b. Registration of 'Sanford' chickpea. *Crop Sci.* 38: 282-282.
- Nei, M., F. Tajima, and Y. Tatenno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.* 19: 153-170.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pundir, R. P. S., K. N. Reddy, and M. H. Mengesha. 1988. ICRISAT chickpea germplasm catalog: passport information. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru, India. 509 p.
- Quintero-Soto, M. F., A. G. Saracho-Peña, J. Chavez-Ontiveros, J. A. Garzon-Tiznado, K. V. Pineda-Hidalgo, F. Delgado-Vargas, and J. A. Lopez-Valenzuela. 2018. Phenolic profiles and their contribution to the antioxidant activity of selected chickpea genotypes from Mexico and ICRISAT collections. *Plant Foods Hum. Nutr.* 73: 122-129.
- Reif, J. C., A. E. Melchinger, and M. Frisch. 2005. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Sci.* 45: 1-7.
- Saeed, A., R. Darvishzadeh, and A. Basirnia. 2013. Simple sequence repeat markers associated with agro-morphological traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zemdirbyste* 100: 433-440.
- Saeed, A., H. Hovsepian, 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 Mol. Biol. Rep.* 29: 848-858.
- Saini, H. S., and E. J. Knights. 1984. Chemical constitution of starch and oligosaccharide components of desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum*) seed types. *J. Agric. Food Chem.* 32: 940-944.
- Sefera, T., B. Abebie, P. M. Gaur, K. Assefa, and R. K. Varshney. 2011. Characterisation and genetic diversity analysis of selected chickpea cultivars of nine countries using simple sequence repeat (SSR) markers. *Crop Pasture Sci.* 62: 177-187.
- Segev, A., H. Badani, Y. Kapulnik, I. Shomer, M. Oren-Shamir, and S. Galili. 2010. Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Food Sci.* 75: S115-S119.
- Sethy, N. K., B. Shokeen, K. J. Edwards, and S. Bhatia. 2006. Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 112: 1416-1428.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Sreerama, Y. N., V. B. Sashikala, and V. M. Pratapa. 2010. Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: evaluation of their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* 58: 8322-8330.
- Valenzuela-Herrera, V., P. Manjarrez-Sandoval, A. Morales-Gómez, R. A. Salinas-Pérez, L. Gómez-Gómez, G. A. Fierros-Leyva, P. F. Ortega-Murrieta, I. Padilla-Valenzuela, M. Ramírez-Soto, J. A. Acosta-Gallegos, E. Gutiérrez-Pérez, S. Velarde-Félix, and G. Fuentes-Dávila. 2016. "Jumbo 2010", cultivar of chickpea "kabuli" type of extra large size from Sinaloa, Mexico. *Glo. Adv. Res. J. Agric. Sci.* 5: 277-282.
- Varshney, R. K., M. Thudi, S. N. Nayak, P. M. Gaur, J. Kashiwagi, L. Krishnamurthy, D. Jaganathan, J. Koppolu, A. Bohra, S. Tripathi, A. Rathore, A. K. Jukanti, V. Jayalakshmi, A. Vemula, S. J. Singh, M. Yasin, M. S. Sheshshayee, and K. P. Viswanatha. 2014. Genetic dissection of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 445-462.
- Wang, D., J. Shi, S. R. Carlson, P. B. Cregan, R. W. Ward, and B. W. Diers. 2003. A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop Sci.* 43: 1828-1832.
- Wang, R. F., M. P. Gangola, S. Jaiswal, M. Bâga, P. M. Gaur, and R. N. Chibbar. 2017. Variation in seed-quality traits of chickpea and their correlation to raffinose family oligosaccharides concentrations. *Crop Sci.* 57: 1594-1602.
- Wood, J. A., and M. A. Grusak. 2007. Nutritional value of chickpea. *In: Yadav, S. S., R. J. Redden, W. Chen, and B. Sharma (eds). Chickpea Breeding and Management.* CAB International, Oxfordshire, U.K. pp: 101-142.
- Zhu, C., M. Gore, E. S. Buckler, and J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Genome* 1: 5-20.

